

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 805**

21 Número de solicitud: 200300857

51 Int. Cl.:

**A01H 5/00** (2006.01)

**C12N 9/10** (2006.01)

**B09C 1/10** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**02.04.2003**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**20.03.2012**

Fecha de la concesión:

**26.04.2013**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**10.05.2013**

73 Titular/es:

**NAVARRO AVIÑO, Juan Pedro  
C/ JÁTIVA, 3 D-36  
46002 VALENCIA (Valencia) ES**

72 Inventor/es:

**NAVARRO AVIÑO, Juan Pedro**

74 Agente/Representante:

**URÍZAR LEYBA, José Antonio**

54 Título: **SELECCIÓN Y MODIFICACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS PARA FITORREMEDIACIÓN DE SUELOS Y MEDIOS ACUOSOS.**

57 Resumen:

Selección y modificación genética de plantas para fitorremediación de suelos y medios acuosos.

Se ha transformado por primera vez una especie vegetal confiriéndole importantes propiedades para la fitorremediación de suelos y medios acuosos; la especie *Nicotiana glauca* modificada genéticamente realiza dicha fitorremediación en períodos razonables de tiempo. Se introduce el gen TaPCS1, que codifica para una proteína con función fitoquelatina sintetasa. El gen de trigo introducido presenta un nivel de expresión permanentemente incrementado. Dichas plantas de *Nicotiana glauca* modificada constituyen una flora generalmente resistente a la climatología y edafología propias del medio, es muy competitiva en situaciones seudonormales de exceso de metales y resiste muy bien el estrés hídrico y nutricional.

Dicha planta mejorada genéticamente proporciona un crecimiento más rápido y posee una mayor biomasa que las plantas silvestres; también una superior capacidad de absorción de diversos metales. Es indicada para la fitorremediación de suelos y medios acuosos.

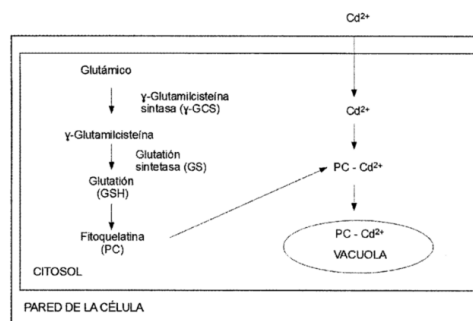


FIGURA 1

ES 2 376 805 B1

## DESCRIPCIÓN

Selección y modificación genética de plantas para fitorremediación de suelos y medios acuosos.

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a la puesta a punto de una Herramienta y un Método específico para la eliminación de metales y sustancias contaminantes de suelos y medios acuosos. Esta invención es de aplicación en la eliminación de metales y sustancias contaminantes de suelos y medios acuosos.

10

**Estado de la técnica**

Actualmente, el estado de la técnica provee formas alternativas de resolver el problema. Las más habituales son también las más costosas y se basan en métodos fundamentalmente químicos y físicos, como son: el confinamiento de los suelos contaminados con materiales inertes, la limpieza “*in situ*” con las máquinas y material químico adecuado, el almacenamiento de los suelos contaminados como residuos tóxicos en los lugares reglamentados para ello (con su correspondiente licencia), etc.

15

En Estados Unidos se han realizado experiencias de recuperación de suelos contaminados, utilizando plantas naturales del tipo del maíz, alfalfa, tomate, girasol, *Brassica juncea*, etc., y árboles principalmente sauce y chopo. La mayor parte de estas experiencias pioneras han sido realizadas por el ejército americano, movido por el deseo de recuperar suelos contaminados de los desechos metálicos que provocan las balas que se utilizan en las pruebas de tiro.

20

También se han realizado otro tipo de experiencias en New Jersey. Tales trabajos se han caracterizado por el desarrollo de un proceso más completo, es decir, se han analizado suelos, se han plantado los cultivos elegidos, incluso a veces se han utilizado enmendantes del suelo o sustancias quelantes. Posteriormente se han dejado crecer, y recolectar dichas plantas, para después analizar su contenido en metales. En estos dos casos, las técnicas utilizadas, han sido fundamentalmente: tratamiento de suelos contaminados, y regeneración por acumulación de metales en las plantas cultivadas. La “U.S. Environmental Protection Agency <<http://www.epa.gov>>”, también conocida como EPA, ha sido la institución pionera en el estudio de estos procesos de fitorremediación Junto con la empresa Phytotec <http://www.phytotech.com/index.html> que fue la encargada de realizar el mencionado proceso de recuperación de los suelos contaminados en New Jersey. En las experiencias en las que se ha tratado de recuperar munición, como la mencionada arriba, ha participado activamente el cuerpo de ingenieros del ejército americano (*Army Corps of Engineers*. <http://www.usace.army.mil/>>).

25

30

35

La mencionada empresa Phytotech es una de las pioneras en todo el mundo. La empresa española ELEONOR, aplica tecnologías de biorremediación patentadas por la compañía norteamericana ECS.

Algunos ejemplos de material vegetal utilizado:

40

- se han utilizado árboles híbridos de chopo para extraer níquel, cadmio y zinc de suelos contaminados (Universidad de Georgia, USA, “Savannah River Ecology Laboratory”).
- En el departamento de energía de Ashtabula, Ohio, se han utilizado plantas de girasol para remediación de suelos y aguas contaminados por uranio.

45

El estado de la técnica cristalizó en la presentación de algunas patentes que pueden ser representativas del estado de la técnica. Como por ejemplo:

50

- *Phytorecovery of metals using seedlings*. US 5,853,576 solicitada en 15 de agosto de 1997 Phytotech, Inc. (Monmouth Junction, NJ).
- *Method of using pelarogonium sp. as hyperaccumulators for remediating contaminated soil* US 6,313,374 solicitada en 4 de noviembre de 1988, Universidad de Guelph (Guelph, CA).
- *Methods for removing pollutants from contaminated soil materials with a fern plant* US 6302942, solicitada en 11 de abril de 2000, Universidad de Florida (Gainesville, FL).

55

60

Del estudio de las patentes expuestas se deduce que, fundamentalmente, su desarrollo tecnológico se ha centrado en procesos de biorremediación, sobre todo utilizando plantas hiperacumuladoras (aquellas que poseen una extraordinaria capacidad de absorción de metales, y de acumulación de su biomasa).

65

La fitorremediación consiste básicamente en el uso de plantas o de material vegetal, para descontaminar suelos con elevadas concentraciones de elementos nocivos. Recientemente se realizó una revisión acerca del tema por dos investigadores españoles, Garbisu, C.; Alkorta I. *Phytoextraction a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment*. *Bioresource Technology*, 77: 229-236, (2001).

Un par de referencias clave, por la importancia como precedente de los presentes trabajos realizados por el solicitante en fitorremediación son las siguientes:

- Chaney, R.L., Malik, M., Li, Y. M., Brown, S.L., Brewer, E.P., Angle, J.S., Baker, A.J.M., *Phytoremediation of soil metals*. Current Opinion in Biotechnology. 8: 279-284, (1997).
- Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I. *Phytoremediation*. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 49: 643-668, (1998).

Constituyen también precedentes los trabajos realizados con maíz y ambrosía que son dos especies que acumulan plomo. (Huang, J.W., Cunningham, S.D., *Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation*. New Phytologist. 1996, 134(1): 75-84. En cuanto al cadmio, *Salix viminalis*, *Thlaspi caerulescens* y *Alyssum murale* parecen ser las mejores especies según Greger M., Landberg T.: *Use of Willow in Phytoextraction*. International Journal of Phytoremediation, 1(2): 115-123, (1999).

En lo que se refiere a la biología molecular de absorción de metales, fundamentalmente se han trabajado las plantas del género de *Brassica*, y dentro de éste especialmente *Brassica juncea*. En estas plantas se han realizado transformaciones genéticas mediante técnicas de biotecnología. También se han realizado en otro tipo de variedades vegetales como chopo (*Populus nigra*) y por supuesto en *Arabidopsis*.

En cuanto a los genes que se han utilizado para descontaminar metales pesados, cabe distinguir básicamente tres familias: metalotioninas, fitoquelatinas, y genes que regulan los procesos de oxidación-reducción. Se debe destacar el trabajo pionero realizado con genes bacterianos especializados en la absorción de mercurio, que marcó un hito en este campo: Rugh, C.L., Wilde, H.D., Stack, N.M., Thompson, D.M., Summers, A.O., Meagher, R.B.: *Mercuric ion reduction and resistance in transgenic Arabidopsis thaliana plants expressing a modified bacterial merA gene*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93: 3182-3187, (1996). Este trabajo es interesante porque es de los avances pioneros en la utilización de genes que son capaces de incrementar la acumulación de metales en bacterias y plantas. Aunque en su crítica hay que decir que la volatilización aunque sea diluida no puede plantearse como un medio útil de descontaminación.

Los trabajos más importantes en este campo, aparte del anterior mencionado, han sido los realizados por Schroeder, Rea, y Therry. Schroeder estudió por primera vez la enzima producida por el gen *TaPCSI*, que es una fitoquelatina de trigo, Clemens S., Eugene J. Kim, Neumann D., Schroeder J.I.: *Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatase synthases from plants and yeast*. EMBO Journal, 18 (12): 3325-3333, (1999). A. Rea clonó la fitoquelatina homóloga de *Arabidopsis*, Vatamaniuk, G.K., Mari, S., Yu-Ping Lu, Rea, P.A.: *AtPCSI, a phytochelatase synthase from Arabidopsis: isolation and in vitro reconstitution*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96: 7110-7115, (1999). Norman Terry transformó la *Brassica juncea* con genes que incrementan la absorción de metales, Zhu, Y.L., Pilon E.A.H., Tarun, A.S., Weber S.U., Jouanin L., Norman T.: *Cadmium Tolerance and Accumulation in Indian Mustard Is Enhanced by Overexpressing  $\gamma$ -Glutamylcysteine Synthetase*. Plant Physiology, 121: 1169-1177, (1999).

Sin embargo, aunque los trabajos realizados indican en principio la posibilidad de absorber metales con diferentes especies de plantas, éstas adolecen de la limitación que las plantas que absorben metales hasta un contenido específico alto de metales (plantas hiperacumuladoras), no obstante, presentan una baja biomasa con lo cual la cantidad total de metal absorbido por individuo es baja.

La presente invención viene a resolver este problema con un nuevo enfoque en la selección y modificación genética de plantas para su uso en fitorremediación.

## 50 Descripción de la invención

### Introducción

Cuando un lugar se presenta contaminado con metales pesados, puede ser el origen de un serio problema de salud ambiental e incluso salud humana. Los metales pueden pasar a disolverse en el agua presente en ríos o acuíferos cercanos, y también pueden ser absorbidos por plantas o árboles, dando lugar a su entrada en la cadena alimenticia. Incluso, no ocurriendo ninguno de estos dos procesos, el metal puede estar accesible a cualquier ser vivo que accidentalmente manipule las aguas o suelos contaminados. A veces, se produce un problema tan grave de contaminación (como el ocurrido con la empresa Bolidén, en la región Aznalcollar en el año 99), que los metales arrasan la flora y fauna que encuentran a su paso. La presente invención resuelve un problema técnico que consiste en la manipulación de esos lugares contaminados, bien para que no sean un peligro para el medio ambiente, bien para que sean devueltos a su estado natural antes de ser contaminados.

La presente invención proporciona un procedimiento para descontaminar un medio de crecimiento contaminado con metales, utilizando individuos de la especie *Nicotiana glauca* modificada genéticamente por inclusión del gen *TaPCSI*, durante un período de tiempo suficiente para que los metales sean absorbidos por las raíces y acumulados en los distintos tejidos de la planta (raíz, tallo, hojas). Siendo los metales de un grupo consistente en plomo, arsénico, cadmio, cobre, mercurio, hierro, cromo, níquel y cinc, y otros.

Las técnicas que utilizan plantas hiperacumuladoras tienen el gran inconveniente de que estas plantas poseen unas características que las desaconsejan como solución, a saber: baja biomasa, adaptación a un hábitat muy concreto, normalmente sólo acumulan un metal específico mientras no resisten un conjunto de metales diversos, y tienen un ciclo de vida corto. Lo que se busca en realidad, es que las plantas absorban el metal contaminante (o el conjunto de metales contaminantes), y que lo transporten a las partes recolectables de la misma. Posteriormente se cosecharía este material y se dispondría convenientemente o se quemaría (también se podría estudiar otras alternativas).

En el estado actual de la técnica, como se ha mencionado previamente, se han elegido otro tipo de plantas distintas de las hiperacumuladoras, entre ellas cabe destacar sobre todo *Brassica juncea*. Después, sobre estas plantas se han introducido genes que capacitan a una mejor respuesta de la misma. En general, la utilización de la biotecnología para solucionar ese tipo de problemas de contaminación, tiene la clara desventaja del enorme consumo de tiempo que se necesita para resolver el problema, y que además el proceso de descontaminación se ha de realizar casi siempre *in situ*. No obstante, la fitorremediación (disciplinas que utilizan material vegetal para descontaminar lugares contaminados), es siempre un procedimiento mucho menos costoso en dinero.

En la patente actual, se consigue mejorar el estado de la técnica previo. Así la especie *Nicotiana glauca* se caracteriza por:

- Poder adaptarse a diferentes climatologías y edafologías.
- Ser muy competitiva (crece como “malas hierbas”) en situaciones “normales” y de exceso de metales.
- Estar adaptada a suelos de bajo contenido nutricional y acuoso (resiste *estrés hídrico y nutricional*).
- Su capacidad es mejorada mediante modificación genética. Se ha introducido un gen de trigo, cuyo nivel de expresión está permanentemente incrementado. El resultado es una mayor capacidad de absorción de metales pesados, como Pb, Cd, etc.

El punto uno significa que una de las ventajas de la planta utilizada es que puede sobrevivir habitualmente en extensas áreas geográficas del mundo. Así por ejemplo, aunque es originaria de la parte sur y central del continente americano, se extiende también por todo Estados Unidos y Canadá, todo el continente australiano, y parte de Europa y Japón. Además, esta planta se reproduce por esquejes, se replica con facilidad en el campo, provee abundantes semillas, tiene capacidad para ahuyentar animales (lo cual es una garantía de su dificultad para entrar la cadena alimenticia), se utiliza como planta ornamental en Estados Unidos y Canadá, y todo esto junto con las consabidas características beneficiosas para fitorremediación como son: profundo sistema radicular, alta biomasa, y adaptación a suelos nutritivamente bajos y de elevada contaminación por metales pesados. Existe aún otra ventaja adicional, no despreciable, y es que la tecnología de transformación de genes a especies vegetales está circunscrita a un grupo reducido de plantas, pues bien de entre ellas la especie que los investigadores más han trabajado por razones económicas es *Nicotiana tabacum*. Por tanto, la *Nicotiana glauca*, podría beneficiarse de parte del acervo científico tecnológico que se ha desarrollado para *Nicotiana tabacum*.

Además de la importancia que tiene la especie vegetal que ha sido escogida para ser biotecnológicamente modificada, hay que destacar la importancia del gen que se ha transferido. El gen *TaPCSI*, fue estudiado en profundidad demostrando una gran especialización y rendimiento en la absorción de plomo y cadmio en *levadura* (utilizada como sistema modelo). Fue la primera fitoquelatina que se estudió, y pertenece a una especie vegetal que se cultiva habitualmente en el exterior de los laboratorios (no ocurre igual con *Arabidopsis*), lo que pudiera significar una mejor capacidad de adaptación al medio externo. Este gen no había sido *nunca transformado en planta* previamente, de ahí la *novedad e importancia práctica* de este hecho.

La importancia del papel jugado por las Fitoquelatinas en la detoxificación y homeostasis de metales pesados, es objeto de discusión. Recientes trabajos han vertido alguna luz sobre la base molecular de este proceso. Entre algunos científicos ha surgido una opinión que claramente contradice la hipótesis del papel relevante de las fitoquelatinas en la detoxificación y homeostasis de metales pesados.

Así, por la presente solicitud, se consigue mejorar el estado de la técnica previo. La *Nicotiana glauca* modificada genéticamente por un lado aúna las propiedades atractivas de la especie silvestre como el ser muy competitiva pues crece como “malas hierbas” y está adaptada a suelos de *bajo contenido* nutricional y acuoso (resiste el *estrés hídrico y nutricional*); y por el otro su capacidad es significativamente mejorada mediante la modificación genética. El nivel de expresión del gen de trigo introducido *TaPCSI* está permanentemente incrementado. El resultado es una mayor capacidad de absorción de metales pesados, como Pb, Cd, y otros

#### *La fitorremediación y la unión péptido-metal*

En las últimas décadas la preocupación por el medio ambiente global en la Tierra ha tenido como consecuencia un mayor impulso en la investigación sobre descontaminación. La fitorremediación es una tecnología que ha venido emergiendo con fuerza, siendo de bajo costo, utiliza plantas para eliminar, estabilizar o transformar tóxicos químicos localizados en las aguas, sedimentos o tierra.

Antes de la presente invención algunos trabajos afirmaban que las fitoquelatinas (PCs) no eran el camino adecuado a seguir en la biotecnología de la fitorremediación. Los estudios fisiológicos indican que esa tolerancia a los metales pesados es uno de los requisitos previos para conseguir la hiperacumulación de metales pesados en plantas Krämer U., Smith R.D., Wenzel W., Raskin I., Salt D.E.: *The role of metal transport and metal tolerance in nickel hyperaccumulation by *Thlaspi goesingense** Hálácsy. *Plant Physiology*, 115: 1641-1650, (1997); Raskin I., Smith R.D., Salt D.E.: *Phytoremediation of metals: Using plants to remove pollutants from the environment*. *Current Opinion in Biotechnology*, 8(2):221-226, (1997). La fitorremediación de metales pesados muy probablemente requiere el desarrollo por ingeniería genética de la tolerancia a metales pesados en especies salvajes (silvestres) seleccionadas, que sean de crecimiento rápido, de biomasa alta, y tolerantes a una amplia variedad de condiciones ambientales. Los organismos vivos han desarrollado procesos moleculares que permiten a las células la capacidad de detoxificar los metales pesados (en rangos determinados de concentración). En células eucarióticas, estos mecanismos incluyen principalmente el secuestro y la quelación por ligandos específicos. Entre esta clase de moléculas la mayor parte del interés de los investigadores se ha enfocado en los años pasados en dos tipos de ellas: las metalotioninas y las fitoquelatinas.

Las metalotioninas son proteínas de bajo peso molecular y polipéptidos de contenido sumamente alto en azufre y metales, Kagi J.H., Schaffer A.: *Biochemistry of metallothionein*. *Biochemistry*, 27: 8509-8515, (1998). Las fitoquelatinas (PCs) son péptidos tiolados con la estructura primaria ( $\gamma$ -Glu-Cys) $_n$ -Gly-, (donde  $n = 2-11$ ) que se sintetizan a partir del glutatión no traduccionalmente, Grill, E., Löffler S., Winnacker E.L., Zenk M.H.: *Phytochelatin, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific  $\gamma$ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase)*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 86: 6838-6842, (1989). Las PCs han sido identificadas en una amplia variedad de especies de plantas incluyendo monocotiledóneas, di-cotiledóneas, gimnospermas y algas, Rauser W.E.: *Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin and metallothioneins*. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 31: 19-48, (1999).

*El glutatión es un sustrato de la fitoquelatina-sintetasa*

Las fitoquelatinas (PCs) son sintetizadas desde el glutatión (GSH). El GSH es sintetizado en una vía de dos pasos (Figura 1) catalizado por la  $\gamma$ -glutamylcisteina sintetasa ( $\gamma$ -GCS, por las siglas de su expresión inglesa, *Glutamylcysteine Synthetase*) y la glutatión sintetasa (GS, por las siglas de su expresión inglesa, *Glutathion synthetasa*); que requiere energía ya que ambos son enzimas ATP-dependientes. El nivel de GSH disminuye cuando hay inducción de PCs en cultivos celulares de planta, y la exposición de plantas enteras o cultivos celulares de planta a un inhibidor de la biosíntesis del GSH, la butionina sulfoximina (BSO, por las siglas de su expresión inglesa, *buthionine sulfoximine*), también inhibe la inducción de las PCs y/o confiere la hipersensibilidad frente a iones metálicos. Además, en cultivos celulares los efectos de la BSO pueden ser invertidos por la adición del GSH, evidenciando una marcada interacción entre GSH y la regulación de la biosíntesis de la fitoquelatinas. De lo anterior consideramos hay dos aspectos esenciales para interpretar el papel de la fitoquelatinas en la tolerancia a metales pesados en plantas:

- 1) En presencia de metales la concentración de PCs incrementa y como el GSH es precursor, sería lógico que su nivel baje, porque se está consumiendo para producir PCs.
- 2) En presencia de un inhibidor de la síntesis de GSH se produce una mayor sensibilidad a los metales.

Por tanto ambos resultados debieran indicar el papel relevante de las PCs y una relación determinante con el GSH en presencia de metales.

*El papel clave de las PCs en la tolerancia a metales pesados está en tela de juicio Argumentos negativos*

¿Cuál es el papel jugado por las PCs en la tolerancia y acumulación de metales pesados (MPs)? ¿Son las PCs instrumentos esenciales en la ingeniería de la fitorremediación? ¿Desempeñan un papel básico en plantas que emergen más tolerantes por selección natural bajo la presión de los metales pesados (MPs)? Los avances recientes más significativos en el entendimiento del papel general desempeñado por las PCs vienen de estudios genéticos moleculares que usan diferentes plantas y sistemas modelo de hongos. Sobre todo por los trabajos que se refieren a la tolerancia diferencial a metales pesados observada entre plantas seleccionadas de tipo silvestre, es decir, ecotipos resistentes y sensibles.

Existen estudios previos en la producción de fitoquelatina en respuesta a Cd y Cu que parecen indicar que las PCs no son responsables de la tolerancia a metales pesados aunque las PCs en efecto están implicadas en el proceso de detoxificación. Esta afirmación descansa sobre el hecho que los ápices de raíz de plantas tolerantes a Cd de la especie *Silene vulgaris* exhiben un ratio inferior en la producción de PCs y esto va acompañado por un ratio inferior en la síntesis que produce el alargamiento de las cadenas de fitoquelatina que el ratio de aquellas plantas sensibles a Cd de *Silene vulgaris*, véase De Knecht J.A., van Dillen JA, M., Koevoets P.L.M., Schat H., Verkleij J.A.C., Ernst W.H.O.: *Phytochelatin in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. Chain length distribution and sulphide incorporation*. *Plant Physiology*, 104: 255-261, (1994). En cuanto a su papel en plantas seleccionadas que han aumentado la acumulación de metales pesados (MPs), algunos investigadores creen que la investigación en plantas de *Silene vulgaris* tolerantes extraídas de vertederos de cobre indica que las PCs no son responsables del desarrollo de fenotipos tolerantes a los metales pesados (MPs). Se fundamentan en el hecho que los complejos de Cd y Cu desaparecen de las

raíces en cultivos acuosos de *Silene vulgaris* entre 7 y 14 días después de la exposición a MPs. Aunque la unión de los iones de los MPs a las PCs existe, ésta parece desempeñar sólo un papel pasajero en el mecanismo de detoxificación de MPs en esta especie de planta, Leopold I., Günther D., Schmidt J., Neumann D.: *Phytochelatinases and heavy metal tolerance*. *Phytochemistry*, 50: 1323-1328, (1999). Conclusiones similares han sido descritas para la planta hiperacumuladora *Thlaspi caerulescens* y la no acumuladora relacionada *T. arvense*. Los niveles de PCs totales encontrados en la planta hiperacumuladora eran generalmente inferiores a los de la no acumuladora, a pesar de las concentraciones proporcionalmente más altas de MPs. Sin embargo otra vez, y de modo similar a *Silene vulgaris*, las PCs fueron producidas por ambas especies en respuesta a Cd, y los niveles de PC mostraron una correlación similar positiva con la concentración de Cd determinada en hoja y tejidos de raíz, Ebbs S., Lau I., Ahne B., Kochian L.: *Phytochelatin synthesis is not responsible for Cd tolerance in the Zn/Cd hyperaccumulator Thlaspi caerulescens*. *Planta*, 214: 635-640, (2002).

¿Cuáles son las bases moleculares de la regulación enzimática de las PCs en esta ausencia aparente de importancia en la tolerancia a MPs? Aunque las plantas de *Silene vulgaris* tolerantes a Cd produzcan tres veces menos PCs que las sensibles a Cd, cuando ambas especies se exponen al suministro externo de Cd, ni la actividad de las PC sintetasa, ni la degradación de las PCs explican la diferencia en concentración, De Knecht J.A., van Baren N., ten Bookum W.M., Wong F S. H.W., Koevoets P.L.M., Schat H., Verkleij J.A.C.: *Synthesis and degradation of phytochelatinases in cadmium sensitive and cadmium-tolerant Silene vulgaris*. *Plant Science*, 106: 9-18, (1995).

Por lo tanto, todas estas pruebas pueden sugerir una carencia de importancia para el papel de PCs en *Silene vulgaris* y *Thlaspi caerulescens* respecto a la tolerancia a Cd. Por consiguiente, de toda esta información algunos investigadores han concluido que la síntesis diferencial de PCs *no está implicada* en la producción de la tolerancia diferencial a MPs. Sin embargo el solicitante considera que también se puede argumentar que la concentración de PCs es tres veces *más alta* en las plantas de *Silene vulgaris* que son sensibles a Cd, respecto a las plantas que son tolerantes después del suministro de Cd externo, por lo tanto si las PCs realmente desempeñan un papel fundamental o no en estas plantas sensibles debería ser evaluado con más profundidad.

Muy recientemente ha sido presentado un conjunto de evidencias contra el posible papel central de las PCs en la detoxificación de los MPs. Cuando el gen *PCS* (*AtPCS1*) de *Arabidopsis thaliana* fue sobreexpresado con el objetivo de aumentar la síntesis de PCs y por lo tanto la acumulación de MPs, las líneas transgénicas mostraron paradójicamente hipersensibilidad frente al Cd. Sin embargo, esta hipersensibilidad desapareció cuando el GSH fue suplementado en el medio. Por consiguiente, se argumenta que la hipersensibilidad a Cd parece ser debida a la toxicidad de las PCs, cuando se encuentran en niveles por encima del umbral óptimo comparando con los niveles de GSH, véase Lee S., Moon J.S., Ko T.S., Petras D., Goldsbrough P.B., Korban S.S.: *Overexpression of Arabidopsis phytochelatin synthase paradoxically leads to hypersensitivity to cadmium stress*. *Plant Physiology*, 131: 656-663, (2003). Los resultados anteriores fueron interpretados por sus autores como un supuesto respaldo a la opinión que las *fitoquelatinas no poseen* un papel relevante en la detoxificación de los MPs.

Sin embargo, el estrés oxidativo juega un papel crucial en la mayoría de los estreses, pues no hay que olvidar que el GSH regula el balance oxidativo en el interior de la célula. Por tanto, la elección de la especie a modificar en la presente invención ha sido esencial para el buen resultado obtenido, precisamente porque al ser la *Nicotiana glauca* una planta muy vigorosa, capaz de vivir en ambientes extremos, sus niveles de GSH son *elevados*, lo que permite que la gran demanda de GSH sea cumplimentada y por tanto las PCs *confieran* una gran capacidad de acumulación de metales pesados.

#### Argumentos positivos

Los primeros argumentos en pro del papel de PCs provienen de dos hechos básicos: las células de las plantas cuando se exponen a los metales pesados acumulan rápidamente PCs y la producción de PCs es activada por los iones de MPs, véase Grill, S. Loeffler, E.L. Winnacker, M.H. Zenk. *Phytochelatinases, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific  $\gamma$ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase)*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86: 6838-6842, (1989). Cuando la actividad de la enzima parcialmente purificada fue determinada "*in vitro*", la enzima era activa sólo en la presencia de iones de MPs (siendo el Cd el mejor activador). Cuando la actividad fue determinada "*in vivo*" (tanto en plantas intactas como en cultivos celulares de planta), los MPs también indujeron la biosíntesis de las PCs, véase Rauser W.E.: *Phytochelatinases and related peptides*. *Plant Physiology*, 109:1141-1149, (1995). La carencia y la restauración de la función han sido también una fuente importante de pruebas. Por ejemplo, se han descrito mutantes de *Saccharomyces pombe* y en *Arabidopsis thaliana* deficientes en PCs que son hipersensibles a Cd. Además, el gen *AtPCS1* era capaz de suprimir el fenotipo de sensibilidad a Cd en la levadura de cerveza, véase Vatamaniuk O.K., Mari S., Lu Y.P., Rea P.A.: *AtPCS1, a phytochelatin synthase from Arabidopsis: isolation and in vitro reconstitution*. *Proceedings at the National Academy of Science USA*, 96: 7110-7115, (1999).

Las evidencias más fuertes provienen sin embargo, de un cDNA de trigo, *TaPCS1*, cuya expresión en *S. cerevisiae* causa un aumento dramático de la tolerancia a Cd, Clemens S.S., Kim E.J., Neumann D., Schroeder J.I.: *Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast*. *The EMBO Journal*, 18: 3325-3333, (1999). Este trabajo demostró que la expresión de *TaPCS1* condujo a un aumento en la acumulación Cd<sup>+2</sup> dentro de las células de levadura hasta en concentraciones que no afectan el crecimiento. Y lo que es más importante este grupo demostró que la expresión heteróloga de genes que producen síntesis de PCs es suficiente para conferir la

tolerancia incrementada a los MPs. Realizando ensayos de crecimiento con células de *S. cerevisiae* que expresan el gen *AtPCS1* y el gen *SpPCS* (homólogo de *S. pombe*), demuestran que la síntesis de PCs por sí sola puede *aumentar considerablemente* la tolerancia celular al Cd.

5 Interesantemente, cuando las raíces de trigo fueron investigadas para la expresión de *TaPCS1*, los experimentos empleando RT-PCR indicaron que esta expresión de la enzima fitoquelatina sintasa (PCS) es constitutiva y realizada por Cd, consecuente con la actividad relacionada constitutiva de PCS, véanse Grill E., Loeffler S., Winnacker E.L., Zenk M.H.: *Phytochelatin, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific  $\gamma$ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase)*. Proceedings at the National Academy of Science USA, 86: 6838-6842 (1989), y en raíces y tallos, véase Chen J.J., Zhou J.M., Goldsbrough P.B.: *Characterization of phytochelatin synthase from tomato*. Physiologia Plantarum, 101:165-172, (1997), y coherente con la exigencia sugerida para estos organismos tolerantes de expresar genes de tolerancia a los metales pesados constitutivamente, véase Zenk M.H.: *Heavy metal detoxification in higher plants - a review*. Gene, 179: 21-30, (1996). Por lo que concluimos que la actividad de las fitoquelatinas (PCs) es *regulada* transcripcional y post-transcripcionalmente por los MPs.

15 *Las PCs son instrumentos básicos en la tolerancia a los metales pesados, al menos en algunos organismos*

Un juego de evidencias ha cuestionado el papel desempeñado por las PCs en la detoxificación de MPs. La tolerancia diferencial de Cd en *S. vulgaris* en los ecotipos tolerante y sensible no es afectada por la producción de PC diferencial en sí. La tolerancia a Cd aumentada no resulta de una acumulación aumentada de PCs, ni de una síntesis más rápida de PCs más largas (formándose complejos más estables que las formas de cadenas más cortas), o de una incorporación aumentada del azufre en complejos de PC-Cd en las raíces (que probablemente aumenta la estabilidad y la cantidad potencial de metal unido por unidad de PC-GSH). Sin embargo, las plantas tolerantes alcanzan la misma concentración de PCs que las plantas sensibles cuando se exponen a concentraciones más altas de Cd. Ya que la diferencia entre las cantidades de PCs inducidas no está causada por una diferencia en la actividad específica de la PCS, ni por el ratio de rotura de las PCs, la diferencia podría resultar entonces de una concentración inferior de Cd en el citosol causada por un *transporte más rápido* de los complejos PC-Cd a la vacuola o que el ión Cd en sí mismo es transportado vía la actividad de anti portador del tonoplasto, véase Salt D.E., Wagner G.J.: *Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a  $Cd^{2+}/H^{+}$  antiport activity*. The Journal of Biological Chemistry, 268:12297-12302, (1993). Los mismos argumentos podrían explicar probablemente las concentraciones de PCs similares para *T. caerulescens* y *T. arvensis*. Sin embargo es interesante notar que el acumulador *T. caerulescens* produce un gradiente positivo de Cd a través de la planta de raíces a hojas (1000-3000 ppm) mientras *T. arvensis* desarrolla un gradiente más alto pero negativo Cd (7500-1000 ppm). Por consiguiente, y siguiendo el mismo patrón de acumulación en ambas especies de *Thlaspi*, los niveles de Cd y los niveles de PCs en el tallo son más altos en valores absolutos para *T. caerulescens*, y en consecuencia las PCS muestran un menor grado de saturación para este ecotipo en hojas. Consistentemente, en este tejido una proporción más alta de Cd por subunidades de  $\gamma$ -GluCys ha sido observada para *T. caerulescens* como si el Cd fuera preferentemente *secuestrado* como complejos de peso molecular alto, véase Ebbs, I. Lau, B. Ahner, L. Kochian: *Phytochelatin synthesis is not responsible for Cd tolerance in the Zn/Cd hyperaccumulator Thlaspi caerulescens*. Planta, 214: 635-640, (2002). Aunque estos argumentos pudieran servir también para entender la hipersensibilidad relacionada por la sobreexpresión *AtPCS1* en *Arabidopsis*, estas pruebas son claramente contradictorias con trabajos antes relatados, véase también Vatamaniuk O.K., Mari S., Lu Y.P., Rea, P.A.: *AtPCS1, a phytochelatin synthase from Arabidopsis: isolation and in vitro reconstitution*. Proceedings of the National Academy of Science USA, 96: 7110-7115, (1999); y Clemens S.S., Kim E.J., Neumann D., Schroeder J.I.: *Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast*. The EMBO Journal, 18: 3325-3333, (1999). Quizás, interacciones no específicas proteína-proteína u otras interacciones desconocidas causadas por la modificación de la región de C-terminal *AtPCS1* por indicativo epítipo (DYKDDDL) usada para el reconocimiento de proteína, podría contribuir a la hipersensibilidad observada a Cd en líneas que sobreexpresan el gen *AtPCS1*, véase Lee S., Moon J.S., Ko T.S., Petros., D., Goldsbrough P.B., Korban S.S.: *Overexpression of Arabidopsis phytochelatin synthase paradoxically leads to hypersensitivity to cadmium stress*. Plant Physiology, 131: 656-663, (2003). El dominio C-terminal claramente tiene algún papel en la actividad PCS ya que el mutante cad 1-5 sintetiza un polipéptido truncado que carece de nueve de los 10 residuos Cys en esta esfera de C-terminal, produciendo un fenotipo alterado. Es probable que este dominio actúe como un sensor local *ligando* iones pesados metálicos (por lo visto vía múltiples residuos Cys, pero posiblemente también los otros) y poniéndolos en contacto con el sitio de activación catalítica, véase Cobbett, C.S., *Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification*. Plant Physiology, 123: 825-832, (2000).

55 Por lo tanto, una interferencia posible negativa de la región C-terminal de *AtPCS1* con la homeostasis de las PCs no debería ser desechada. Más allá de la explicación posible de esta hipersensibilidad a Cd, los hechos son que después de la adición de una fitoquelatina específica de planta sintetizada por medios químicos y, lo que es más importante después de la expresión de *AtPCS1* en células mamíferas, las células transfectadas exhibieron una producción de las PCs específicas de la planta y resistencia más alta a  $Cd^{+2}$  según informan Takagi M., Satofuka H., Amano S., Mizuno H., Eguchi Y., Hirata K., Miyamoto K., Fukui K., Imanaka T.: *Cellular toxicity of cadmium ions and their detoxification by heavy metal-specific plant peptides, phytochelatin, expressed in mammalian cells*. Journal of Biochemistry, 131: 233-239, (2003). Se conoce que las células mamíferas no pueden sintetizar las PCs debido a su carencia de PCS.

65 En los trabajos publicados sobre todo por Clemens, S., Kim E.J., Neumann D., Schroeder J.I.: *Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast*. EMBO Journal, 18: 3325-3333, (1999); así como por Takagi M., Satofuka H., Amano S., Mizuno H., Eguchi Y., Hirata K., Miyamoto K., Fukui K., Imanaka T.: *Cellular toxicity of cadmium ions and their detoxification by heavy metal-specific plant peptides, phytochelatin,*

*expressed in mammalian cells*. Journal of Biochemistry, 131: 233-239, (2002) se demuestra sin lugar a dudas que la expresión de la fitoquelatina sintetasa produce un beneficio en la descontaminación de metales pesados, tanto en levadura como en células de mamíferos.

5 Muy recientemente, resultados preliminares del solicitante, Gisbert, Navarro J.P. *et al.*, trabajo aún no publicado (2003) han indicado que la sobreexpresión del gen *TaPCS1* en individuos de la planta *N. glauca* modificada aumentaría la tolerancia al Cd y además conllevaría su acumulación. El crecimiento de las raíces fue mejorado drásticamente (cerca de 160%) y las hojas fueron más altas y verdes en presencia de 0.8 mM de plomo y 50  $\mu$ M de Cd en estas plantas transformadas. El gen *TaPCS1* transformó las plantas de *N. glauca*, las que luego de su modificación son capaces de un crecimiento en tierras mineras con un contenido de metales tan alto como 1572 ppm de plomo y 2602 ppm de Zn. Se aumentó más de dos veces el nivel de plomo que pueden tolerar en comparación con el de las plantas del tipo silvestre. La expresión incrementada de *TaPCS1* activó un transporte de plomo más alto al tejido de la raíz (alrededor de 200% de acumulación) y a las partes aéreas (cerca de 150%). Además los investigadores consideran partiendo de estos resultados preliminares que esta mejora de la tolerancia al metal podría ser un primer paso hacia el diseño de hiperacumulación en esta especie de plantas de alta biomasa y rápido crecimiento. Estos hechos pueden indicar que las fitoquelatinas presentan un papel de relevancia fisiológica y ecológica en esta especie de plantas y otros organismos más allá del papel manifiesto de las fitoquelatinas en la detoxificación de los metales pesados.

### Descripción de las figuras

20 La Figura 1 muestra la biosíntesis y función de las fitoquelatinas (PCs). El glutatión (GSH) es un sustrato para la fitoquelatina sintetasa (PCS). El cadmio (Cd) es un efector positivo de la  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetasa ( $\gamma$ -GCS) y de la Fitoquelatina sintetasa (PCS). El  $\gamma$ -GCS es un enzima regulado negativamente por GSH. El Cd es un regulador positivo de la glutatión sintetasa (GS). La fitoquelatina se une al Cd y forma un complejo PC-Cd<sup>2+</sup>. La Figura representa en la parte izquierda la síntesis de las fitoquelatinas a partir del ácido glutámico, mientras en la parte derecha de la figura se observa la entrada de cadmio, su unión a las fitoquelatinas, y la posterior entrada del complejo en la vacuola.

### Resultados obtenidos y Ventajas aportadas

30 El procedimiento propuesto utiliza la especie *Nicotiana glauca* modificada genéticamente con la inclusión del gen *TaPCS1*.

35 Como se ha dicho anteriormente, la presente invención proporciona un procedimiento para descontaminar un medio de crecimiento contaminado con metales, siendo dichos metales cadmio, litio, arsénico, cobre, cromo, plata, zinc, plomo, mercurio, níquel, cobalto, estaño, rutenio, rodio, iridio, polonio, cesio, boro, osmio, niobio, tantalio, oro, antimonio, bismuto, indio, escandio, titanio, zirconio, platino, tecnecio, renio, lantánidos y actínidos, mediante el uso de una planta, la *Nicotiana glauca* modificada genéticamente por inclusión del gen *TaPCS1*, durante un período de tiempo suficiente para que los metales sean absorbidos por las raíces y acumulados en los distintos tejidos de la planta (raíz, tallo, hojas).

### Un modo preferente de realización de la invención

#### *Introducción del gen TAPCS1*

45 Se usó para la transformación el vector Ti pBI121 (Clontech). El gen GUS del vector binario se reemplazó con el cDNA de la fitoquelatina sintetasa de trigo (*TaPCS1*, Número de Acceso AF093752) para conseguir la nueva construcción pBITaPCS1. El cDNA del gen *TaPCS1* (cedido por Julian Schroeder, Universidad de California, San Diego) se recibió en pYES2 (Invitrogen) y se designó como pYESTaPCS1. El plásmido se digirió con Xho I y se convirtió extremos romos con la DNA polimerasa I (fragmento Klenow). Después, pYESTaPCS1 se digirió con Bam HI para producir un fragmento de 2 Kb conteniendo el cDNA del gen *TaPCS1* cDNA. PBI121 se digirió con BamH I y ECL136 II. El inserto de 2 Kb se ligó en los sitios BamH I-Ecl136 II del plásmido. La nueva construcción (pBITaPCS1) se electroporó en una cepa de *Agrobacterium tumefaciens*, C58C1 Rif<sup>R</sup> Rif, véase Larebeke N. Van, Engler G., Holsters M., Van Den Elsacker, S., Zaenen I., Schipleroort R.A., Schell, J.: *Large plasmid in Agrobacterium tumefaciens essential for crown gall inducing ability*. Nature, 252: 169-170, (1974).

#### *Crecimiento de las plantas*

60 Los explantes de hoja de *Nicotiana glauca* se infectaron con *A. tumefaciens* después de dos días de cultivo en medio organogénico NB2510 [sales MS (Murashige y Skoog, 1962) incluyendo vitaminas Gamborg B5 (DUCHEFA), 3% sacarosa, 2.5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> Naftaleno acético (NAA), 1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> 6 bencil aminopurina (BA) 0.8% agar (Agar bacteriológico "Europeo" PRONADISA)] en la oscuridad. Los explantes de hojas adultas y jóvenes fueron infectados por inmersión en cultivo de *Agrobacterium* durante 10 minutos. Después de un día de cocultivación los explantes se transfirieron a un medio selectivo NB2510 conteniendo 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de kanamicina y carbenicilina (350  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>). Dos meses después de la infección, las plantas fueron individualmente extraídas de los explantes y transferidas a botes conteniendo 30 ml de medio B1 (sales MS incluyendo vitaminas Gamborg B5, 0,3  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de ácido indol acético de 0.2  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> NAA, 1% sacarosa, 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, 0.7% agar).



**Sumario**

Por la presente invención se ha logrado:

- 5      1)    La modificación genética de la especie *N. glauca* por inclusión del gen *TaPCS1* para realizar la descontaminación de suelos y medios acuosos en períodos razonables de tiempo.
- 10     2)    Que la especie *N. glauca* modificada presente un nivel de expresión del gen de trigo introducido *TaPCS1* que está permanentemente incrementado
- 15     3)    Transformar por primera vez una especie vegetal con valiosas propiedades de fitorremediación de suelos y medios acuosos contaminados por metales; especie la que adicionalmente es muy competitiva y resiste el estrés hídrico y nutricional.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

5 1. Una planta modificada genéticamente para la fitorremediación de suelos terrestres y medios acuosos contami-  
nados con metales pesados siendo dichos metales contaminantes, cadmio, litio, arsénico, cobre, cromo, plata, zinc,  
plomo, mercurio, níquel, cobalto, estaño, rutenio, rodio, iridio, polonio, cesio, boro, osmio, niobio, tantalio, oro, an-  
timonio, bismuto, indio, escandio, titanio, zirconio, platino, tecnecio, renio, lantánidos y actínidos, caracterizada por  
que para su modificación se elige la planta *Nicotiana glauca* y se introduce el gen *TaPCS1*, que codifica para una  
proteína con función fitoquelatina sintetasa.

10 2. Procedimiento de modificación genética de una planta de *Nicotiana glauca* de la reivindicación 1, **caracterizado**  
por que el gen *TaPCS1* se introduce del modo siguiente

- Se usa para la transformación el vector Ti pBI121 (Clontech).
- El gen GUS del vector binario se reemplaza con el cDNA de la fitoquelatina sintetasa de trigo (*TaPCS1*,  
Número de Acceso AF093752) para conseguir la nueva construcción pBITaPCS1.
- El cDNA del gen se designó como pYESTaPCS1.
- El plásmido se digiere con Xho I y se convierte en extremos romos con la DNA polimerasa I (fragmento  
Klenow).
- Después, pYESTaPCS1 se digiere con Bam HI para producir un fragmento de 2 Kb conteniendo el cDNA  
del gen *TaPCS1* cDNA. PBI121 se digiere con BamH I y Ecl136 II.
- El inserto de 2 Kb se liga en los sitios BamH I-Ecl136 II del plásmido.
- La nueva construcción (pBITaPCS1) se electropora en una cepa de *Agrobacterium tumefaciens*, C58C1Rif<sup>R</sup>  
Rif (Van Larebeke *et al.* 1974).
- Los explantes de hoja de *Nicotiana glauca* se infectan con *A. tumefaciens* después de dos días de cultivo  
en medio organogénico NB2510 [sales MS (Murashige y Skoog, 1962) incluyendo vitaminas Gamborg  
B5 (DUCHEFA), 3% sacarosa, 2,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Naftaleno acético (NAA), 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  6 bencil aminopurina  
(BA) 0,8% agar (Agar bacteriológico "Europeo" PRONADISA)] en la oscuridad.
- Los explantes de hojas adultas y jóvenes se infectan por inmersión en cultivo de *Agrobacterium* durante  
10 minutos. Después un día de cocultivación los explantes se transfirieren a un medio selectivo NB2510  
conteniendo 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de kanamicina y carbenicilina (350  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Dos meses después de la infección,  
las plantas fueron individualmente extraídas de los explantes y transferidas a botes conteniendo 30 ml de  
medio B1 (sales MS incluyendo vitaminas Gamborg B5, 0,3  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ácido indol acético de 0,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$   
NAA, 1% sacarosa, 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 0,7% agar).

45 3. Planta de la especie *Nicotiana glauca* modificada genéticamente mediante la introducción del gen de trigo  
*TaPCS1* según la reivindicación 2 que se usa para la fitorremediación de suelos terrestres y medios acuosos contami-  
nados con metales.

50 4. Procedimiento para la fitorremediación de suelos terrestres y medios acuosos, contaminados con metales que  
emplea la especie *Nicotiana glauca* modificada genéticamente según la reivindicación 2 para la absorción de los  
metales cadmio, litio, arsénico, cobre, cromo, plata, zinc, plomo, mercurio, níquel, cobalto, estaño, rutenio, rodio,  
iridio, polonio, cesio, boro, osmio, niobio, tantalio, oro, antimonio, bismuto, indio, escandio, titanio, zirconio, platino,  
tecnecio, renio, lantánidos y actínidos.

55

60

65

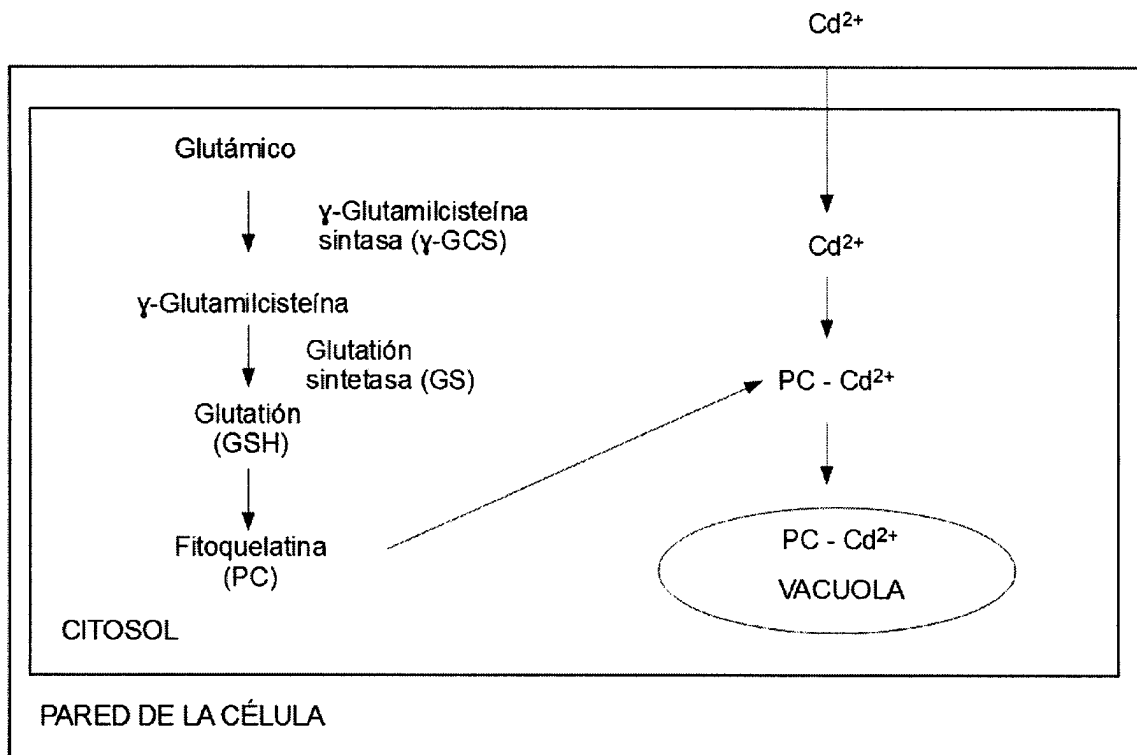


FIGURA 1



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200300857

②② Fecha de presentación de la solicitud: 02.04.2003

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	WO 2000071695 A1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 30.11.2000, todo el documento.	1-4
Y	SATHIYAMOORTHY, P., VAN DAMME, P., OVEN, M., GOLAN-GOLDHIRSH, A. Heavy metals in medicinal and fodder plants of the Negev desert. Journal of Environmental Science and Health - Part A Environmental Science and Engineering and Toxic and Hazardous Substance Control. Septiembre 1997, Vol. 32, Nº 8, páginas 2111-2123. ISSN 1077-1204.	1-4
A	US 6455761 B1 (HELSINKI UNIVERSITY LICENSING LTD.) 24.09.2002, columnas 1-4; ejemplo 1.	2
A	RODRIGUEZ-GARCÍA, C. M., VILAINE, F., ROBAGLIA, C. Transferencia del gen SK/2 de levadura al tabaco. Agrociencia 2002, Vol. 36, páginas 675-681.	2
A	MASON, H. S., BALL, J. M., SHI, J.-J., et al. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Mayo 1996, Vol. 93, Nº 11, páginas 5335-5340. ISSN 0027-8424. <Doi:10.1073/pnas.93.11.5335>	2

#### 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  
01.03.2012

Examinador  
E. Relaño Reyes

Página  
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A01H5/00** (2006.01)

**C12N9/10** (2006.01)

**B09C1/10** (2006.01)

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

A01H, C12N, B09C

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

INVENES, EPODOC, TXTE, MEDLLINE, BIOSIS, NPL, XPESP