



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 336 173**

② Número de solicitud: 200702926

⑤ Int. Cl.:

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **24.10.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **08.04.2010**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
08.04.2010

⑦ Solicitante/s: **Universidad Politécnica de Valencia
CTT-Edif. 6G - Camino de Vera, s/n
46022 Valencia, ES
Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

⑧ Inventor/es: **López Moya, José Rafael y
Navarro Aviñó, Juan Pedro**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Método para mejorar la tolerancia a la salinidad.**

⑦ Resumen:

Método para mejorar la tolerancia a la salinidad.

La presente invención se refiere a un método específico para mejorar la tolerancia a la salinidad de organismos vivos y eliminar el sodio (Na^+) de aguas, suelos, lodos y cualquier otro medio que contenga este elemento, basado en el empleo de la secuencia aislada de un ácido nucleico que codifica para la fitoquelatina sintasa de *Nicotiana glauca*.

ES 2 336 173 A1

DESCRIPCIÓN

Método para mejorar la tolerancia a la salinidad.

5 **Campo de la invención**

El campo de la presente invención se encuentra dentro del área de la biología molecular, y en particular en la implicación de genes de plantas en los procesos de detoxificación de sodio, el uso de organismos transformados expresando de forma constitutiva o inducida estos genes, y métodos de biorremediación para la recuperación de medios. Así, la presente invención se refiere a la puesta a punto de una herramienta y un método específico para mejorar la tolerancia a la salinidad de organismos vivos y eliminar el sodio (Na^+) de aguas, suelos, lodos y cualquier otro medio que contenga este elemento, basado en el empleo del gen de la fitoquelatina sintasa de *Nicotiana glauca*.

15 **Antecedentes de la invención**

La salinización del suelo es uno de los problemas más importantes que tiene la agricultura para su desarrollo. El cambio climático global produce un incremento en el estrés hídrico, factor cosustancial del estrés salino, ya que el déficit hídrico es también la causa del incremento de las concentraciones de sal en los suelos.

20 Es sabido que la concentración de sal en el interior de la célula de muchos organismos se mantiene alrededor de 50-150 mM, lo que beneficia a la estructura proteica, por ejemplo, debido a las fuerzas electrostáticas. Sin embargo, una concentración de 300-500 mM inhibe las reacciones metabólicas alterando el balance entre las fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas (*Serrano R (1996) Int Rev of Cyt 165:1-52.*).

25 La respuesta de las células al cloruro sódico (NaCl) se articula por un grupo de diversos mecanismos:

El Na^+ puede entrar en la célula a través de varios tipos de canales, “*voltage-dependent cation channels*” y “*voltage-independent cation channels*” (VIC). Los VIC son la principal ruta de entrada de Na^+ a las células de las plantas (*Xiong L. et al. (2002) in Salt Tolerance. The Arabidopsis Book (American Society of Plant Biologists, pp 1-22)*). Debido a la similitud entre Na^+ y K^+ , los transportadores de K^+ dependientes de voltaje pueden facilitar la entrada de Na^+ ; Por ejemplo, AtHKT1 de Arabidopsis (transportador de sodio con homología de secuencia a los transportadores de potasio de la familia HKT), está implicado en la conducción de Na^+ de tallos a raíces. Esta recirculación parece jugar un importante papel en la tolerancia de las plantas al estrés salino (*Berthomieu P et al. (2003) EMBO journal 22:2004-2014*).

35 La variación en el potencial de membrana (valores ≤ 130 mV) facilita la entrada de Na^+ . La hiperpolarización en la membrana plasmática de levadura es producida por la ausencia del gen *PMP3 (SNA1)*. Los homólogos en *A. thaliana* son *RC12A* y *RC12B (BLT101)* en trigo). La sobreexpresión de *RC12A* puede aliviar la supresión del crecimiento y los daños foto-oxidativos reduciendo la entrada de Na^+ en las raíces (*Mitsuya S. et al. (2006) Physiologia Plantarum 128:95-102*).

El papel que el Ca^{2+} juega en el intrincado grupo de respuestas a NaCl ha sido clarificado recientemente en varios aspectos. La sobre-expresión de ACA4 (Ca^{2+} ATPasa vacuolar de *Arabidopsis thaliana*) en levadura aumenta la tolerancia a sal (*Geisler M. et al. (2000) Plant Physiol 124:1814-1827*).

45 El Na^+ es evacuado fuera de las células por medio de antiportadores Na^+/H^+ , localizados en la membrana plasmática. De acuerdo con esto, la sobre-expresión del gen *SOS1* de *A. thaliana*, que codifica para el antiportador de Na^+/H^+ de membrana plasmática SOS1, mejora la tolerancia a salinidad (*Shi H. et al. (2003) Nat biotechnol 21:81-85*). Además de la extrusión de iones Na^+ , una de las causas más importantes de la tolerancia a salinidad es su compartimentalización en la vacuola. El gradiente de protones que facilita el antiporte se produce por H^+ -ATPasas y H^+ -pirofosfatasa (PPasas) vacuolares. Las plantas transgénicas que sobreexpresan AVP1, H^+ -PPasa vacuolar, muestran una tolerancia salina que está correlacionada con el aumento del contenido fónico dentro de las plantas (*Yamaguchi T. et al. (2005) Trends Plant Sci 10:615-620*). Asimismo, plantas que sobreexpresan AtNHX1 (antiportador vacuolar Na^+/H^+ de *Arabidopsis thaliana*) fueron capaces de crecer, florecer y producir semillas en presencia de 200 mM NaCl en plantas transgénicas de *Brassica napus* (*Zhang H-X. Et al. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98:12832-12836*) y tomate transgénico (*Zhang H-X. et al. (2001) Nat biotechnol 19:765-768*). La sobreexpresión de AgNHX1 (procedente de la planta halófila *Atriplex gmelini*), BnNHX1 (*Brassica napus*), HbNHX1 (*Hordeum brevisubculatum*) y GhNHX1 (*Gossypium hirsutum*) también juegan el mismo papel (*Yamaguchi T. et al. (2005) Trends Plant Sci 10:615-620*). La expresión heteróloga de TsVP (H^+ -PPasa clonada de *Thellungiella halophila*) en la levadura mutante *enal* (bomba que elimina Na^+ fuera de la célula) suprime la hipersensibilidad a Na^+ . La planta de Tabaco transgénica que sobreexpresa TsVP consigue un 60% más de peso seco que el tipo salvaje cuando se expone a 300 mM NaCl (*Gao F. et al. (2006) J Exp Bot 57:3259-3270*).

65 Los osmolitos también juegan un papel relevante en la tolerancia a salinidad. Protegen contra la pérdida de agua y cambios en la estructura de la membrana plasmática como consecuencia de eliminar los efectos tóxicos de los ROS (“Reactive Oxygen Species”) generados por el estrés salino. Prolina, glicina, betaina, trehalosa, manitol y sorbitol, producidos de manera abundante y acumulados en células tratadas con sal, representan un componente importante en las respuestas a estrés salino (*Sahia C. et al. (2006) Physiol Plant 127:1-9*). La sobreexpresión de enzimas implicadas

en la ruta de detoxificación de ROS (SOD, CAT, GST, APX, GPX) resulta en un incremento de la tolerancia a estrés salino (Xiong L, Zhu J-K (2002)). Semillas de tabaco transgénico que sobre-expresan un cDNA que codifica para un enzima con actividad glutatión S-transferasa (GST) y glutatión peroxidasa (GPX), crecen más rápido que las semillas control cuando son expuestas a bajas temperaturas y estrés salino (Roxas V-P, Smith R-K, Jr, Allen E-R, Allen R-D (1997) *Nat biotechnol* 15:988-991). Las enzimas glioxalasa I (gly I) y glioxalasa II (gly II) son necesarias para la detoxificación de metilglioxal y confieren tolerancia a salinidad en plantas transgénicas de tabaco (Singla-Pareek S-L, Reddy M-K, Sopory S-K (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100:14672-14677).

Hay una clara conexión entre el estrés oxidativo y el osmótico a través de las llamadas “Mitogen-Activated Protein Kinase” (MAPK). El gen *EhHOG*, que codifica una MAPK que tiene un papel esencial en la ruta de osmoregulación de levadura y otros eucariotas, fue aislado de *Eurotium herbariorum* del mar muerto. Cuando *EhHOG* fue sobreexpresado en el mutante *hog1* de *S. cerevisiae*, el crecimiento y la morfología aberrante de *hog1* fueron restaurados en condiciones de alto estrés osmótico (Jin Y, Weining S, Nevo E (2005) *Proc Natl Acad Sci USA* 102:18992-18997).

Varios genes inducidos por estrés salino pertenecen a la familia LEA. Son conocidos diversos tipos de LEA de *Arabidopsis*; RD (“Responsive to Dehydration”), COR (“Cold-Regulated”), LTI (“Low Temperature-Induced”), KIN (“cold induced”). Todos estos tipos son inducidos por estrés salino, hídrico, bajas temperaturas y ABA. El arroz transgénico que sobre-expresa SNAC1 (“STRESS-RESPONSIVE NAC 1”) es más sensible a ABA y pierde agua más lentamente por el cierre de los estomas, SNAC1 puede mejorar la tolerancia a la sequía y a la salinidad en arroz. (Hu H. et al. (2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 103:12987-12992).

La sensibilidad de las plantas a la presencia de sodio no es, por tanto, una característica inherente a las mismas, ya que se conocen diversas adaptaciones, tanto en tierra como en mar, a altas concentraciones salinas, como es el caso de las plantas halófitas. Esto indica que la tolerancia puede ser resuelta por transferencia génica. Hasta la fecha, los genes descritos en la defensa contra el estrés salino estaban implicados en transporte, extrusión, osmoprotección, antiportadores vacuolares, factores de transcripción, etc.

En las últimas décadas se han desarrollado plantas que contienen diversos grupos de moléculas que sirven para aliviar los efectos de la salinidad. Por ejemplo, los osmoprotectantes, que son solutos compatibles como prolina (aminoácidos), glicina-betaina, dehidrina y azúcares (manitol, trehalosa, etc) que funcionan como osmolitos y protegen las células de la deshidratación, y por tanto de la pérdida de turgor, mejoran el mantenimiento de las raíces y se disparan en respuesta al déficit de agua.

En Agosto de 1999 Eduardo Blumwald, científico argentino que trabajaba en Toronto, publica la utilización de un antiportador vacuolar de *Arabidopsis thaliana* que expulsa H⁺ al citoplasma mientras acepta iones Na⁺ (patente n° CA2323756 y posteriormente patente US6936750). Esto permite que las plantas que lo sobreexpresan puedan vivir en ambientes salinos altos.

En Agosto de 2001 el mismo investigador, ahora en Davis, Universidad de California, hace pública la obtención de una planta de tomate genéticamente modificada que crece y se desarrolla en agua de irrigación salada. Es importante subrayar que aunque a lo largo del siglo pasado un buen número de investigadores ha estado tratando de desarrollar variedades de cosecha tolerantes a sal usando técnicas de mejora clásica, ninguno de los esfuerzos dio los resultados esperados.

En 2001 se hace pública la demostración de que AtHKT1 es un transportador de Na⁺ al interior de la raíz de *Arabidopsis thaliana* (Rus et al., *Plant Physiology* 136:2500-2511 (2001)). Por tanto, teóricamente, la sobre-expresión de este gen en una planta permitiría una mayor entrada de Na⁺ por las raíces de los individuos modificados con dicho gen.

En la solicitud de patente española n° 2173019, publicada en 2002, se define el empleo del gen de la ATPasa de sodio de *Neurospora crassa* en la mejora de la tolerancia a la salinidad.

Ahora, los autores de la presente invención han desarrollado un método para mejorar la tolerancia a la salinidad basado, por primera vez, en el empleo de moléculas capaces de unirse directamente al sodio para bloquear su acción tóxica dentro de la célula.

Estas moléculas son las fitoquelatinas (PCs). Las PCs son péptidos ricos en cisteína que no están codificados genéticamente. Su síntesis se inicia o induce por la presencia de metales pesados, como el cadmio, con el concurso de la enzima fitoquelatina sintasa (PCS) que utiliza GSH como sustrato para formar el péptido [γ-Glu-Cys]_{n=2-11}-Gly (PCs) (Steffens, J.C. (1990) *The heavy metal-binding peptides of plants. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41,533-575).

El gen de la PCS de diferentes especies ha sido utilizado para mejorar la tolerancia y acumulación de metales pesados en diversas especies vegetales como solución al problema de contaminación de suelos por estos contaminantes, es decir, se ha dotado a las plantas elegidas de una mayor capacidad de tolerar y, lo que es más interesante, acumular, mediante fitoextracción, metales pesados. Así, la PCS parece desempeñar un papel esencial en la regulación del equilibrio celular de iones de metales pesados “libres” y complejados mediante un mecanismo sencillo y eficaz (Erwin G. et al. (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6838-6842). Además, muchos autores sugirieron anteriormente que las

PC pueden desempeñar un papel en la detoxificación de metales pesados (Cobbett C (2002) *Annu Rev Plant Biol* 53: 159-182). Esto ha dado como resultado patentes de genes que codifican para fitoquelatinas sintetas (US6489537 y US 6844485), pero, en ningún caso se han empleado para combatir la salinidad, de modo que la propuesta que aquí se plantea genera un nuevo método para afrontar la contaminación por sales o salinización.

Por otro lado, existen en el estado de la técnica métodos no biológicos empleados para la restauración de suelos salino-sódicos que suelen consistir en la adición de sulfato de calcio (yeso) para facilitar el intercambio catiónico y esperar diversos lavados por la lluvia de los cationes sustituidos. Sin embargo, la migración a horizontes más profundos de las sales no es la solución al problema puesto que podría ascender de nuevo por capilaridad o contaminar acuíferos.

A este respecto, la presente invención también proporciona un procedimiento para reducir o eliminar sodio de un medio cualquiera (sólido, líquido o gaseoso) que contiene dicho metal alcalino, que consiste en utilizar PCSs en un organismo vivo cuya capacidad de combatir los efectos de la salinidad es limitada, y sustraerlo de un medio concreto por medio de su acumulación en éste.

Además de emplear en este método secuencias ya conocidas que codifican para PCSs de diferentes especies, los autores de la presente invención han secuenciado por primera vez el gen de la PCS de *Nicotiana glauca*, el cual puede expresarse de forma constitutiva o inducida en *N. glauca* o en cualquier otro organismo vivo con tolerancia a la salinidad limitada.

El método objeto de la presente invención presenta ventajas significativas respecto a los procedimientos desarrollados en el estado de la técnica para combatir la salinidad. Por una parte, es un método de aplicación sencilla y de gran utilidad, ya que permite la aplicación directa al medio contaminado, lo que supone, en el caso de suelos salinizados, evitar la pérdida de suelo por lavado superficial de las aguas de escorrentía de aquellos suelos que no permiten el crecimiento de plantas silvestres. Además, presenta ventajas de tipo económico ya que aprovecha la capacidad de los organismos vivos para disminuir la erosión y/o acumular las sales.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Comparación entre *NgPCS1* y PCSs conocidas. A. Alineamientos CLUSTAL W de la secuencia de aminoácidos de *PCS1* de *Nicotiana glauca* (*NgPCS1*), *N. Tabacum* (*NtPCS1*), *A. thaliana* (*AtPCS1*) y *T. aestivum* (*TaPCS1*). Los aminoácidos idénticos están encuadrados en fondo negro. La tríada catalítica formada por Cys56, Hys162 y Asp180 similar a papaína (papain-like) indispensable para la catálisis está encuadrada en fondo gris. B. Perfil de hidropatía de *Kyte-doolittle* de *NgPCS1*. Los valores próximos a 2 indican aquellas zonas de la enzima que están probablemente insertas en la membrana. C. Análisis filogenético de PCSs de diferentes especies. Árbol sin raíz construido con el método neighbour-joining (Clustal W). Las barras representan la distancia genética (0.1 sustituciones por sitio). A continuación se detallan las secuencias codificantes de genes *PCS*, las especies y el número de acceso están entre paréntesis: *AhPCS1* (*Arabidopsis hallen*, AAS45236.1), *AtPCS1* (*Arabidopsis thaliana*, AAD16046.1), *AtPCS2* (*Arabidopsis thaliana*, AAK94671.1), *AsPCS* (*Allium sativum*, AA013809.1), *AyPCS* (*Athyrium yokoscense*, BAB64932.1), *BjPCS1* (*Brassica juncea*, BAB85602.1), *BnPCS* (*Brassica napus*, CAK24968.1), *CdPCS* (*Cyonodon dactylon*, AAO13810.2), *CePCS* (*Caenorhabditis elegans*, NP_4964575.3), *GmhPCS* (homo-phytochelatin synthase, *Glycin max*, AAL78384.1), *NgPCS1* (*Nicotiana glauca*), *NtPCS1* (*Nicotiana tabacum*, AA074500.1), *LsPCS1* (*Lactuca sativa*, AAU93349.1), *LjPCS1* (*Lotus japonicus*, AAQ01752.1), *LjPCS2* (*Lotus japonicus*, AAT80341.1), *LjPCS3* (*Lotus japonicus*, AAY81940), *OsPCS* (*Oriza sativa*, AAO13349.2), *PvPCS* (*Pteris vittata*, AAT11885.1), *SpPCS* (*Schizosaccharomyces pombe*, Q10075), *SrPCS* (*Sesbania rostrata*, AAY83876.1), *StPCS* (*Solanum tuberosum*, CAD68109.1), *TcPCS1* (*Thlaspi caerulescens*, AAT07467.1), *TIPCS* (*Thlaspi japonicum*, BAB93119.1), *TaPCS* (*Triticum aestivum*, AAD50592.1) and *TIPCS* (*Thypha latifolia*, AAG22095.3).

Figura 2. Crecimiento comparativo en Cd^{2+} y $NaCl$. A. Expresión de *NgPCS1* en levadura en un medio que contiene Cd^{2+} y Na^+ . Test de goteo. Células (DO a 600 nm de aproximadamente 1.4) en fase de crecimiento estacionaria se depositaron en diluciones seriadas en un medio mínimo SD (1% de sacarosa/1% de galactosa) suplementado con los aminoácidos. apropiados y $NaCl$ 0, 0.6, 0.7, 1 M y $CdCl_2$ 100 μM , respectivamente. Las figuras muestran el crecimiento de diluciones 1:20 tras 3 días (4 días para la concentración 1 M). B. Crecimiento de células de levadura expresando *NgPCS1* en un medio con $NaCl$ 0.6 y 0.7 M. La figura muestra la comparación de ratios de crecimiento vector *pYES2NgPCS1*/vector *pYES2* vacío en células sin $NaCl$ y en células con $NaCl$ frente a tiempo de incubación (en horas). Las células fueron crecidas a una DO de 1 a 600 nm, e inoculadas a una concentración de 10^6 células por ml en un medio líquido sin $NaCl$ o con $NaCl$ 0.6 M, 0.7 M, y 1.4 M. C. Comparación de ratios de crecimiento vector *pYES2NgPCS1*/vector *pYES2* vacío en células sin $NaCl$ y con $NaCl$ 1.4 M. Los ratios han sido empleados para minimizar aquellas diferencias de crecimiento que no son debidas a los tipos de estrés específicamente estudiados ya que la sola presencia del vector *pYES2NgPCS1* en levaduras produce diferencias. D. Comparación de la densidad óptica entre células sin $NaCl$ y con $NaCl$ 1.4 M. Modelo de crecimiento en medio mínimo representado por DO frente al tiempo en horas medido durante un periodo de 4 días de crecimiento. Las diferencias en valor absoluto de crecimiento se observan para los 4 tiempos elegidos. E. Contenido relativo de concentración intracelular de Na^+ . La comparación de la concentración intracelular de Na^+ en células que contienen el vector *pYES2* vacío y células que contienen *pYES2NgPCS1*. Las células de levadura fueron crecidas a una DO de 0.6 a 600 nm. El $NaCl$ fue añadido a una concentración final de 1.4 M. Los valores en células con *pYES2* vacío fueron tomados como el 100%.

ES 2 336 173 A1

Figura 3. *Expresión de TaPCS1 en medios hidropónicos y suelos. A. Crecimiento de la planta en condiciones hidropónicas. WT: fenotipo salvaje (wild type), TaPCS1: plantas que sobreexpresan TaPCS1. B. Crecimiento en macetas. L1, L2, y L3 son tres líneas diferentes que contienen TaPCS1 sobreexpresado. C. Microscopía confocal de tejidos radiculares. Se empleó DHE como informador de estrés oxidativo. Control: sin NaCl. Las líneas modificadas L1 y L3 fueron elegidas como representantes de 4 repeticiones.*

Figura 4: *Esquema del ADN de transferencia (tDNA). LB: extremo izquierdo, LR: extremo derecho, P: promotor, G: gen de interés; T: terminador; GRA: gen de resistencia a antibiótico.*

10 Objeto de la invención

En primer lugar, es objeto de la invención el gen *NgPCS1* que codifica la fitoquelatina sintasa de *Nicotiana glauca* con secuencia SEQ ID NO 1.

15 Es también objeto de la invención el empleo del gen *NgPCS1* en un método para mejorar la tolerancia a salinidad y acumulación de sodio de cualquier organismo vivo.

Otro objeto de la invención es el empleo del gen *NgPCS1* en un método para recuperar un medio salinizado mediante organismos modificados que expresen una fitoquelatina sintasa codificada por SEQ ID NO 1 o secuencias que tengan al menos un 35% de similitud con SEQ ID NO 1.

Finalmente, es objeto de la invención el empleo de las fitoquelatinas obtenidas *in vivo* o *in vitro* por reacción enzimática mediada por la fitoquelatina sintasa codificada por la SEQ ID NO 1, o secuencias con al menos un 35% de similitud, como quelantes de sodio.

25 Descripción de la invención

En un aspecto principal, la invención se refiere a una secuencia aislada de un ácido nucleico que codifica para la fitoquelatina sintasa de *Nicotiana glauca* (*NgPCS1*), caracterizada por la SEQ ID NO 1.

30 El término “codifica” se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido tal como gen, cDNA o mRNA que sirve como molde para la síntesis de polímeros y macromoléculas en procesos biológicos o en procesos llevados a cabo *in vitro*.

35 En otra realización principal de la invención se contempla un vector que comprende la SEQ ID NO 1. De forma preferida, dicho vector es un plásmido.

Otra realización principal de la invención, se refiere a un organismo transgénico estable (célula u organismo modificado genéticamente) que comprende la secuencia SEQ ID NO 1.

40 La fitoquelatina sintasa de *Nicotiana glauca* (*NgPCS1*), localizada en el citoplasma, es el enzima que media la producción de fitoquelatinas (PCs), utilizando glutatión (GSH) como sustrato. La sobreexpresión de *NgPCS1* tiene como resultado un aumento de la tolerancia a Na⁺, además de la tolerancia a metales pesados ya observada en otras PCs. El mecanismo por el cual se produce una mejora de la tolerancia es la quelación, por medio de las PCs, de iones Na⁺ y la posterior reclusión en vacuolas de los complejos PC-Na⁺.

Así pues, otro aspecto principal de la invención se refiere al empleo de la secuencia SEQ ID NO 1 para mejorar la tolerancia a salinidad y/o acumulación de sodio (Na⁺) en un organismo vivo (animal, vegetal o microorganismo).

50 Esto ha permitido a los autores de la presente invención el desarrollo de un método para mejorar la tolerancia a la salinidad y/o acumulación de Na⁺ en un organismo vivo que comprende las siguientes etapas:

- transformación del organismo vivo con la SEQ ID NO 1, o una secuencia con al menos un 35% de similitud con la SEQ ID NO 1; y
- expresión de la secuencia (SEQ ID NO 1, o la secuencia con al menos un 35% de similitud con la SEQ ID NO 1), controlada por secuencias regulatorias funcionales en el organismo vivo.

60 Las secuencias con al menos un 35% de similitud de la SEQ ID NO 1 abarcan aquellos genes que tengan función fitoquelatina sintasa, es decir, desde eucariotas como el gusano *Caenorhabditis elegans* y bacterias hasta plantas (que tienen una similitud más alta).

La fase de transformación se lleva a cabo por cualquiera de los métodos conocidos en el estado de la técnica. En una realización particular, en una primera etapa se lleva a cabo la construcción de un vector que comprenda la SEQ ID NO 1, o una secuencia con al menos un 35% de similitud con la SEQ ID NO 1 y, posteriormente, se introduce dicho vector en el organismo vivo.

ES 2 336 173 A1

Para mejorar la tolerancia a sodio en un organismo vivo es necesario que éste exprese el gen de la secuencia introducida bajo el control transcripcional de una secuencia regulatoria que puede ser constitutiva (siempre facilitando la expresión) o inducida (facilitando la expresión sólo si hay sodio).

5 En la presente invención, el término “funcionales” hace referencia a que las secuencias regulatorias tengan efecto sobre la funcionalidad del gen en lo que se refiere a la transcripción (comienzo y terminación) y traducción (inicio y terminación) del RNA mensajero y otras no descritas.

10 Entre las secuencias regulatorias contempladas en la presente invención están los promotores y otras menos comunes como determinados intrones, las secuencias de término de la transcripción y las secuencias de inicio y término para la traducción posterior del RNA mensajero.

15 La fitoquelatina sintasa de la especie *Nicotiana glauca* puede expresarse por tanto de forma constitutiva o inducida en *N. glauca* o en cualquier otro organismo vivo cuya capacidad de combatir los efectos de la salinidad es limitada.

20 La expresión constitutiva de la PCS produce una mejora en el crecimiento de levaduras y plantas de modo que puede utilizarse para resolver varios problemas: (a) el cultivo de numerosas plantas en suelos salinizados o en aguas con contaminación salina, que puede generar dos beneficios directos, la revalorización de tierras abandonadas por la salinización gracias a la producción de biomasa así como la restauración de las mismas para volver a ser cultivadas y (b) el cultivo de microorganismos modificados en medios con contaminación salina para reducir el contenido en sales de dichos medios.

25 En una realización particular, el organismo vivo empleado en el método de la presente invención es una levadura, de forma preferida *Saccharomyces cerevisiae*.

En otra realización particular, el organismo vivo es una planta, preferiblemente *Nicotiana glauca*.

30 En otro aspecto principal de la invención, se contempla el empleo de la secuencia SEQ ID No1 para reducir o eliminar sodio de un medio líquido, sólido o gaseoso.

Esta aplicación ha permitido el desarrollo de un método para reducir o eliminar Na⁺ de un medio líquido, sólido o gaseoso basado en las siguientes etapas:

- 35 i. transformar organismos vivos con la SEQ ID NO 1 o una secuencia con al menos un 35% de similaridad con la SEQ ID NO 1;
- ii. identificar los organismos transformados en i) mediante selección con antibiótico,
- 40 iii. sembrar el medio salinizado con los organismos identificados en ii),
- iv. cultivar los organismos durante un periodo de tiempo adecuado, y
- v. recolectar los organismos.

45 De forma preferida, el proceso de transformación genética se lleva a cabo por electroporación. Con ello se consiguen células huésped de *Escherichia coli* o *Agrobacterium tumefaciens* que portan un vector con el inserto deseado (después de ser seleccionadas con el antibiótico correspondiente). Como se ha aclarado anteriormente, estas células también se consideran en la presente invención como organismos transgénicos aunque no se empleen directamente en la unión de sodio en un medio salinizado sino que sirven como medio amplificador en el caso de *E. coli* y como instrumento de infección en el caso de *A. tumefaciens*.

50 Para llevar a cabo el proceso de eliminación de sodio es necesario tener la seguridad de que los organismos empleados contienen el transgén insertado en su genoma o bien lo expresen por mediación de vectores. Así, para conseguir organismos que expresen la secuencia SEQ ID NO 1, o una secuencia similar en al menos un 35%, es necesario llevar a cabo una fase de selección. La selección se lleva a cabo con antibióticos, ya que el organismo transgénico incorpora a través del vector un gen de resistencia a antibióticos (GRA). Éste se encuentra localizado junto al gen de SEQ ID NO 1, entre los bordes izquierdo (LB) y derecho (RB) que definen las regiones flanqueantes del ADN de transferencia (tDNA) (figura 4).

60 En el caso de emplear microorganismos que expresen el gen para eliminar las sales de un medio salinizado, la recolección de los organismos se hará por floculación, precipitación, centrifugación o cualquier otro método que permita separar los microorganismos que han acumulado las sales del medio.

65 En el caso de emplear plantas que expresen el gen para eliminar las sales de un medio salinizado, se recolectará la planta, se triturará antes o después de ser secada y los restos serán vertidos a un vertedero de residuos conforme a la legislación.

Finalmente, en otra realización principal de la invención, se contempla el uso de fitoquelatinas (PCs), obtenidas *in vivo* o *in vitro* por reacción enzimática mediada por la fitoquelatina sintasa codificada por la SEQ ID NO 1, o secuencias con al menos un 35% de similaridad, como quelantes de sodio.

5 Ejemplos

Ejemplo 1

La fitoquelatina sintasa de N. glauca es muy similar al homólogo de N. tabacum

10

El diseño de cebadores en zonas conservadas de la región codificante del gen de PCS de *N. tabacum* condujo a la amplificación de un fragmento de PCR de un tamaño esperado (1,5 Kb). El marco de lectura abierto codificó una proteína (NgPCS1) con una masa molecular de 55,14 kD; 501 residuos de aminoácidos y un pl de 6,32. El perfil de hidropatía se correlacionó con una proteína citoplasmática (figura 1B). La nueva proteína se comparó con la PCS de *A. thaliana* (número de acceso AAD16046.1), *N. tabacum* (número de acceso AY235426) y *T. aestivum* (número de acceso AAD50592.1), dando como resultado el siguiente porcentaje de identidad: el 96% en relación con NtPCS1, el 64% en comparación con AtPCS1 y el 59% con TaPCS1. Esta alta identidad entre las secuencias de PCSs de plantas que pertenecen a diferentes familias, tales como *Brassicaceae*, *Poaceae* y *Solanaceae*, indicó una elevada conservación y, por tanto, un importante papel de estas proteínas en el reino vegetal. El porcentaje de identidad entre las secuencias de proteínas de la PCS más investigada de *T. aestivum* (TaPCS1) y la PCS de *A. thaliana* (AtPCS1) fue de un 58%, similar al porcentaje encontrado para la nueva PCS notificada de *N. glauca* y la PCS de *T. aestivum* (59%). De manera coherente, Cys⁵⁶, Hys¹⁶² y Asp¹⁸⁰ descritas como una tríada catalítica similar a papaína (papain-like) indispensable para la catálisis (*Rea P-A (2006) Proc Natl Acad Sci USA 103:507-508*), también estaban conservadas en NgPCS1 (figura 1A). Se obtuvo un árbol sin raíz con 24 secuencias de PCSs relacionadas con la estructura primaria prevista de NgPCS1 (Blastp de la base de datos NCBI; figura 1C). Se identificaron las siguientes entre las agrupaciones (“clusters”) separadas: la familia de la agrupación de *Brassicaceae* formada por los géneros *Arabidopsis*, *Brassica* y *Thlaspi*, y los géneros *Nicotiana* y *Solanum* que pertenecen a la familia de la agrupación de *Solanaceae*.

30 Ejemplo 2

La sobreexpresión de NgPCS1 en levaduras conduce a una tolerancia al Cd²⁺ y a una acumulación y tolerancia al Na⁺

35

La clonación e investigación de diferentes PCSs condujo a la conclusión de que estos genes pueden conferir acumulación y tolerancia al Cd²⁺ (*Clemens S. et al. (1999) EMBO J 18: 3325-3333. 27*). Tal como se esperaba, NgPCS1 también puede conferir tolerancia al Cd²⁺. Esto es especialmente evidente en este trabajo a partir de los experimentos llevados a cabo a una concentración de 100 μM (figura 2A). Este hecho está completamente de acuerdo con los resultados anteriores obtenidos en los que se producía la sobreexpresión de TaPCS1 en levaduras en condiciones similares de concentración de Cd²⁺ y usando el mismo vector (*Clemens S. et al. (1999)*), lo que establece una función homóloga de ambos genes TaPCS1 y NgPCS1 junto con una similitud estructural.

40

NgPCS1 confirió tolerancia al Na⁺ cuando se sobreexpresó en levaduras a concentraciones de NaCl que oscilaban desde 0,6 hasta 1 M (figura 2A), lo que indicó una función relevante para este tipo de enzima en la tolerancia al estrés salino más allá del papel bien conocido desempeñado en la acumulación de metales pesados. También se investigó el crecimiento mediado por NgPCS1 con tratamiento de estrés salino analizando la cinética de las proporciones de crecimiento a concentraciones de NaCl de 0,6 y 0,7 M (figura 2B). A ambas concentraciones, las células que contenían pYES2NgPCS1 mostraron una clara desventaja de crecimiento inicial en comparación con el vector vacío pYES2. Sin embargo, tras 22 horas de tratamiento, las células expuestas a una concentración 0,6 M primero y a 0,7 M después, demostraron un mejor crecimiento que las células control. Finalmente, la concentración 0,7 M produjo una mayor diferencia de crecimiento que 0,6 M, y por tanto concentraciones más elevadas de NaCl produjeron una mejora superior del crecimiento mediado por NgPCS1. En consecuencia, con NaCl 1,4 M se mejoró el crecimiento de células de levadura mediante la presencia de NgPCS1 en dichas células (figura 2C). Tal como se observó a concentraciones 0,6 M y 0,7 M, aunque no hubo una diferencia perceptible en las proporciones de crecimiento durante las primeras 22 horas, el efecto producido por pYES2NgPCS1 aumentó con el tiempo, lo que condujo a una mayor diferencia al final de las mediciones, lo que constató una respuesta tardía mediada por NgPCS1 en la tolerancia al Na⁺. Las condiciones de crecimiento experimental llevadas a cabo en este trabajo, que favorecen el crecimiento lento (medio mínimo sintético, sin glucosa libre), permitieron una mejor evaluación de los factores que estimulan el crecimiento en condiciones de estrés salino. Hubo un aumento en la diferencia de DO600 a favor de las células que contenían pYES2NgPCS1, que se apreció claramente tras 39 horas de tratamiento y que aumentó espectacularmente a las 97 horas (figura 2D), lo que indicó que NgPCS1 mejoraba drásticamente la tolerancia a la salinidad. Sin embargo, la toxicidad del NaCl puede dividirse en dos componentes: estrés hídrico y daño por Na⁺. Por tanto, surgió la siguiente pregunta: ¿NgPCS1 mejora la tolerancia al NaCl, por ejemplo, aumentando sólo la retención de agua, pero no la acumulación de NaCl? ¿O mejora la tolerancia y la acumulación? Con el fin de responder a esta pregunta, se analizó la acumulación de Na⁺ en el citoplasma de células de levaduras con o sin NgPCS1, demostrándose que NgPCS1 conduce a una mayor acumulación de Na⁺ dentro de las células de levadura que contienen el vector pYES2NgPCS1 (figura 2E).

65

Ejemplo 3

Las fitoquelatinas confieren tolerancia al Na⁺ en plantas y atenúan el estrés oxidativo

5 Con el fin de probar la capacidad de la PCS para mejorar la tolerancia al Na⁺ en plantas, se hicieron crecer especímenes de *N. glauca* que sobreexpresaban una PCS de trigo (*TaPCS1*) probada previamente para determinar la acumulación de metales pesados (Gisbert C. et al. (2003) *Biochem Biophys Res Commun* 303:440-445) (Martínez M. et al. J (2006) *Chemosphere* 64:478-48524).

10 El vector binario pBI121 (Clontech) fue usado para la transformación. El gen GUS del vector binario fue sustituido por el DNA codificante de la fitoquelatina sintasa de trigo *TaPCS1* mediante los sitios de restricción *Bam*HI y *ECL*136II. A continuación, se llevó a cabo la introducción del plásmido obtenido, conteniendo el cDNA *TaPCS1*, en *Agrobacterium tumefaciens* C58C1RifR y posteriormente se realizó la transferencia mediante infección a plantas de *N. glauca*. La nueva construcción fue electroporada en células de *Agrobacterium tumefaciens*. Los transformantes se
15 seleccionaron en placas de LB con kanamicina y se pusieron en contacto con discos de 1 cm de diámetro durante 10 minutos con una suspensión de *A. tumefaciens* conteniendo la construcción deseada. Tras generar plantas adultas por medio del programa de regeneración *in vitro* de explantes de *N. glauca* resistentes a kanamicina, se recolectaron las semillas de las diferentes líneas transgénicas conseguidas y se seleccionaron aquellas que contenían una o
20 varias integraciones en el genoma de la planta, recuperando aquellas que eran capaces de crecer en presencia del antibiótico kanamicina. El último paso consistió en comprobar si la integración del cDNA de *TaPCS1* al genoma de *Nicotiana glauca* mejoraba apreciablemente la tolerancia a Na⁺ de la planta. El estudio de la tolerancia a Na⁺ fue llevado a cabo germinando las semillas transgénicas en un sustrato con vermiculita y dolomita así como en condiciones hidropónicas, aplicando a las 7 y 2 semanas respectivamente NaCl, hasta una concentración final de 200, 300 y
25 500 mM.

Se hicieron evidentes dos aspectos. En primer lugar, ambos tipos de especímenes, los de tipo silvestre y los que sobreexpresaban PCS, siguieron exactamente el mismo patrón de crecimiento en relación con las concentraciones de NaCl probadas, lo que indicó un efecto neto de PCS en la tolerancia al NaCl (figura 3A). En segundo lugar, los especímenes de *N. glauca* necesitaban NaCl para mejorar el crecimiento, al menos en las condiciones hidropónicas probadas en este trabajo. Ambos tipos de plantas siguieron el mismo patrón, pero las OMG (Organismo Modificado Genéticamente) mostraron un mejor crecimiento en todos los casos. Esta similitud en los patrones de crecimiento sólo difirió en un factor de mejora, indicando que la sobreexpresión de *TaPCS1* en *N. glauca* con NaCl es transparente en el sentido de que el gen no cambia el equilibrio interno dentro de la célula y sólo mejora la cantidad de sal metabolizada. Cuando se analizó la halotolerancia en medios sólidos, las plantas también mostraron el patrón típico observado en las condiciones hidropónicas (figura 3B). Tal como se determinó en los cultivos hidropónicos, la presencia de NaCl mejoró el crecimiento y confirmó que 200 mM es la concentración de NaCl óptima para todas las plantas utilizadas en el experimento, incluso mejor que en ausencia de NaCl. Sin embargo, el crecimiento a 350 mM y 500 mM fue anómalamente alto considerando la magnitud de la superficie foliar. En relación con el papel desempeñado por la PCS, la tolerancia observada en NaCl 500 mM fue especialmente evidente puesto que los especímenes de tipo silvestre no
30 pudieron sobrevivir.

El estrés oxidativo resultó atenuado por la PCS (L1 y L3; figura 3C). La PCS sólo aumentó la tendencia natural de *N. glauca* cuantitativamente para lograr un crecimiento mejorado con NaCl.

45 *Materiales y métodos empleados**Cultivos, transformación y ensayos de crecimiento de levaduras*

En este estudio se utilizó la cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, YPH499 (*MATa ura3-52 leu2Δ1 lys2-801 Ade2-101 trp1Δ63, his3-D200*). Para los ensayos de crecimiento en medios sólidos y líquidos, se hicieron crecer las células de *S. cerevisiae* en medio mínimo sintético (SD) con o sin un 2% de agar bacto, respectivamente, que contenía un 1% de sacarosa, un 1% de galactosa, un 0,7% de base nitrogenada para levaduras sin aminoácidos y con sulfato amónico (Pronadisa) y MES-Tris 50 mM (pH 6,0). El medio SD se complementó con adenina (30 µg/ml), histidina (30 µg/ml), leucina (100 µg/ml), lisina (100 µg/ml) y triptófano (80 µg/ml). La transformación mediante el procedimiento con acetato de litio y la selección de los transformantes en levaduras se llevó a cabo tal como se ha descrito (Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A (1983) *J Bacteriol* 153:163-168), y utilizando el marcador URA3 para la selección en levaduras. Las células de levaduras que llevan el vector vacío pYES2 se utilizaron como control negativo. Para investigar la cinética del estrés salino, se hicieron crecer las células hasta una DO a 600 nm de 1, aproximadamente, y se inocularon a una concentración de 10⁶ células por ml en medio líquido sin NaCl o conteniendo 0,6 M, 0,7 M y 1,4 M de NaCl. Para los ensayos de goteo, se hicieron crecer las células hasta la saturación en SD diluido con agua (1/2, 1/5, 1/10, 1/20, 1/100, 1/1.000 y 1/10.000), y se distribuyeron mediante réplica plater 8 x 6 array (Sigma-Aldrich) en placas que contenían 0,6 M, 0,7 M y 1 M de NaCl y CdCl₂ 100 µM.
55
60

65 *Materiales vegetales*

Para el experimento en invernadero, se esterilizaron semillas de *N. glauca* (tipo silvestre) y tres líneas transgénicas de F3 diferentes (TaP12, TaP17 y TaP18, líneas L1, L2 y L3, respectivamente) de la siguiente forma: se sumergieron las semillas en lejía comercial al 30%, más un 0,01% de detergente Triton X-100 durante 7 minutos para evitar el

crecimiento fúngico y bacteriano, después se llevó a cabo un segundo lavado utilizando una disolución de etanol al 70% en agua con un 0,01% de Triton X-100. Finalmente, se lavaron las semillas durante cinco repeticiones consecutivas con agua desionizada durando cada una 5 minutos para eliminar cualquier resto de disolución desinfectante. Las semillas sumergidas se colocaron en placas Petri con un medio preparado con agar 6 g/litro, sales de MS (*Murashige T, Skoog F (1962) Physiol Plant 15:473-497*), y sacarosa 10 g/litro a pH 5,7 tamponado con MES (ácido 2-[N-morfolino] etanosulfónico) 0,25 g/litro. A los diez días (cuando se habían desarrollado las primeras hojas), se transplantaron tres plántulas por línea y tratamiento a macetas que contenían vermiculita y dolomita en las mismas proporciones y se cubrieron con película durante algunos días para obtener mejores condiciones aclimatadas. Las plantas de seis semanas se colocaron en una bandeja diferente para cada tratamiento y se regaron una vez a la semana con o sin NaCl 200, 350 o 500 mM durante 2 semanas. Para el experimento *in vitro*, se colocaron tres plántulas para WT (tipo silvestre) y cada línea de *N. glauca*, que crecían en condiciones estériles tal como se describió en (*Gisbert C. et al. (2003) Biochem Biophys Res Commun 303:440-445*), en tubos Falcon de 50 ml que contenían agua MilliQ con o sin NaCl 200, 350 y 500 mM a temperatura ambiente en un agitador suave (25 rpm en un agitador ELMi S4) durante 7 días.

15 Clonación de NgPCS1

El ADN codificante fue sintetizado a partir de 2 μ g del ARN total aislado de hojas de *N. glauca* mediante la transcriptasa reversa de M-MuLV (virus de la leucemia murina de Moloney) con cebador de oligo(dT)₁₈ (kit Fermentas de síntesis del ADN codificante de la primera hebra) según los procedimientos recomendados en el kit. Un microlitro del ADN codificante producido se utilizó como molde en una reacción de PCR convencional de 50 μ L. Diseño de los cebadores para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): se observó el dominio conservado en el extremo N-terminal para *NtPCS1*, *AtPCS1*, *TaPCS1*, *BjPCS1* y *OsPCS1*. Se diseñaron dos cebadores diferentes en el extremo 5', FW1 (SEQ ID NO 2) y FW2 (SEQ ID NO 3). Las secuencias codificantes en la región C-terminal analizadas para este gen están menos conservadas que las del extremo N-terminal. Por tanto, se usó la secuencia de ARN mensajero de *NtPCS1* y se diseñaron tres cebadores diferentes RV1 (SEQ ID NO 4), RV2 (SEQ ID NO 5) y RV3 (SEQ ID NO 6).

Tras llevar a cabo los experimentos de PCR usando diferentes combinaciones, sólo se obtuvieron dos bandas con el tamaño esperado de 1,5 Kb, correspondiendo en ambos casos a los cebadores FW1/RV1 y FW2/RV2. Utilizando un gel de agarosa con tampón TAE al 1%, se llevaron a cabo las reacciones de PCR y se extrajeron mediante congelación-presión de la banda cortada y precipitación del ADN mediante 1/50 volúmenes de NaCl 5 M y 2 volúmenes de EtOH absoluto. Tras medir la concentración de ADN en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000, los fragmentos amplificados se clonaron en el vector pGEM-T Easy (Promega, Southampton, RU).

Se utilizó *E. coli* DH5 α como huésped. Tras seleccionar los transformantes correctos y aislar el ADN plasmídico (Marligen bioscience, sistema rápido de aislamiento de plásmidos), se secuenciaron los fragmentos clonados en un secuenciador de ADN ABI Prism (Perkin-Elmer) usando los sitios T7 y SP6 localizados en el vector. Ambas secuencias completas de los fragmentos de 1,5 Kb se alinearon con *NtPCS1* usando el programa LALIGN de William Pearson y se observó una identidad del 93% en la secuencia del fragmento FW1/RV1. La secuencia del segundo fragmento, FW2/RV2, reveló una identidad del 91% entre los nucleótidos 592 y 1501 de la secuencia codificante de *NtPCS1*. La alineación de ambos fragmentos de secuencia dio como resultado la misma composición de nucleótidos entre la posición 592 y el codón de terminación. La secuencia C-terminal correcta que corresponde al cebador RV1 se probó utilizando el segundo fragmento secuenciado. *NgPCS1* se subclonó direccionalmente en los sitios *KpnI/BamHI* del vector de expresión pYES2 mediante una nueva amplificación por PCR con los cebadores FW2 y RV2 y con las secuencias adicionales *KpnI* y *BamHI*, respectivamente. pYES2 incluye el gen *Amp^r* de *E. coli*, el marcador de levaduras seleccionable *URA3* y el promotor inducible GAL1 para la expresión en células de levaduras. *E. coli* se transformó mediante electroporación y los transformantes se seleccionaron para *Amp^r*. El ADN plasmídico del clon correcto que contenía *NgPCS1* en pYES2 se transformó en la cepa de levadura YPH499 y se seleccionó tal como se describió anteriormente. Las secuencias de *NgPCS1*, *NtPCS1*, *AtPCS1* y *TaPCS1* se alinearon con el programa CLUSTAL W (*Thompson J-D, Higgins D-G, Gibson T-J (1994) Nucleic Acids Res 22: 4673-4680*). Se construyó un perfil de hidropatía de Kyte-Doolittle para conocer el carácter hidropático de *NgPCS1* (*Kyte J, Doolittle R (1982) J Mol Biol 157:105-132*).

55 Medición de las concentraciones intracelulares de Na⁺

Se crecieron células de levadura en 20 ml de SD con los aminoácidos apropiados a una absorbancia a 600 nm de 0,6. Entonces, se añadió NaCl hasta una concentración final de NaCl 1,4 M y se incubó a 28°C con agitación (150 rpm) durante 3 horas, se centrifugó durante 5 minutos a 7.000 rpm (rotor Beckman JA-20, 4°C), y se lavó cuatro veces con 10 ml de una disolución que contenía MgCl₂ 20 mM y sorbitol 1,5 M. Finalmente, se extrajo el contenido intracelular mediante incubación con 0,5 ml de MgCl₂ 20 mM durante 12 minutos a 95°C. Tras la centrifugación durante 2 minutos ala velocidad máxima, se analizaron alícuotas del sobrenadante con un espectrómetro de absorción atómica (Varian) en el modo de emisión de llama.

65 Determinación de O₂⁻

Se detectó el anión superóxido O₂⁻, tal como describe *Yamamoto Y. et al. (2002) Plant Physiol 128:63-72*, usando dihidroetidio (DHE), una forma reducida de bromuro de etidio, que no es fluorescente y puede atravesar pasivamente

ES 2 336 173 A1

la membrana de las células vivas. Una vez en la célula, se oxida para dar un colorante fluorescente que se une al ADN cercano. Se observó producción de O_2^- en las raíces de *N. glauca* tras la tinción de las raíces con DHE $10 \mu M$ en $CaCl_2$ $100 \mu M$, a pH 4,75 durante 13:30 h. Se obtuvieron imágenes de fluorescencia con un microscopio confocal invertido Leica TCS SL. Para la detección del DHE, se excitaron muestras a 488 nm usando un láser de argón y se recogió la emisión entre 550 y 620 nm. Se repitieron los experimentos con microscopía confocal y fluorescencia al menos cinco veces con resultados similares. Se hicieron crecer semillas de *N. glauca* durante un periodo de seis semanas en medio MS tal como se describió en los materiales vegetales. El DHE se suministró tras nueve días de adaptación a las condiciones hidropónicas.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 336 173 A1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Secuencia aislada de un ácido nucleico que codifica para la fitoquelatina sintasa de *Nicotiana glauca* **caracterizada** por la SEQ ID NO 1.
2. Vector que comprende la secuencia de la reivindicación 1.
3. Vector, según la reivindicación 2, donde dicho vector es un plásmido.
- 10 4. Organismo modificado genéticamente con la secuencia de la reivindicación 1.
5. Empleo de la secuencia de la reivindicación 1 para mejorar la tolerancia a salinidad y/o acumulación de sodio en organismos vivos.
- 15 6. Método para mejorar la tolerancia a la salinidad y/o acumulación de sodio en un organismo vivo que comprende las siguientes etapas:
- 20 a. transformación del organismo vivo con una secuencia con función fitoquelatina sintasa con al menos un 35% de similaridad con la SEQ ID NO 1; y
- b. expresión de la secuencia controlada por secuencias regulatorias funcionales en el organismo vivo.
7. Método, según la reivindicación 6, donde el organismo vivo es una planta.
- 25 8. Método, según la reivindicación 7, donde la planta es *Nicotiana glauca*.
9. Método según la reivindicación 6 donde la transformación del organismo vivo se lleva a cabo con la SEQ ID NO 1.
- 30 10. Método, según la reivindicación 9, donde el organismo vivo es una levadura.
11. Método, según la reivindicación 10, donde la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.
- 35 12. Empleo de la secuencia de la reivindicación 1 para reducir o eliminar sodio de un medio líquido, sólido o gaseoso.
13. Método según reivindicaciones anteriores, para reducir o eliminar sodio de un medio líquido, sólido o gaseoso basado en las siguientes etapas:
- 40 a. transformar organismos vivos con la SEQ ID NO 1 o una secuencia con función fitoquelatina sintasa con al menos un 35% de similaridad con la SEQ ID NO 1;
- b. identificar los organismos transformados en a) mediante selección con antibiótico,
- 45 c. sembrar el medio salinizado con los organismos identificados en b),
- d. cultivar los organismos durante un periodo adecuado, y
- 50 e. recolectar los organismos.
- 55
- 60
- 65

A

```

NgPCS1 MAMAGLYRRVLECPPAVDFASDEGKQIFLEAICNGTMEGFFRLISYFQTOSEPAVYCSLAS 60
NtPCS1 MAMAGLYRRVLECPPAVDFASDEGKQIFLEAICNGTMEGFFRLISYFQTOSEPAVYCSLAS 60
AtPCS1 MAMASLYRRSLESPPAITLFFSASGRLIFMEALCKGTMEGFFRLISYFQTOSEPAVYCSLAS 60
TaPCS1 MEVASLYRRVLESPPAVDFASDEGKRIFAEALCGGTMEGFFRLISYFQTOSEPAVYCSLAS 60

NgPCS1 LSMVLNATAIDEGRKAKGEWRWFDESMLDCCBELEKVRKAGTISFGKVVCLAHCASAKVEA 120
NtPCS1 LSMVLNATAIDEGRKAKGEWRWFDESMLDCCBELEKVRKAGTISFGKVVCLAHCASAKVEA 120
AtPCS1 LSVVLNATSIDEGRKAKGEWRWFDESMLDCCBELEKVRKAGTISFGKVVCLAHCASAKVEA 120
TaPCS1 LSVVLNATAIDEGRKAKGEWRWFDESMLDCCBELEKVRKAGTISFGKVVCLAHCASAKVQS 120

NgPCS1 FRSNHSTIDDFRKQVMACITSDNCHLISVYHRGLFKQTGSGIFSEITGGYHAGKDMALITD 180
NtPCS1 FRSNHSTIDDFRKQVMACITSDNCHLISVYHRGLFKQTGSGIFSEITGGYHAGKDMALITD 180
AtPCS1 FRTSQSTIDDFRKQVMACITSDNCHLISVYHRGLFKQTGSGIFSEITGGYHAGKDMALITD 180
TaPCS1 FRADQSTIDDFRAHLTRCASSQDCHLISVYHRSPFKQTGSGIFSEITGGYHAGKDMALITD 180

NgPCS1 VARPKYEPHWVETELLDAMNTTDEATGLHAGFMLITSKLHRAPALIMTLSCKHESMVTIS 240
NtPCS1 VARPKYEPHWVETELLDAMNTTDEATGLHAGFMLITSKLHRAPALIMTLSCKHESMVTIS 240
AtPCS1 VARPKYEPHWVETELLDAMNTTDEATGLHAGFMLITSKLHRAPALIMTLSCKHESMVTIS 240
TaPCS1 VARPKYEPHWVETELLDAMNTTDEATGLHAGFMLITSKLHRAPALIMTLSCKHESMVTIS 240

NgPCS1 KHLMDLLEVLLSPENVKGIKDVLSVLSNLESNFVEELKWLAEVRCCEENGONLSDDEEG 300
NtPCS1 KHLMDLLEVLLSPENVKGIKDVLSVLSNLESNFVEELKWLAEVRCCEENGONLSDDEEG 300
AtPCS1 KYLKEVLELVSSQHVDSVEKLTISVVPKSLSENFNQFIRMVAEIRITEDSNONLSAEEKS 300
TaPCS1 KYCVELDVENLKDSELDNVTTLLSRLVESLEAWAGDLTKCVLIDURKKEEGESSLSKEEK 300

NgPCS1 SLAIKEEVLEKQVQDTETLYKHVTSILFSENSVCSNAASDS-SLANVFASTCCOGASLFA 359
NtPCS1 SLAIKEEVLEKQVQDTETLYKHVTSILFSENSVCSNAASDS-SLANVFASTCCOGASLFA 359
AtPCS1 SLKIKVQLVLEKVEHEVLEFKHINKFLST-----VGYED-SLTYAAKACCOGASLISG 351
TaPCS1 SLPIKKEVLEKQIRDTLDFRVVHELQYPKGLCGSCSSSSDEDLSLAETAAVCCOGASLISG 360

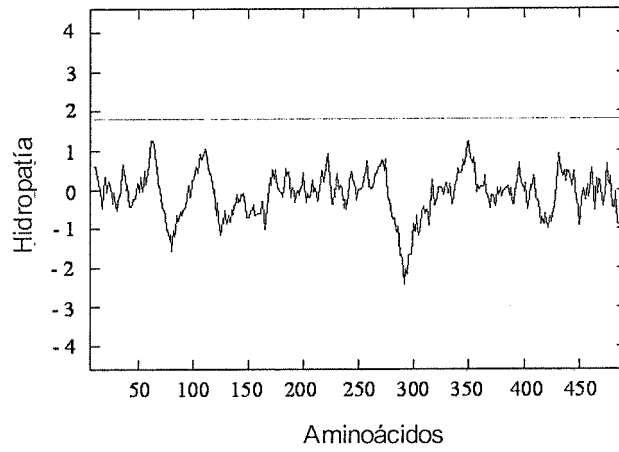
NgPCS1 RSGSSDRFCCLQCVRCYRATGNSAIVVSGVYVNGNGECGVDVLETSQVKTSCCPSEQ 419
NtPCS1 RSGSSDRFCCLQCVRCYRATGNSAIVVSGVYVNGNGECGVDVLETSQVKTSCCPSEQ 419
AtPCS1 --SPSKRCCRETCVVKIKGPDDEGIVVTSVYVVRDGNKQVDLLETSQTECECGP--- 406
TaPCS1 NLVSRDGFCCRETCIKCEANGDGLKRVISGVVYVSKGNECAVDLLETSQVKTSCCPSEQ 420

NgPCS1 DRCSFMHEASNDVLTALLIATPQHTWQQRKDTMVLCBIENLVSAENIPEPILQEBILHHRG 479
NtPCS1 AGCSFMHEASNDVLTALLIATPQHTWQQRKDTMVLCBIENLVSAENIPEPILQEBILHHRG 479
AtPCS1 ---EATYFAGNDVFTALLIATPQHTWQQRKDTMVLCBIENLVSAENIPEPILQEBILHHR 463
TaPCS1 KSKIVKYESSDVLTVLLLVLPNTWLGKIDENVKAEFQSLVSTDNEDLLKCEILHHR 480

NgPCS1 QFLIKKCKDNKVEEDLAEPF 501
NtPCS1 QFLIKKCKDNKVEEDLAEPF 501
AtPCS1 QLQLIKKCKDENKEEDLAEPF 485
TaPCS1 QLHYKAGCKGQEAQCEPPE-- 500
    
```

FIGURA 1

B



C

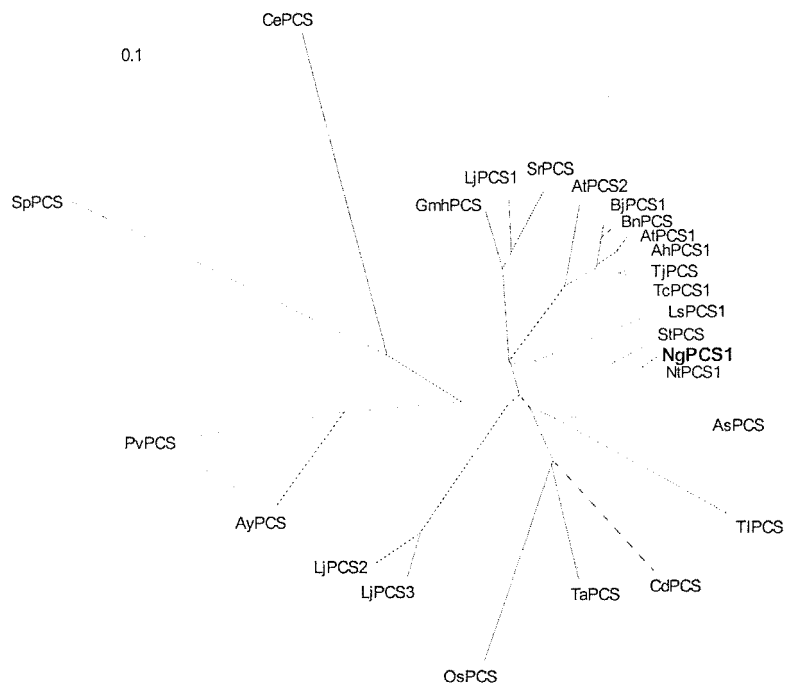
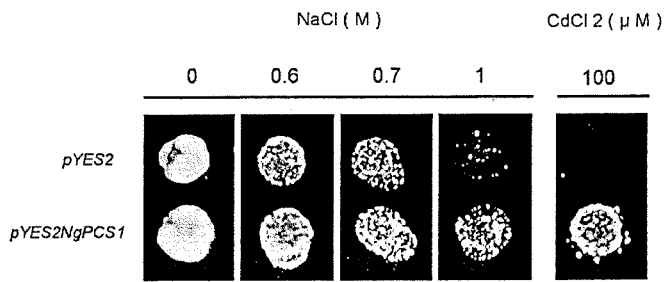
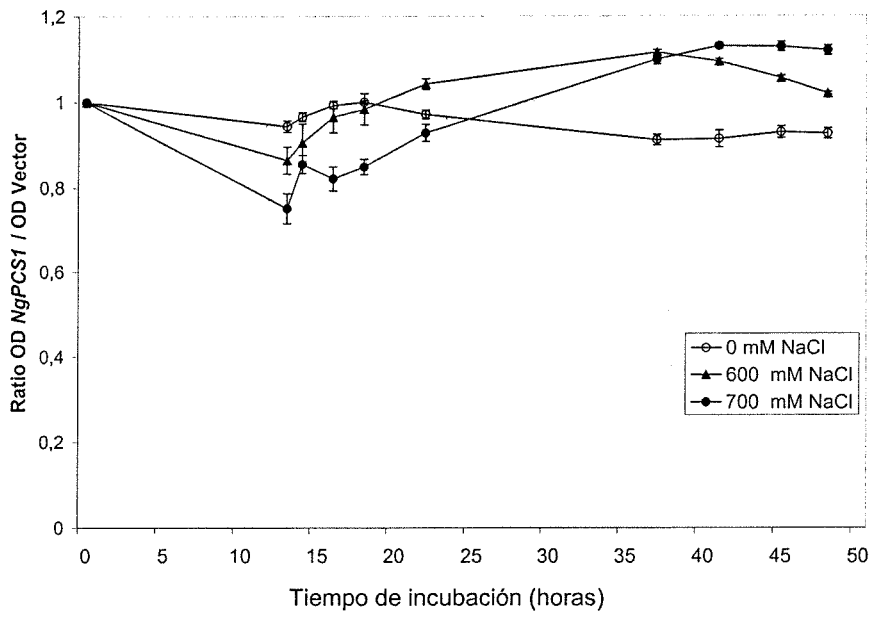


FIGURA 1 (continuación)

A



B



C

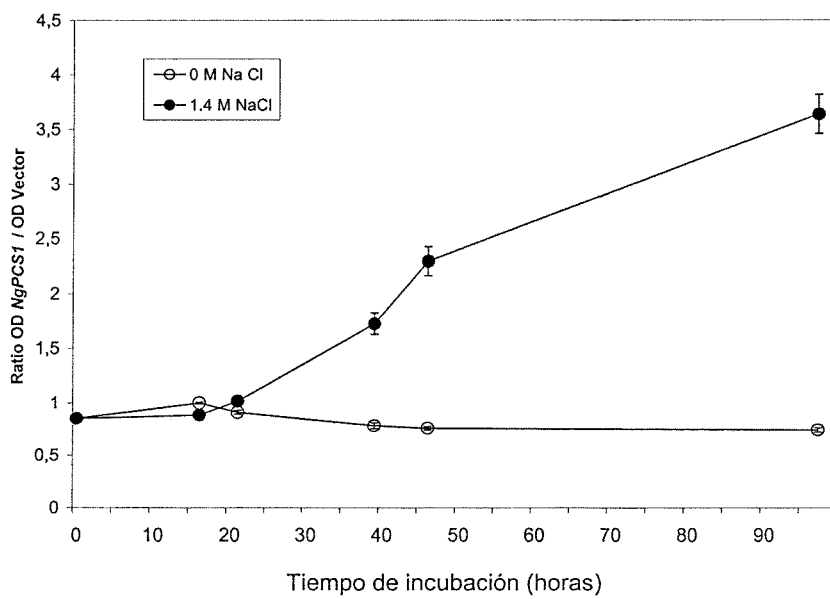
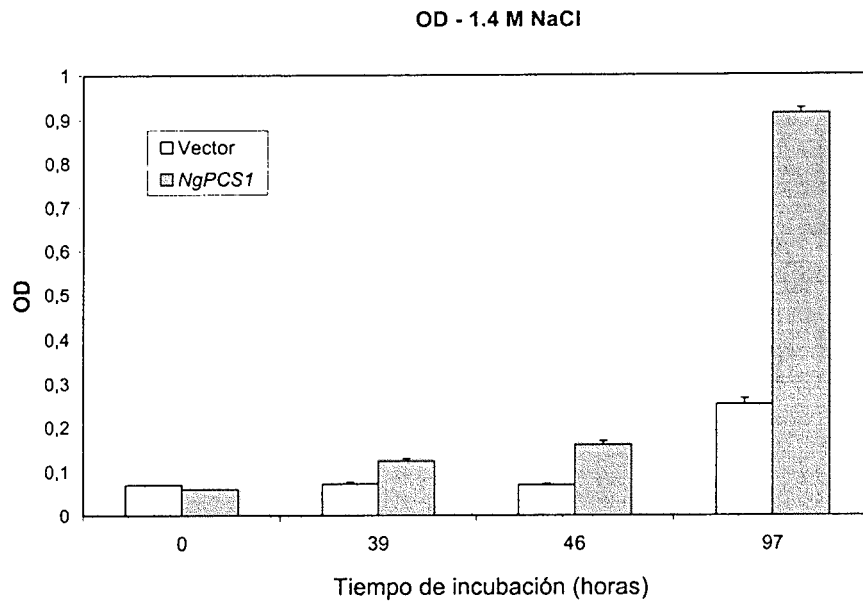


FIGURA 2

D



E

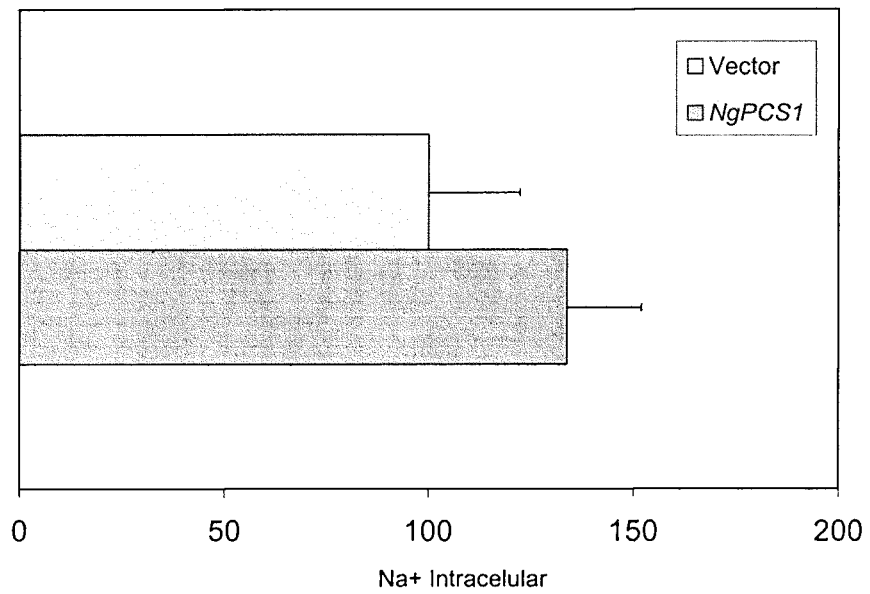


FIGURA 2 (continuación)

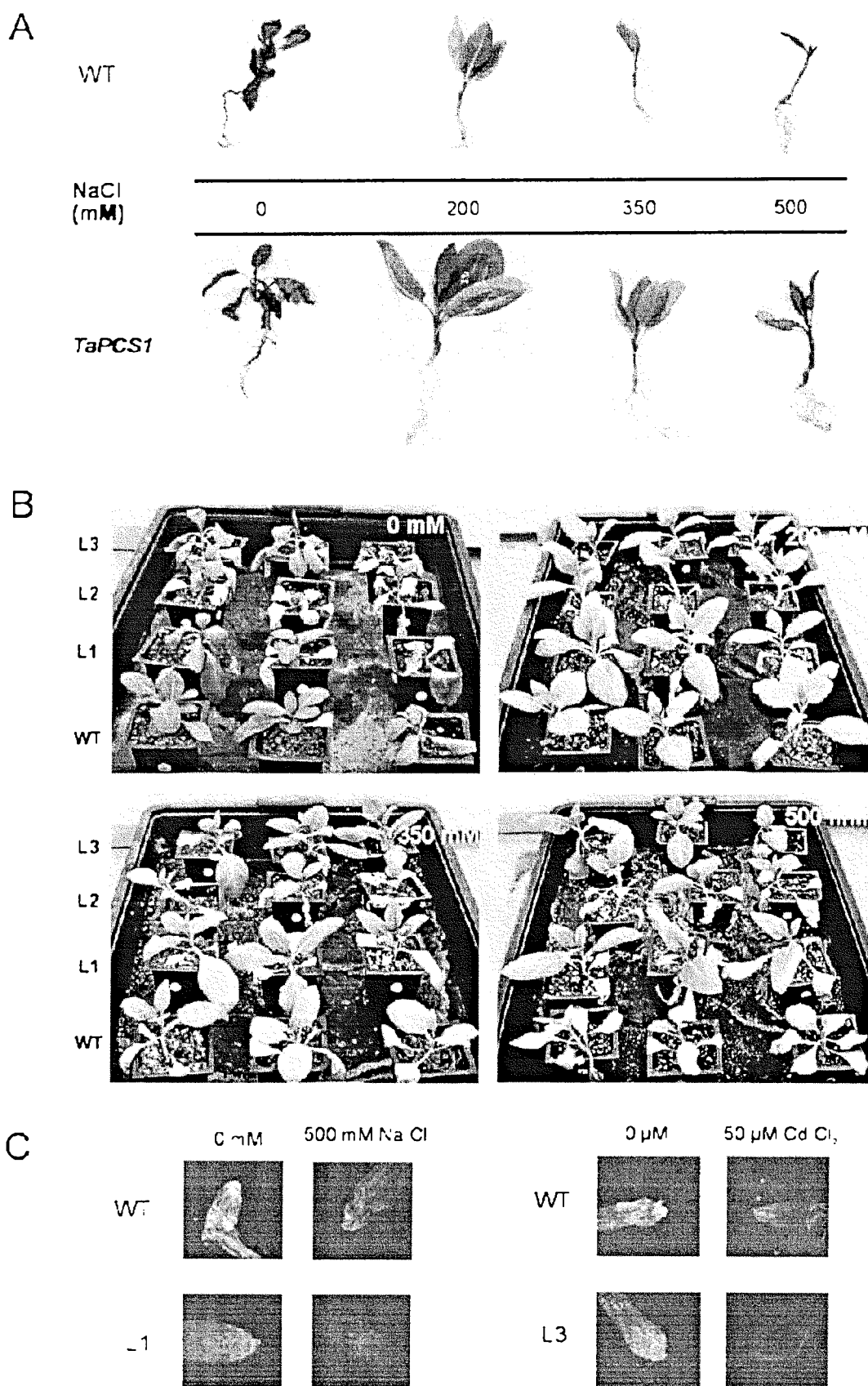


FIGURA 3

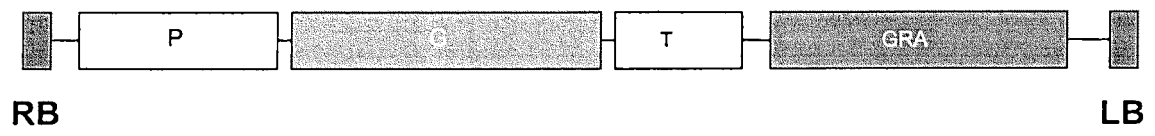


FIGURA 4

ES 2 336 173 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad Politécnica de Valencia

5 <120> Método para mejorar la tolerancia a la salinidad

<130> 222/07

10 <160> 4

<170> PatentIn version 3.4

15 <210> SEQ ID NO 1

<211> 1506

<212> DNA

<213> *Nicotiana glauca*

20

<400>

```
atggcgatgg cgggtttata tcggcgagtt cttccgtgcc ctccggctgt tgatttcgct 60
tctaccgaag gaaagcaact ttttttggag gccatccaga atggaacaat ggaaggattt 120
25 ttcaagttga tctcttattt tcagacacag tctgaaccgg cctattgtgg gttggctagc 180
ctttccatgg tcttgaatgc ccttgctatt gatccaggaa gaaaatggaa aggtccttgg 240
agatggttcg atgaatctat gttggactgt tgtgagcctt tggagaaggt taaagctaaa 300
gggatctctt ttgggaaaagt ggtatgtttg gctcactgtg caggagcgaa ggtggaagct 360
30 tttcgctcta atcatagtac tattgatgat tttcgtaaac aagtcatggc ctgcactact 420
agtgataatt gtcactctgat ctcatcatic catagaggcc tttttaaaca gacaggttcg 480
ggccactttt cacctattgg tggttatcac gcgggaaagg atatggcact gattctagat 540
gttgcgaggt ttaaataccc cctcactgg gttcccctcc ctctcctttg ggaagccatg 600
aacacaattg atgaagcacc aggattacat agggggttta tgctaatttc taagcttcac 660
35 cgagctcctg cactgctata taccctgagc tgtaaacatg agagttgggt cactatctca 720
aagcatttga tggatgatct tctgtcctg ttaagtctg agaatgtgaa gggcataaaa 780
gatgttctct cttctgttct ttcaaacta ccttcaaatt ttgttgaatt cataaagtgg 840
atagcagaag ttcgaaggca agaggagaat ggtcaaaatt tgagtgcga ggagaaagga 900
40 aggctagcta tcaaggaaga ggtattgaaa caagtgcagg aactcctct ttataagcat 960
gtcacaagca ttttattttc agaaaattct gtctgccagt caaatgcagc atcagacagc 1020
agtttggcta atgttgctgc aagcatttgc tgccaaggag caggtctttt tgcaggaaga 1080
tctggttcat cggatagggt ttgctgtcta caaacatgtg ttagatgcta cagagctacc 1140
ggggacaatt ctgctacagt ggtgtctggg acagttgtaa atggtaatgg ggagcagggg 1200
45 gttgatgttc tgggtccctac atctcaagta aagactagct gctgtccttc agggcaagat 1260
cgttgctcgc caatgcaccc tgcaagcaac gacgtgctga cagcactatt gctggcatta 1320
cctcaacata catggtctca aataaaaagat acaatggtct tgcaggaaat agagaacctt 1380
gtctcagcag agaacctgcc tcctttgctg caagaagaga ttttgcacct gcgaggcag 1440
50 ttctcctcc tcaagaaatg caaggataac aaggtagaag aagatttagc tgcacctccc 1500
ttctag
```

1506

<210> SEQ ID NO 2

55 <211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

60 <220>

<223> Cebador FW1

<400>

65

atggcgatgg cgggtttata tc

22

ES 2 336 173 A1

<210> SEQ ID NO 3
<211> 27
<212> DNA
5 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador FW2
10 <400>

ggatgccatg aacacgactg atgaagc 27
15

<210> SEQ ID NO 4
<211> 22
<212> DNA
20 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador RV1
25 <213> Artificial

<400>

ctagaaggga ggtgcagcta aa 22
30

<210> SEQ ID NO 5
<211> 22
35 <212> DNA

<220>
<223> Cebador RV2
40 <400>

caccctccta gttctttatt cc 22
45

<210> SEQ ID NO 6
<211> 22
<212> DNA
50 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador RV3
55 <400>

tftgcgactt tgaccgtgta tc 22
60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 336 173

② Nº de solicitud: 200702926

③ Fecha de presentación de la solicitud: 24.10.2007

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12N 15/54 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CLEMENS S. et al. Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. The EMBO Journal. 1999, Vol. 18, N° 12, páginas 3325-3333, todo el documento.	1-13
A	GISBERT C. et al. A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2003, Vol. 303, páginas 440-445 ISSN: 0006-291X/03, todo el documento.	1-13
A	WO 2004087861 A2 (NAVARRO AVIÑO, JUAN PEDRO) 14.10.2004, páginas 1-11.	1-13
A	TIAN L. et al. Overexpression AtNHX1 confers salt-tolerance of transgenic tall fescue. African Journal of Biotechnology. 02.06.2006, Vol. 5(11), páginas 1041-1044, todo el documento.	1-13
A	ES 2182621 B1 (UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA) 01.03.2003, páginas 2-4.	1-13

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

23.03.2010

Examinador

M. Cumbreño Galindo

Página

1/5

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

C12N

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, XPESP, BIOSIS, MEDLINE, NPL, EMBASE, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.03.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-13	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-13	SÍ
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como 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	Clemens S. et al. The EMBO Journal. Vol. 18, Nº 12, páginas 3325-3333	1999
D02	Gisbert C. et al. Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol. 303, páginas 440-445. ISSN: 0006-291X/03	2003
D03	WO 2004/087861 A2	14-10-2004
D04	Tian L. et al. African Journal of Biotechnology. Vol. 5 (11), páginas 1041-1044	02-06-2006
D05	ES 2182621 B1	01-03-2003

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 presente invención tiene por objeto la secuencia aislada que codifica para la fitoquelatina sintasa de *Nicotiana glauca* caracterizada por la SEQ ID NO 1, el vector que comprende la secuencia y el organismo modificado genéticamente que la contiene. También tiene por objeto el uso de dicha secuencia para mejorar la tolerancia a la salinidad y/o acumulación de sodio en organismos vivos y el método utilizado así como el uso de la SEQ ID NO 1 para reducir o eliminar sodio de un medio sólido, líquido o gaseoso, junto con el método empleado para ello.

D01 estudia, en plantas y levaduras, la tolerancia a los metales tóxicos atribuida a la familia de genes de las fitoquelatina sintasas. Así, es identificado el gen TaPCS1 de trigo, cuya expresión en *Saccharomyces cerevisiae* resulta en un espectacular incremento de la tolerancia al cadmio, y genes homólogos en *Arabidopsis thaliana*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Caenorhabditis elegans*.

D02 expone como la transformación de *Nicotiana glauca* con el gen de fitoquelatina sintasa de trigo incrementa su tolerancia a metales como el Pb o el Cd, pudiendo acumular el doble de concentración de los mismos en comparación con la variedad salvaje, lo que indica que puede constituir una nueva herramienta para su uso en fitorremediación.

D03 anticipa plantas modificadas genéticamente para la recuperación de suelos contaminados con metales pesados, mediante la introducción de genes que codifican enzimas completos o secuencias funcionalmente detoxificantes de gamma-glutamil cisteína sintasa, glutatión sintasa o fitoquelatina sintasa, o bien de genes que codifican enzimas y/o proteínas con elevado contenido de, al menos, uno de los aminoácidos siguientes: aminoácidos azufrados (cisteína, metionina) o aminoácidos con estructura de heterociclo (histidina, triptófano).

D04 habla del serio problema que supone la salinidad de la tierra y la necesidad de mejorar la tolerancia de las plantas a la sal. Para ello se transfiere el gen AtNHX1, que codifica para el transportador vacuolar Na⁺/H⁺ de *Arabidopsis thaliana*, a *Festuca arundinacea*, mediante bombardeo de partículas, observándose que las plantas transgénicas obtenidas poseen una mayor tolerancia a la sal.

D05 anticipa un procedimiento consistente en la utilización de los genes Atha3 de *Arabidopsis thaliana* para la obtención de plantas con control del desarrollo y tolerantes al estrés osmótico y salino. Para ello se construyen plantas transgénicas en las cuales se sobreexpresa Atha3, flavoproteína con actividad redox en procesos de óxido-reducción celular.

Hoja adicional

1. NOVEDAD

La secuencia SEQ ID NO 1 es nueva y, por tanto, las reivindicaciones de la 1 a la 13 cumplen con el requisito de novedad.

2. ACTIVIDAD INVENTIVA

En los documentos mencionados, se expone que la tolerancia a los metales pesados es atribuida a la familia de genes de las fitoquelatina sintasas y se menciona el uso de tales genes en la obtención de plantas transformadas que presentan una mayor tolerancia a metales como el Pb o el Cd.

Sin embargo, en la literatura consultada, constituida por documentos de patentes y por publicaciones científicas, no se ha encontrado la utilización de ninguna enzima de la familia de las fitoquelatina sintasas para mejorar la tolerancia a la salinidad y/o acumulación de sodio en organismos vivos o para reducir o eliminar sodio de un medio sólido, líquido o gaseoso, mediante la obtención de organismos modificados genéticamente con dicha secuencia.

Por consiguiente, las reivindicaciones de la 1 a la 13 presentan actividad inventiva.