

REPÚBLICA DE COLOMBIA



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-147166-00000-0000

Fecha: 2011-10-31 15:01:58 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 50

PATENTE DE INVENCION

EXPEDIENTE No. _____

Contiene los documentos relativos a la solicitud de Patente de:

Título: MÉTODO DE RECUPERACIÓN DE ESPACIOS
DEGRADADOS MEDIANTE USO DE
ESPECIES VEGETALES GENÉTICAMENTE
MODIFICADAS.

Solicitantes: JUAN PEDRO NAVARRO AVIÑÓ.

De: VALENCIA, ESPAÑA.

Apoderado: MAURICIO JARAMILLO C.

Bogotá, D.C., Octubre de 2011

PETITO		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO	
			
		No. 11-147166-00000-0000	
		Fecha: 2011-10-31 15:01:58 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR	
		Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI	
		Act. 411 PRESENTACION Folios: 50	
FORMULARIO UNICO DE PCT			
ENTRADA EN FASE NACIONAL			
1 SOLICITUD DE :			
☒ Patente de Invención.		☐ Patente de Modelo de Utilidad	
☒ Capitulo I		☐ Capitulo II	
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: JUAN PEDRO NAVARRO AVIÑÓ Dirección: Xativá 3, Piso 11, Planta 36, E-46002 Teléfono: Fax: E-Mail: Domicilio: Valencia, España	IDENTIFICACION C.C. NIT C.E. Otro Número	
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: MAURICIO JARAMILLO CAMPUZANO Dirección: Calle 67 No. 7 - 35 Oficina 1204 Bogotá D.C., Colombia Teléfono: 3192900 Fax: 3210295 E-Mail: mjaramillo@gpzlegal.com	IDENTIFICACIÓN C.C. X NIT C.E. Otro Número 80.421.942 TP 74.555	
4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre: JUAN PEDRO NAVARRO AVIÑÓ Dirección: Xativá 3, Piso 11, Planta 36, E-46002 Domicilio: Valencia, España	C.C. NIT.	
5 PCT (86) Solicitud internacional No.: PCT/ES2009/070080 Fecha: 30/03/2009 Publicación Internacional No.: WO/2010/112622 Fecha: 07/10/2010			
6 TITULO (54): MÉTODO DE RECUPERACIÓN DE ESPACIOS DEGRADADOS MEDIANTE USO DE ESPECIES VEGETALES GENÉTICAMENTE MODIFICADAS			
7 Clasificación Internacional (51): B09C 1/10 (2006.01), A01H 5/00 (2006.01)			
8 Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☐ NO ☒			
9 Comprobante de pago No. Fecha:			

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional (resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☒ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional. De conformidad con la Regla 92bis 1. Se adjunta el documento correspondiente.

11 FIGURA CARACTERÍSTICA

12 Solicito la concesión de la patente

Nombre: MAURICIO JARAMILLO CAMPUZANO

Firma:

C.C. 80.421.942 de Usaquén T.P. 74.555 C.S.Jra.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN ☐ Patente de Invención ☐ Patente modelo de utilidad ☒ PCT
(21) No. de solicitud:	(51) Int. Cl: B09C 1/10 (2006.01), A01H 5/00 (2006.01)
(22) Fecha de solicitud: 31/10/2011	(71) Solicitante(s): JUAN PEDRO NAVARRO AVIÑO
(30) Prioridad:	(72) Inventor(es): JUAN PEDRO NAVARRO AVIÑO
(31) No. Prioridad:	
(32) Fecha:	
(33) Pais:	(74) Apoderado(s): MAURICIO JARAMILLO CAMPUZANO
(54) Título: MÉTODO DE RECUPERACIÓN DE ESPACIOS DEGRADADOS MEDIANTE USO DE ESPECIES VEGETALES GENÉTICAMENTE MODIFICADAS	
Las casillas identificadas con 85, 86 y 87 sólo aplican para PCT	
(85) Fecha límite inicio Fase Nacional: 30/10/2011	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha: PCT/ES2009/070080 No. de solicitud PCT: 30/03/2009	(87) Publicación internacional Fecha: WO/2010/112622 No. Publicación: 07/10/2010
Resumen reivindicación (es): La invención se refiere a la búsqueda, selección y modificación genética de especies vegetales silvestres, más aún consiste en la definición del efecto de la introducción de varios genes en las propiedades para la fitorremediación de las especies vegetales modelo <i>Populus tremula x tremuloides</i> cv. <i>Etropole</i> proposed para terrenos húmedos, y <i>Nicotiana glauca</i> para terrenos secos. Las especies de partida usadas para la modificación genética son del tipo silvestre (wt), seleccionadas entre espacios contaminados específicos. La modificación genética de la especie <i>Populus tremula x tremuloides</i> cv. <i>Etropole</i> consiste en la introducción de los genes <i>TAPCS1</i> y <i>AtPCS1</i> , y del gen <i>YCF</i> en una segunda etapa. La modificación genética de la <i>Nicotiana glauca</i> consiste en la introducción de los genes <i>TaPCS1</i> e <i>YCF</i> ; o de los genes <i>TaPCS1</i> , <i>YCF1</i> y <i>CBP4</i> . La modificación aumenta la producción de biomasa; y al mismo tiempo la tolerancia a los elementos pesados o radiactivos de diferente toxicidad; a los detergentes industriales y domésticos; aumenta la tolerancia a los derrames de petróleo crudos y solventes hidrocarbonados, o a los productos de la refinación de petróleo, ligeros, medios o pesados; aumenta la fitorremediación de espacios contaminados con iones sodio en condiciones de aguas salobres, infiltraciones de agua de mar en los suelos; las especies propuestas aumentan la tolerancia a las enfermedades de las especies vegetales; y a la baja humedad y altas temperaturas ambientales de los espacios desérticos.	

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intellectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/112622 A1

(43) Fecha de publicación internacional
7 de octubre de 2010 (07.10.2010)

PCT

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
B09C 1/10 (2006.01) A01H 5/00 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2009/070080

(22) Fecha de presentación internacional:
30 de marzo de 2009 (30.03.2009)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): ABBA GAIA, S.L. [ES/ES]; Parque Tecnológico, Av. Benjamín Franklin, 12, E-46980 Paterna (Valencia) (ES).

(72) Inventor; e

(75) Inventor/Solicitante (para US solamente): Navarro Avliñó, Juan Pedro [ES/ES]; Xátiva 3, Piso 11, Planta 36, E-46002 Valencia (ES).

(74) Mandatario: MOLINERO ZOFIO, Félix; PTW International Inc, Doctor Ulecia 8, local, 28224 Pozuelo de Alarcón (Madrid) (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE,

AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con reivindicaciones modificadas (Art. 19(1))

WO 2010/112622 A1

(54) Title: METHOD FOR RECOVERING DEGRADED AREAS USING GENETICALLY MODIFIED PLANT SPECIES

(54) Título : MÉTODO DE RECUPERACIÓN DE ESPACIOS DEGRADADOS MEDIANTE USO DE ESPECIES VEGETALES GENÉTICAMENTE MODIFICADAS

(57) Abstract: The present invention relates to the search for and choice of forest plants adapted to severe edaphological conditions in soils contaminated by pollutants, which plants are capable of surviving in most parts of the world and cannot enter the trophic chain. The genetic transformation thereof considerably enhances the metal absorption rate and storage capacity thereof and also makes it easier for said absorption to cover the majority of pollutants or harmful substances.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a la búsqueda y elección de vegetales silvestres adaptados a condiciones edafológicas severas en suelos contaminados por elementos contaminantes, que tengan capacidad de sobrevivir en la mayor parte del mundo y que no puedan entrar en la cadena trófica. Su transformación genética aumenta considerablemente su capacidad de almacenamiento y velocidad de absorción de metales, así como favorece que dicha absorción abarque la mayoría de los elementos contaminantes o nocivos.

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT**NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE**(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

MOLINERO ZOFIO, Félix
PTW International Inc,
Doctor Ulecia 8, local
28224 Pozueie de Alarcón (Madrid)
ESPAGNE

Date of mailing (day/month/year) 21 September 2011 (21.09.2011)	
Applicant's or agent's file reference PCT329 A-G	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/ES2009/070080	International filing date (day/month/year) 30 March 2009 (30.03.2009)

1. The following indications appeared on record concerning: ☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative										
Name and Address ABBA GAIA, S.L. Parque Tecnológico Av. Benjamín Franklin, 12 E-46980 Paterna (Valencia) Spain	State of Nationality ES	State of Residence ES								
	Telephone No.									
	Facsimile No.									
	E-mail address									
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: ☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence										
Name and Address NAVARRO AVIÑÓ, Juan Pedro Xàtiva 3 , Piso 11, Planta 36 E-46002 Valencia Spain	State of Nationality ES	State of Residence ES								
	Telephone No.									
	Facsimile No.									
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized									
3. Further observations, if necessary: The applicant identified in Box 1 has been deleted from the records. The person identified in Box 2, remain as sole applicant and inventor for all designated states.										
4. A copy of this notification has been sent to: <table border="0"><tr><td>☐ the receiving Office</td><td>☐ the International Preliminary Examining Authority</td></tr><tr><td>☐ the International Searching Authority</td><td>☒ the designated Offices concerned</td></tr><tr><td>☐ the Authority(ies) specified for supplementary search</td><td>☐ the elected Offices concerned</td></tr><tr><td></td><td>☐ other:</td></tr></table>			☐ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority	☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned	☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned		☐ other:
☐ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority									
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned									
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned									
	☐ other:									

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Mena Ana e-mail pt09.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 09
---	--

Facsimile No. +41 22 338 71 30

Form PCT/IB/306 (January 2009)

1/T6QGR7G40

**MÉTODO DE FITORREMEDIACIÓN DE ESPACIOS DEGRADADOS
MEDIANTE USO DE ESPECIES VEGETALES GENÉTICAMENTE MODIFICADAS**

5

Descripción

SECTOR DE LA TÉCNICA

10

La presente invención se refiere a la búsqueda y selección de especies vegetales silvestres adaptados a condiciones edafológicas severas en suelos contaminados por elementos contaminantes, que tengan capacidad de sobrevivir en la mayor parte del mundo y que no puedan entrar en la cadena trófica. Su transformación genética aumenta considerablemente su capacidad de almacenamiento y velocidad de absorción de metales y sustancias tóxicas, así como favorece que dicha absorción abarque la mayoría de los elementos contaminantes o nocivos.

15

El método de dichas transformaciones pertenece a la Biotecnología y se puede definir como el conjunto de técnicas que modifican organismos vivos, (o parte de los mismos), transforman sustancias de origen orgánico o utilizan procesos biológicos para producir un nuevo conocimiento, desarrollar productos y servicios.

20

OBJETO DE LA INVENCION

25

Un primer objeto general de la invención es definir el efecto de la introducción de varios genes sobre las propiedades de dos especies vegetales distintas, empleando como modelos la *Populus tremula x tremuloides* cv. *Etropole* y la *Nicotiana glauca*.

30

Un segundo objeto general de la invención es definir el efecto de la introducción de tres genes sobre las propiedades de una especie vegetal, empleando como modelo la *Nicotiana glauca*.

Un tercer objeto particular de la invención consiste en definir el efecto de la modificación genética sobre el aumento de la biomasa desarrollada por dos especies vegetales distintas empleando como modelos dichas *Populus tremula x tremuloides* cv. *Etropole* y *Nicotiana glauca*.

35

Un cuarto objeto particular de la invención consiste en definir el efecto de la modificación genética sobre la capacidad de acumulación de metales empleando como modelos estas especies vegetales, *Populus tremula x tremuloides* cv. *Etropole* y *Nicotiana glauca*

40

Un quinto objeto particular de la invención consiste en definir el efecto de la modificación genética con tres genes sobre la capacidad de acumulación de sustancias tóxicas y de su eliminación del medio ambiente, empleando como modelo la especie vegetal *Nicotiana glauca*.

Un sexto objeto particular de la presente invención consiste en desarrollar métodos de modificación genética de especies vegetales, y su uso en la fitorremediación de suelos contaminados.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La revolución industrial ha conllevado unas consecuencias perjudiciales para el medio ambiente por la acumulación de elementos contaminantes en el suelo, agua y atmósfera. El suelo, al ser el más estable de estos medios, permite que los contaminantes permanezcan más tiempo en el medio y que no puedan ser degradados durante un periodo de tiempo muy largo, y por tanto, que sea una acumulación progresiva que ocasione en primer lugar la disminución de la biodiversidad y la ausencia inicial de vegetación, además de la transferencia de estos elementos a otros medios como el aire y agua, contaminando tanto las aguas superficiales como subterráneas y entrar de esta forma en la cadena alimentaria. No obstante, observamos que existe una gran diversidad de especies vegetales adaptadas a estas circunstancias mediante un proceso de transformación genética a lo largo del tiempo, llegando incluso a colonizar estos suelos contaminados. Estas especies vegetales son conocidas como metalofitas, son las que han sufrido transformaciones genéticas para poder vivir en estos suelos. Por su especialización para vivir en estos ambientes contaminados, con unos minerales concretos, en áreas y condiciones edáficas concretas, hace que estas especies tengan muy difícil su supervivencia en otros lugares, y si añadimos a sus condiciones de supervivencia el clima, aumenta la dificultad para poder desarrollarlas en otras latitudes.

El uso de especies vegetales para eliminar o acumular contaminantes nocivos para el medio ambiente es lo que conocemos como fitorremediación, que se define como la utilización de especies vegetales para llevar a cabo acciones de eliminación o transformación de contaminantes.

Las técnicas que se han empleado hasta el presente para la descontaminación de suelos consisten básicamente en el aislamiento del terreno o en su descontaminación.

Las técnicas de aislamiento que evitan que la contaminación se propague se basan en almacenarlos en vertederos apropiados, sellarlos *in situ* o destruirlos. Las técnicas de descontaminación y por lo tanto de recuperación del suelo son:

- Extracción de los elementos contaminantes
- Tratamiento químico.
- Tratamiento electroquímico.

Se tratan de procedimientos muy caros y poco efectivos. Igualmente el:

- Tratamiento térmico, y
- Tratamiento microbiológico,.

Todos estos procedimientos anteriores, son muy caros y de dudosa eficacia. Las especies vegetales que se han empleado en fitorremediación, por otro lado, tienen un carácter muy

selectivo, es decir, solo acumulan uno o dos metales, su biomasa es muy baja, lo que les permite una baja capacidad de almacenamiento. Crecen en zonas muy determinadas y poseen unas raíces cortas, que es por donde absorben estos metales, por lo que su absorción es muy superficial.

5

La patente US005364451, *Phytoremediation of metals*, trata de un proceso para eliminar iones metálicos y describe métodos para realizar este propósito. La patente WO 0028093, *Recovering metals from soil*, se refiere a la recuperación de metales, tales como el níquel y cobalto, mediante fitorremediación o fitoextracción de suelos ricos en metales. Pero la fitorremediación sigue siendo
10 lenta, pues estas especies desarrollan muy poca biomasa y por lo tanto, poca capacidad de almacenamiento. Además, poseen un ciclo de vida corto, circunstancias que llegan a poner en duda la fitorremediación de terrenos. El mayor problema de estas especies vegetales hiperacumuladoras es que generan poca biomasa, por lo que aunque acumulen mucho en porcentajes relativos a su peso, no tienen capacidad de almacenamiento, por tanto, la cantidad de
15 metal extraído es pequeña. Además suelen tener un ciclo de vida muy corto y sólo crecen en zonas muy delimitadas. El problema no resuelto hasta la fecha es la eliminación de elementos contaminantes de una manera eficaz, es decir, en tiempos de uno a dos años y no en tiempos mayores de 150/200 años, que es lo que se consigue con las llamadas plantas hiperacumuladoras, es decir, una disminución en el tiempo de cien veces, supondría la mejor solución para eliminar
20 elementos contaminantes del suelo.

La presente invención para solucionar el problema de la fitorremediación acude a las herramientas de la Biotecnología, utilizando organismos naturales ya modificados genéticamente, porque no existen plantas naturales capaces de ser útiles en problemas graves de contaminación. Es decir,
25 propone la idea de la superplanta mediante una selección natural realizando múltiples escrutinios en lugares muy contaminados en busca de las especies más adecuadas para su supervivencia en esos entornos, las cuales a continuación se someten a la modificación genética.

Por lo cual, representa interés el desarrollo de un método perfeccionado para la obtención de
30 especies vegetales de alto rendimiento que brinden un mayor aumento de la biomasa en terrenos degradados conjuntamente con una superior resistencia frente al estrés que comporta la presencia de diversas sustancias contaminantes.

35 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

OBTENCION DE ESPECIES NATURALMENTE ACLIMATADAS A TERRENOS CONTAMINADOS.

La presente invención resuelve este problema mediante la búsqueda y selección de especies
40 vegetales silvestres adaptadas a condiciones edafológicas severas en suelos contaminados, es decir, que ya han sufrido una transformación genética natural y se han adaptado a esas condiciones, y dentro de estas especies, las que no tengan posibilidad de entrar en la cadena alimentaria. Otra condición exigida es su capacidad para adaptar su crecimiento a una gran

variedad climatológica a fin de conseguir una especie vegetal que pueda crecer con diferentes condiciones climatológicas. Este método se ha extendido también a suelos muy húmedos, seleccionando en este caso una especie arbórea. El estudio se ha realizado para un primer caso con las especies las especies *Populus tremula x tremuloides* cv. *Etropole* y *Nicotiana glauca*.

5

MODIFICACIÓN CON DOS GENES DE LAS ESPECIES VEGETALES MODELO *POPULUS TREMULA X TREMULOIDES* CV. *ETROPOLE* Y *NICOTIANA GLAUCA*

Se ha realizado una transformación genética para aumentar considerablemente la capacidad de almacenamiento de los elementos contaminantes y la velocidad de absorción de dichos elementos. Los elementos o mezcla de los mismos que se pueden eliminar los hemos clasificado en dos grandes grupos; nocivos y no nocivos. Dentro de los nocivos, con estas especies vegetales se pueden eliminar metales pesados como plomo, cadmio, mercurio, plata, boro, aluminio, hierro, manganeso, cobre, níquel y cromo. Elementos radiactivos como uranio, rodio, torio y plutonio, y elementos no nocivos como sodio, magnesio, litio, potasio, calcio...

15

El método de fitorremediación de espacios degradados mediante uso de especies vegetales genéticamente modificadas consiste en una serie de pasos que lo caracterizan. Se trata, en primer lugar, de estudiar (para hacer una selección que cumpla una serie de requisitos), las especies vegetales que tengan capacidad de adaptación climatológica y edafológica. Para ello hemos definido y clasificado una serie de suelos contaminados.

20

Entendemos por suelo contaminado a todo aquel cuyas características físicas, químicas o biológicas han sido alteradas negativamente por la presencia de componentes de carácter peligroso de origen humano, en concentraciones tales que comporten un riesgo para la salud humana o el medio ambiente. Se han sacado una serie de muestras de suelos contaminados en zonas mineras, industriales y fluviales. Posteriormente se han analizado sus características y estudiado también las especies que sobrevivían en dichos suelos, desde diferentes puntos de vista; morfológico, rechazo alimentario de los animales a dichas especies vegetales, adaptabilidad ambiental y edafológica.

25

30

MODIFICACIÓN ULTERIOR CON TRES GENES DE LA ESPECIE VEGETAL MODELO *NICOTIANA GLAUCA*

Para un análisis ulterior, la presente invención para la fitorremediación intensificada de espacios degradados o contaminados por iones de metales y otras sustancias tóxicas, se ha centrado en la familia *Nicotiana*, y en particular en la especie *Nicotiana glauca* como especie representativa de dicha familia ya que posee una serie de características que la hacen un substrato ideal para la fitorremediación de cualquier contaminante, desde pesticidas a hidrocarburos, pasando por cualquier contaminación imaginable. Estas son:

40

- Raíces profundas lo que permite descontaminar una profundidad considerable.
- Gran biomasa, lo que ayuda a producir una gran acumulación en valores absolutos.
- Extensión geográfica muy amplia.

- Repelente a los animales e insectos.
 - Necesidades hídricas y nutritivas muy bajas - se encuentra en todo tipo de terreno bajo en estas características.
 - Facilidad de replicación - se reproduce con suma facilidad.
- 5 - Se reproduce por esquejes - lo que facilita su utilización práctica.
- Es un arbusto que permite su poda.
 - Posee un ciclo de vida no muy corto, con lo que agiliza su trabajo de recolección de tejidos contaminados.
 - Un tratamiento biotecnológico factible.

10

Posteriormente, en la presente invención se ha desarrollado un método general de fitorremediación intensificada de espacios degradados mediante especies vegetales modificadas genéticamente que poseen un alto rendimiento, en el cual se modifica genéticamente las especies vegetales seleccionadas por la introducción de tres genes:

15

Según un primer modo:

- a) del gen *TaPCS1* en un primer paso y
- b) por la introducción conjunta de los genes *YCF1* y *CBP4* en un segundo paso.

20

En un segundo modo alternativo, se puede invertir el orden de la introducción de la siguiente forma:

- a) del gen *YCF1* en un primer paso y
- b) por la introducción conjunta de los genes *TaPCS1* y *CBP4* en un segundo paso.

25

En un tercer modo alternativo, se puede realizar la introducción de la siguiente forma:

- a) del gen *TaPCS1* en un primer paso,
- b) del gen *YCF1* en un segundo paso. y
- c) del gen *CBP4* en un tercer paso.

30

En un cuarto modo alternativo, se puede realizar la introducción de la siguiente forma: por la introducción conjunta de los genes *TaPCS1*, *YCF1* y *CBP4* en un único paso

35

Como un segundo caso de aplicación, la presente invención se ha dirigido al estudio del método de fitorremediación intensificada de espacios degradados en caso de la introducción de tres genes, realizado a modo de ejemplo en la especie *Nicotiana glauca* modificada genéticamente por la introducción del gen *TaPCS1* (plantas TAP) en un primer paso y por la introducción conjunta posterior de los genes *YCF1* y *CBP4* (plantas TYC) en un segundo paso. Sin embargo, es de señalar que el método de la presente invención es de aplicación no sólo para otras especies de la familia *Nicotiana*, sino también para especies de otras familias vegetales, o en general a cualquier especie vegetal. Asimismo, consideramos que dicha introducción de los genes *YCF1* y *CBP4* no necesariamente debe ser conjunta sino que se puede realizar por separado en un segundo y un

40 tercer pasos sucesivos. Podría considerarse realizar la inserción de cualquier manera, pero estas posibilidades de éxito se reducirían notablemente, p.ej. la inclusión inicial de *CBP4* pudiera producir hipersensibilidad.

Las plantas *TYC* objeto de la presente invención, están formadas por la combinación de tres genes que fueron transformados en la especie *Nicotiana glauca*, a saber:

- Primero se obtuvieron las plantas *TaP*, ya que el gen *TaPCS1* transformado en *Nicotiana glauca*, daría como resultado una especie en cierto modo cercana a la *superplanta*.
- Una vez corroborado que en las nuevas condiciones testadas dichas plantas *TaP* igualmente funcionaban muy bien, se realizó la aportación de los dos genes restantes en un sólo paso. El efecto de la *superplanta* se produce sólo al incluir los tres genes y no antes; el haber logrado el objeto de la invención es de la máxima relevancia.
- La inserción de dichos tres genes *TaPCS1*, *YCF1* y *CBP4* se puede hacer igualmente en tres pasos, pero eso sí, sólo en el orden estrictamente determinado según la Invención.

MÉTODOS DE MODIFICACIÓN GENÉTICA SEGÚN LA PRESENTE INVENCION

MODIFICACIÓN CON DOS GENES DE LAS ESPECIES MODELO *POPULUS TREMULA X TREMULOIDES CV. ETROPOLE* Y *NICOTIANA GLAUCA*

En la especie vegetal *Nicotiana glauca* se partió del plásmido de levadura pYESTaPCS 1 que contiene el gen de la fitoquelatina sintetasa de *Triticum aestivum* (*TaPCS1*). El cDNA del gen donado previamente en levadura se designó como plásmido pYESTaPCS 1.

El plásmido se digirió sólo en un corte lineal con *Xho* I y se convierte dicho corte en extremos romos con la ayuda de la DNA polimerasa I. Después, del cambio a extremos romos, el resto del plásmido pYESTaPCS 1 se dirige con *Bam*HI para producir un fragmento de 2 Kb conteniendo el cDNA del gen *TaPCS*] y con extremo 5' *Bam*HI y 3' romo. Paralelamente, el plásmido pBI121 intacto se digiere con *Bam*HI y *ECL136* II (que deja romo el extremo 3' para que complemente con el 3' del inserto). El inserto de 2 Kb se liga en los sitios *Bam*H I-*Ec1136* II del plásmido recién cortado, obteniéndose la nueva construcción pBITaPCS 1. La nueva construcción (pBITaPCS1) se electropora en una cepa de *Agrobacterium tumefaciens*, C58C1Rif^R 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, 3 % sacarosa, 2.5 SYMBOL 109 'Symbol' 's 12g mL-' Naftaleno acético (NAA), 1 SYMBOL 109 'Symbol' 's 12g mL-' 6 bencil aminopurina (BA) 0.8 % agar 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 co-cultivación los explantes se transfieren a un medio selectivo NB2510 conteniendo 100 SYMBOL 109 'Symbol' 's 12g mL-' de kanamicina y carbenicilina (350 SYMBOL 109 'Symbol' 's 12g/mL). Dos meses después de la infección, las plantas son individualmente extraídas de los explantes y transferidas a botes conteniendo 30 ml de medio B1 (sales MS incluyendo vitaminas Gamborg B5, 0.3 SYMBOL 109 'Symbol' 's 12g mL-' ácido indol acético de 0.2 SYMBOL 109 'Symbol' 's 12g mL-' NAA, 1 % sacarosa, 100 SYMBOL 109 'Symbol' 's 12g mL-', 0.7 % agar).

Además del gen TaPCS1, también se introdujo en *Nicotiana glauca* el gen YCF1 (*Yeast Cadmium Factor*) de *Saccharomyces cerevisiae*. Se trata de un transportador vacuolar que facilita la entrada y acumulación de metales en la vacuola. A la secuencia del cDNA del gen YCF1 de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) donado previamente, se le añadió, en el extremo 5', la secuencia de corte de XbaI junto con la del promotor 35s (CaMV-Virus del mosaico de la coliflor), para aumentar la expresión del gen, y en el extremo 3', la secuencia del terminador 'ocs' junto con el sitio de corte para SadI. Paralelamente el plásmido pGreen 0179 intacto se digiere con SadI y XbaI. El inserto se liga en los sitios Sac I - XbaI del plásmido recién cortado obteniéndose una nueva construcción llamada pGYCF1. El método de transformación es el mismo, pero en este caso con 1 a nueva construcción pGYCF1.

En la especie vegetal *Populus tremula x tremuloides* cv. *Etropole*, los genes introducidos son el TaPCS 1 y el AtPCS 1 (fitoquelatina sintetasa de *Arabidopsis thaliana*). El gen AtPCS 1 de la fitoquelatina sintetasa de *Arabidopsis thaliana* fue donado mediante PCR en un ORF incompleto (en su extremo 5') de 1458 nt, al cual le fueron añadidos 44nt para completar la secuencia codificante en el extremo 5', junto con la secuencia GCTggATccACC conteniendo el lugar de corte de la enzima BamHI y el fragmento 'kozac' (CACC) en dicho extremo, para sobreexpresar el gen AtPCS 1. También le fue añadido al final de la secuencia codificante (extremo 3') una secuencia de restricción para EcoRV que permite su posterior inserción en el plásmido. Paralelamente, el plásmido pBI121 intacto se digiere con BamHI y Ec1136II (que deja como el extremo 3' para que complemente con el 3' del inserto), extrayendo el gen uidA en su lugar. El inserto de 1.6 Kb (AtPCS1) se liga en los sitios BamHI y Ec1136II del plásmido recién cortado, obteniéndose una nueva construcción llamada pBIAtPCS1. El método de transformación es el mismo, pero en este caso con las dos construcciones, pBIAtPCS 1 y pBITaPCS 1.

25

MODIFICACIÓN CON TRES GENES DE LA ESPECIE MODELO *NICOTIANA GLAUCA*

A grandes rasgos el método para el ensayo de la influencia de la introducción de tres genes se realizó con la *Nicotiana glauca* y constó de tres grandes fases generales:

30

- 1) La primera fase corresponde a la obtención de un vector de transformación que incluyera los dos genes de interés ScYCF1 y AtCNGC1, y la transformación genética de la línea modificada genéticamente anteriormente, TaPCS1 17/8, vía *Agrobacterium tumefaciens*.
- 2) En una segunda fase, se pretendía obtener plantas modificadas genéticamente conteniendo los dos genes de interés más el gen de la fitoquelatina sintasa (PCS1) que ya se había introducido previamente de forma análoga a ésta. Esta fase consistía en la transformación genética de una línea TaPCS1 (17/8), la generación de brotes a partir de callos, su enraizamiento y aclimatación en invernadero y la identificación de los transgenes por PCR a partir del DNA genómico.
- 3) La tercera y última fase corresponde al conjunto de ensayos, medidas y análisis de resultados relativos a tolerancia y acumulación de iones de metales y otros elementos estresantes en las nuevas líneas que se obtendrán.

35

40

I. OBTENCIÓN DEL VECTOR DE TRANSFORMACIÓN PRAF9:

Según el primer modo de introducción la obtención de las plantas TYC (con los genes introducidos *TaPCS1*, *YCF1*, *CNGC1*) se realizó en dos etapas. En una fase anterior, se obtuvieron plantas de *Nicotiana glauca* que sobreexpresaban el gen de la fitoquelatina sintasa de trigo *TaPCS1*. Se obtuvieron posteriormente líneas F3 estables homocigotas para el gen *TaPCS1*. Una de estas líneas fue la base para la transformación genética con el nuevo vector de transformación, pRAF9.

La invención comenzó por la construcción de un vector de transformación que permitiera la sobreexpresión del gen *YCF1*, aislado de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y el gen denominado *CNGC1* o *CBP4* de *Arabidopsis thaliana*, en una de las líneas *TaP*. El primer gen, *YCF1* ("yeast cadmium factor") codifica un transportador vacuolar de conjugados del glutatión y el segundo, *CNGC1* (denominado también como *CBP4*, "cyclic nucleotide gated channel") o *CBP4* codifica para un canal catiónico de la membrana plasmática. Con la sobreexpresión de los tres genes a la vez, se pretende mejorar la tolerancia a iones de metales y a otros muchos estreses y, aumentar su acumulación con respecto a la línea modificada genéticamente *TaPCS1* que a su vez presenta mejores resultados que los observados para la planta silvestre (*wt*).

II. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE *NICOTIANA GLAUCA*

En una segunda fase se procedió a transferir el DNA a la línea *TaP* 18 por medio de *Agrobacterium*

ENSAYOS DE LAS ESPECIES MODELO *POPULUS TREMULA X TREMULOIDES* CV. *ETROPOLE* Y *NICOTIANA GLAUCA* MODIFICADAS GENÉTICAMENTE EN DISTINTOS MEDIOS ESTRESANTES

Se habían seleccionado las especies vegetales por exclusión, resultando como mejor opción *Nicotiana glauca* para terrenos secos y *Populus tremula x tremuloides* cv. *Etropole* para terrenos húmedos. La *Nicotiana glauca* salvaje (*wt*), seleccionada tiene una serie de características que la hacen idónea para emplearla como combustible ya que; germina en campo abierto y su poder de germinación es muy bueno. Se reproduce por esquejes. Cuando se corta una rama o parte de la planta, la planta vuelve a regenerar esa parte y sigue creciendo. Resiste temperaturas ambiente muy altas, y también bastante bajas. Resiste sequía y salinidad. Es herbácea en las primeras etapas de su desarrollo lo que le permite tener un marco de plantación muy grande. Se lignifica pronto lo que permite que sea buena para su combustión y por tanto producir energía calorífica y/o eléctrica. Es muy poco o nada atacable por parásitos o enfermedades lo que permite que su producción no decaiga en eficiencia. Necesita muy poco riego. A estas especies vegetales, (*Nicotiana glauca* y *Populus tremula x tremuloides*), se les fueron introducido dos genes, *TaPCS1*, y *TaPCS1-AtPCS1*, respectivamente.

Una etapa complementaria ha sido la introducción de tres genes, empleando como modelo la *Nicotiana glauca*.

1.- SUELOS CONTAMINADOS ESTUDIADOS

Se determinaron las diferentes características de los suelos M4, M15, M3, en los que fueron ensayadas las especies modelo modificadas *Populus tremula x tremuloides* cv. *Etropole* y *Nicotiana glauca*, y se compararon con los valores aceptados por la Unión Europea para suelos contaminados

2.- EFECTO SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LA BIOMASA

Se estudió el crecimiento en altura de las plantas después de seis meses, comparando las plantas salvajes de *Nicotiana glauca* (wt) y las modificadas genéticamente con el gen TaPCS1.. Asimismo, el efecto de los suelos contaminados M4 y M15 sobre la producción de biomasa en gramos en biomasa total (T), biomasa aérea (A), tallos y hojas y biomasa radicular (R) concentración en mg/kg en *Populus tremula x tremuloides* cv. *Etropole*, en ambos suelos, para las plantas silvestres (wt) y modificadas genéticamente. Estos ensayos se realizaron también en suelos no contaminados, comprobándose que en todos los ensayos ocurría lo mismo, un aumento de biomasa en ambas especies modificadas, lo que constituye una verdadera novedad, es decir, la introducción de dichos genes en una especie vegetal, aumenta la producción de biomasa tanto en suelos contaminados como no contaminados

3.- CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS EN PRESENCIA DE DISTINTOS MÉTALES PESADOS TÓXICOS.

Para el estudio de las especies modificadas con dos genes, se han sacado una serie de muestras de suelos contaminados en zonas mineras, industriales y fluviales y se han analizado sus características y estudiado también las especies que sobrevivían en dichos suelos, desde diferentes puntos de vista; morfológico, rechazo alimentario de los animales a dichas especies vegetales, adaptabilidad ambiental y edafológica. El método consistió en el estudio del comportamiento de las especies vegetales en su plantación y crecimiento, por lo que se tomaron varias muestras estudiándose el desarrollo de las mismas en suelo control (M0), no contaminado y en suelos contaminados (M3, M4, M15 y MT). Se observó que en las especies vegetales seleccionadas y en todo tipo de suelos la biomasa aumentaba, en ambos casos, en más de un 40%, al estar modificadas genéticamente con TaPCS 1 y AtPCS 1. Se observa que en todos los casos la longitud de las raíces de las plantas modificadas es superior que en las plantas salvajes.

El estudio de la *N. glauca* modificada con tres genes consistió en:

- a) Análisis iones de metales *in vitro*.
- b) Análisis de iones de metales en medio hidropónico.

Con la finalidad de analizar la tolerancia de diferentes líneas de la planta modificada genéticamente *TYC* en medios con iones de metales se seleccionaron de entre las 30 líneas modificadas genéticamente confirmadas, tres líneas al azar (*TYC5*, *TYC7* y *TYC11*). Hasta la realización de estos estudios no se tenían referencias del comportamiento de ninguna línea

modificada de *N. glauca* frente a arsénico, pero sí se habían hecho estudios de acumulación en una línea silvestre, encontrada en un escrutinio realizado en suelos industriales con altos niveles de iones de metales, véase C. Gisbert et al. "*Identification of as Accumulation Plant Species Growing on Highly Contaminated Soils*". International Journal of Phytoremediation. 2008, 10:3 p. 185 - 196. Se esperaba que el KH_2AsO_4 produjera menor toxicidad que la que producen cadmio y mercurio, como queda claramente determinado en la literatura, por ello se realizó el ensayo en un rango de concentraciones mayores a las utilizadas en los otros dos metales analizados, aunque no se tenía certeza de los límites idóneos de concentraciones a ensayar para las nuevas plantas obtenidas.

Adicionalmente, se ha comparado en medio contaminado con metales pesados, la biomasa de la *Nicotiana glauca* modificada con tres genes con la de la planta hiperacumuladora *Thlaspi caerulescens*. En general, las plantas hiperacumuladoras presentan una tasa de crecimiento baja, poca producción de biomasa y un sistema radicular pobre. Todas estas características son posiblemente debidas al coste energético que supone acumular niveles de metales en su interior, que pueden exceder valores tan altos como el 1% del peso seco de la planta. No obstante, se observa un aumento de la biomasa cuando se compara con las especies modificadas *TAP* y *wt* en ausencia de metales. La siembra y crecimiento de dichas especies modificadas que hemos denominado *superplantas TYC* se puede realizar en condiciones de la agricultura convencional o biológica.

4.- CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS EN PRESENCIA DE DETERGENTES.

Se ha estudiado en el uso de detergentes iónicos y no iónicos de uso industrial para evaluar el crecimiento de las raíces de las plantas modificadas.

5.- CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS EN PRESENCIA DE PETRÓLEOS CRUDOS.

Se han crecido las plantas modificadas, *TAP*, en presencia de distintas concentraciones de petróleo crudo.

6.- CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS EN PRESENCIA DE PRODUCTOS REFINADOS DEL PETRÓLEO

Se ha estudiado el crecimiento de las plantas en presencia de distintos derivados del petróleo: productos ligeros - gasolina, productos medios - gasóleo, y productos pesados - aceites lubricantes para coches

7.- ESTUDIO DE LA TOLERANCIA A LOS IONES SODIO DE LAS PLANTAS *N. GLAUCA WT* Y *TAP*, *TYC*.

Se evaluó en hidroponía la tolerancia a sodio de las plantas *TAP*, *TYC* y la *N. glauca* silvestre (*wt*).

8.- RESISTENCIA FRENTE A ENFERMEDADES

Se ha realizado un ensayo en el que se mide la diferencia de sensibilidad de las plantas modificadas genéticamente *TAP*, *TYC*, respecto a los genotipos de *N. glauca* silvestre (*wt*), frente a una agresión por el agente patógeno *Botrytis*.

FIGURAS

La invención se comprenderá más fácilmente a partir de la descripción de realizaciones preferentes con la ayuda de las figuras que se acompañan.

5

Figura 1. En ella se representan las mediciones de las diferentes características del suelo, para suelos contaminados tipo M4, M15, M3, y los límites para suelo agrícola exigidos por la Unión Europea.

10

Figura 2. Muestra un diagrama de barras que representa el crecimiento en altura de las plantas después de seis meses. En el eje de ordenadas se indica la longitud en metros al cabo de dicho tiempo de las plantas salvajes de *Nicotiana glauca* (wt) y de las modificadas genéticamente con el gen TaPCS1 OMG.

15

Figura 3. Presenta el efecto de los suelos contaminados M4 y M15 sobre la producción de biomasa en gramos en biomasa total (T), biomasa aérea (A), tallos y hojas y biomasa radicular (R) concentración en mg/kg en *Populus tremula x tremuloides* cv. *Etropole*. El total acumulado de estos dos elementos (μg), en microgramos. Concentración en tallos y hojas (BCF) y concentración en raíz (RCF). Para plantas silvestres (wt) y modificadas genéticamente.

20

Figura 4 presenta el aumento de la biomasa en *Populus tremula x tremuloides* cv. *Etropole*. Esta figura representa dos líneas de TaPCS 1, y dos de AtPCS 1, junto a una planta Silvestre, la de la derecha de la figura, todas en medio M4, es decir en un suelo muy contaminado.

Figura 5. Se representa en un diagrama de barras el desarrollo de las plantas sin modificar wt, y las modificadas con el gen YCF, a los 26 días.

25

Figura 6. Se representa en un diagrama de barras las longitudes alcanzadas por las raíces en centímetros, al cabo de 21 días de las plantas salvajes de *Nicotiana glauca* (wt) frente a las modificadas genéticamente con el gen YCF. Se observa que en todos los casos la longitud de las raíces de las plantas modificadas es superior que en las plantas salvajes.

Figura 7: Presenta la evolución del número de hojas en las plantas (wt, TaP y TYC) en función del tiempo.

30

Figura 8. Presenta la evolución de la distancia entre hojas de las plantas (wt, TaP y TYC) en función del tiempo.

Figura 9: Evolución de la altura de las plantas (wt, TaP y TYC) en función del tiempo.

Figura 10: Evolución del número de internodos en las plantas (wt, TaP y TYC) en función del tiempo.

35

Figura 11. Compara la longitud de las raíces en medio conteniendo CdCl_2 para las tres líneas TYC seleccionadas y la línea control (wt).

Figura 12. Compara la elongación de las raíces en medio conteniendo KH_2AsO_4 para las tres líneas TYC seleccionadas y la línea control (wt).

Figura 13. Compara la elongación de las raíces en medio conteniendo HgCl_2 para las tres líneas TYC seleccionadas y la línea control (wt) (bajo ventana ampliada).

40

Figura 14. Presenta la concentración de cadmio acumulado en peso seco en las hojas de las diferentes líneas TYC seleccionadas a concentración 0,05 y 0,1 mM de CdCl_2 .

Figura 15. Presenta la concentración de plomo acumulada en peso seco en la raíz de las diferentes líneas TYC seleccionadas a concentración 0,8 y 1,5 mM de PbNO_3 .

- Figura 16. Presenta la concentración de plomo acumulada en peso seco en la hoja de las diferentes líneas *TYC* seleccionadas a concentración 0,8 y 1,5 mM de $PbNO_3$.
- Figura 17. Presenta la concentración total de plomo acumulada en peso seco (raíz + tallo + hoja) de las diferentes líneas *TYC* seleccionadas a concentración 0,8 y 1,5 mM de $PbNO_3$.
- 5 Figura 18. Presenta el número de semillas germinadas de las plantas *wt* y *TYC* frente a la concentración del detergente no iónico (% v/v, ml soluto/ml disolución).
- Figura 19. Presenta el número de semillas germinadas de las plantas *wt* y *TYC* frente a la concentración del detergente iónico (% v/v, ml soluto/ml disolución).
- Figura 20. Presenta la longitud de las plantas *TaP* a diferentes concentraciones de petróleo crudo.
- 10 Figura 21a Presenta la longitud de las raíces de plántulas *wt* y *TYC* de *Nicotiana glauca*, sembradas en diferentes concentraciones de gasolina.
- Figura 21b. Presenta la longitud de las raíces de plántulas *wt* y *TYC* de *Nicotiana glauca*, sembradas en diferentes concentraciones de gasóleo.
- Figura 21c. Presenta la longitud de las raíces de plántulas *wt* y *TYC* de *Nicotiana glauca*, sembradas en diferentes concentraciones de aceite automotor (coches).
- 15 Figura 22. Presenta la concentración de sodio acumulada en peso seco en la raíz de las diferentes plantas *wt*, *TaP* y *TYC* a concentración 125 y 500 mM de NaCl.
- Figura 23. Presenta la concentración total de sodio acumulada en peso seco en la planta (raíz + tallo + hojas) de las diferentes plantas *wt*, *TaP* y *TYC* a concentración 125 y 500 mM de NaCl.
- 20 Figura 24. Presenta el diámetro de necrosis en diferentes genotipos, plantas *wt*, *TaP* y *TYC*, de *Nicotiana glauca* infectada con el hongo *Botrytis*.

REALIZACIONES

25

REALIZACIÓN N°1. TIPOS DE SUELOS

Se han analizado tres tipos de suelos contaminados, designándolos por M3, M4, M15 y un suelo MT (suelo seleccionado del cauce del Río Turia Valencia) que adjuntamos en tabla aparte designada como Figura 1. En dicha tabla se indican las cantidades obtenidas en la columna de la izquierda para los tres tipos de suelo M3, M4, M15 y MT. En la última columna aparecen los límites de concentración permitidos por la Unión Europea, para metales pesados para suelos agrícolas. De las especies salvajes que se han desarrollado en los suelos M3, M4, M15 y MT, y por lo tanto están adaptadas a estos suelos, se han rechazado aquellas que eventualmente pudieran formar parte de la cadena trófica y aquellas que sufrían estrés climático al variar, por un periodo determinado, las condiciones climáticas.

30

35

Otra característica determinante para la elección y seguida por este método es el estudio de la cantidad de biomasa producida por estas especies vegetales, ya que al aumentar ésta, aumenta la capacidad de almacenamiento y por tanto la fitorremediación. Por último, se tenía que seleccionar especies vegetales que tuvieran no sólo una muy fácil reproducción sino que también cumplieran con el requisito de que fuera una reproducción muy abundante.

40

REALIZACIÓN N°2 AUMENTO DE LA BIOMASA DE LAS ESPECIES MODIFICADAS GENÉTICAMENTE

Se realizó el estudio morfológico de las especies vegetales, analizando la profundidad de sus raíces, pues es el órgano por el cual se absorben los elementos contaminantes, ya que se pretende conseguir una fitorremediación en profundidad y no meramente superficial, aunque la disolución de elementos contaminantes en la tierra sea lenta. Posteriormente se analizó el lugar o lugares de la especie vegetal donde almacena los elementos contaminantes extraídos del suelo (raíces, tallo y hojas), ya que según sea dónde se acumulan tendrán mayor o menor capacidad de almacenamiento de dichos metales. En la Figura 2 se comprueba que las plantas silvestres crecen unos tres metros y medio y la modificada genéticamente alcanzan los cinco metros. Lo que supone que en seis meses han crecido más de un 40%, las plantas modificadas genéticamente. En la Figura 3, se puede apreciar la producción de biomasa, en suelos altamente contaminados tipo M4 y M15, así como las concentraciones en mg/kg de plomo y zinc, sus totales (µg) en microgramos, concentraciones por bioconcentración (BCF) y las concentraciones radiculares (RCF), en especies vegetales silvestres (wt, por las siglas en ingles, *wild type*,) de *Populus tremula x tremuloides cv. Etropole* y modificados genéticamente (PTa3 y PTa5). En la Figura 4 se muestran dichas muestras en macetas donde se aprecian claramente las diferencias respecto a la silvestre, siendo la especie silvestre la del extremo derecho.

En general, se debe tomar en cuenta que las plantas hiperacumuladoras presentan una tasa de crecimiento baja, poca producción de biomasa y un sistema radicular pobre. Todas estas características son posiblemente debidas al coste energético que supone acumular niveles de metales en su interior, que pueden exceder los valores tan altos como el 1% del peso seco de la planta. Se ha comparado la biomasa obtenida en el ejemplo de la *Nicotiana glauca* con la de la planta hiperacumuladora *Thlaspi caerulescens*, y se pueden observar las diferencias significativas obtenidas. En la Figura 5 se presenta la comparación de la biomasa de *Nicotiana glauca* en tres suelos mineros diferentes con altos contenidos de metales pesados con la biomasa de la planta hiperacumuladora *Thlaspi caerulescens* (wt). En general, las plantas hiperacumuladoras presentan una tasa de crecimiento baja, poca producción de biomasa y un sistema radicular pobre. Todas estas características, como se ha mencionado previamente, son posiblemente debidas al coste energético que supone acumular tan altos niveles de metales en su interior. Por el contrario tanto la *Nicotiana g.* silvestre (wt) como las plantas TAP producen una cantidad de masa incomparablemente superior en varios órdenes. Se realizó un estudio comparativo del crecimiento en plantas de *Nicotiana glauca* modificadas genéticamente y sin modificar. Para ello, se partió de las siguientes líneas de plantas: wt, L1, L7 y L3 transformadas con el gen YCF1. Se realizó un estudio del crecimiento de cada una de las líneas, evaluando primero el número de hojas de cada planta y, en un segundo experimento, la longitud de las raíces. Se puede observar en la Figura 5 el número de hojas que desarrollan las plantas silvestres wt, y las modificadas con este gen YCF1 a los 26 días. En las plantas transformadas con el gen YCF1 se observan unos valores de crecimiento homogéneos dentro de las líneas, y además, superiores a los valores de las plantas wt en prácticamente todos los casos, como puede observarse de la Figura 6 donde se comparan la longitud de las raíces a los 21 días. Dentro de cada grupo de líneas se observa un crecimiento

radicular homogéneo, ya que no hay grandes diferencias en la longitud de las raíces de las líneas del mismo grupo. Las plantas transformadas con el gen YCF1 son las que presentan un mayor crecimiento radicular, siendo la longitud de sus raíces superior a la de las plantas wt. Al estudiar los 3 casos conjuntamente se observa que los gráficos muestran un patrón de crecimiento común, es decir, en los 3 experimentos se ve que las líneas transformadas con el gen YCF1 proporcionan los mayores valores de crecimiento.

Ensayo de biomasa en invernadero

Se efectuó un ensayo comparativo de las plantas de la especie *Nicotiana glauca*, silvestre wt, y modificadas genéticamente, TaP y TYC obtenidas según la presente invención, ensayo realizado en condiciones controladas (invernadero) y en ausencia de metales pesados. Se realizaron medidas de biomasa cada 7 días durante dos meses y medio. Estas medidas incluyeron:

- número de hojas, véase la Figura 7, donde se presenta la evolución del número de hojas en las plantas (wt, TaP y TYC) en función del tiempo.
- distancia entre hojas, véase la Figura 8, donde se presenta la evolución de la distancia entre hojas de las plantas (plantas wt, TaP y TYC) en función del tiempo.
- altura de las plantas, véase la Figura 9, donde se presenta la evolución de la altura de las plantas (wt, TaP y TYC) en función del tiempo.

Para la comparación, adicionalmente se midió el número de internodos, véase la Figura 10, donde se presenta la evolución del número de internodos en las plantas wt, TaP y TYC en función del tiempo.

Del análisis de las Figuras 7-10 se hace patente que si bien ya la especie *N. glauca* silvestre (wt) presenta características ventajosas respecto a la planta hiperacumuladora *Thlaspi caerulescens*, estas características se ven incrementadas significativamente cuando se comparan con las de las plantas TAP y TYC, las modificaciones genéticas de la *N. glauca* silvestre.

Se constata que la biomasa de las plantas correspondientes a la inserción de tres genes, TYC, es significativamente superior a la de las plantas silvestres, y también a la de las plantas TaP obtenidas por la inserción de dos genes. Los valores obtenidos tanto en número de hojas como en altura de la planta no son más que el reflejo proporcional de un incremento también en peso.

REALIZACIÓN N°3 CRECIMIENTO DE LAS ESPECIES MODIFICADAS EN SUELOS CONTAMINADOS

Crecimiento de las especies modificadas con dos genes

Como mejor opción se seleccionaron las especies vegetales *Nicotiana glauca* para terrenos secos y *Populus tremula x tremuloides* cv. *Etropole* para terrenos húmedos. A estas especies vegetales se les han introducido en un primer paso los genes TaPCS1, y TaPCS1-AtPCS1, respectivamente. Se estudió el comportamiento de las especies vegetales en su plantación y crecimiento, por lo que se tomaron varias muestras estudiándose el desarrollo de las mismas en el suelo control M0 no contaminado, y en los suelos contaminados M3, M4, M15 y MT. Se observó que la biomasa de las especies vegetales seleccionadas, y en todo tipo de suelos, aumentaba, en

ambos casos, en más de un 40%, al estar modificadas genéticamente con los genes TaPCS1 y AtPCS1, véase el número de hojas en la Figura 5. Se observa que las plantas que contienen cualquiera de los dos genes sufren menos la presencia del metal en el suelo y por eso crecen más. Se observa que en todos los casos que la longitud de las raíces de las plantas modificadas es superior que la de las plantas salvajes, véase la Figura 6.

MODIFICACIÓN CON TRES GENES DE LA ESPECIE MODELO *N. GLAUCA*.

Resultados:

Aunque los experimentos expuestos hasta ahora evidencian una mejora en la producción de biomasa, sin embargo, las diferencias a nivel de germinación entre las líneas modificadas genéticamente y la planta silvestre, en el conjunto total de experimentos, no son tan claras en las condiciones de estrés y ausencia del mismo, obteniendo en todas las líneas estudiadas un alto porcentaje de germinación, próximo al 70%. Esto sucede porque la especie seleccionada como modelo *N. glauca* ya es por sí misma una especie que soporta bien las condiciones de estrés, especialmente, por los iones de metales, pero en general, a una gran variedad de estreses, por tanto aunque la especie silvestre sea menos resistente que las modificadas, las que no son líneas puras y su capacidad de tolerancia en números totales de germinación puede estar disminuida. Por esto, para estudiar el efecto que los genes insertados han causado sobre esta capacidad que ya poseía la especie silvestre de absorber iones de metales del medio, se realizó un estudio comparativo de la longitud de raíces de tres de las líneas transformadas y el genotipo silvestre. Los datos de elongación de la raíz se tomaron a los 15 días del inicio del ensayo, no obstante, previamente se tomaron fotografías a los 5 y 10 días aproximadamente, para obtener datos visuales del desarrollo de las distintas líneas. Los resultados obtenidos tras medir la longitud de la raíz se muestran en las siguientes figuras:

Las Figuras 11, 12 y 13 presentan la relación entre la longitud de las raíces de las diferentes líneas y la concentración de diferentes metales. Conforme aumenta la concentración de metal en el medio disminuye la elongación para todos los genotipos y metales estudiados. Sin embargo, existen claras diferencias entre las diferentes líneas de las plantas TYC, para cada metal y diferentes concentraciones.

Para el cadmio véase la Figura 11, donde se presenta el análisis comparativo de la longitud de las raíces en el medio conteniendo CdCl₂ para las tres líneas TYC 5, 7 y 11 seleccionadas y la línea control *wt*. La línea TYC5, aunque semejante a las otras, es la que presenta una mayor tolerancia, según los datos obtenidos en el intervalo de las concentraciones analizadas. Se observa además un patrón muy similar de comportamiento para las 3 líneas modificadas genéticamente, salvo para la concentración 50 µM de CdCl₂, en la que se observa una clara diferencia negativa en la línea TYC 7 frente a las líneas TYC5 y TYC11.

Trabajos previos realizados por C. Gisbert et al. "A Plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation". Biochemical and Biophysical Research Communications. 2003, vol. 303 p 440-445, demostraron que las plantas de *N. glauca* modificadas

genéticamente con el gen *TaPCS1* sobreexpresado en *N. glauca* son más tolerantes al cadmio que la especie silvestre *wt*. Mostrando las mayores diferencias de crecimiento, entre la línea *wt* y las modificadas genéticamente, a una concentración de cadmio cercana a los 35 μM de CdCl_2 . Sin embargo, en el presente trabajo se observa que las mayores diferencias en el tamaño de las raíces entre *wt* y *TYC* se producen a concentraciones entre 50 y 100 μM , por tanto, las plantas modificadas *TYC* suponen una mejora sustancial respecto a las plantas *TAP*.

La influencia del arsénico, KH_2AsO_4 , tomado como modelo de otros elementos, los cuales pueden interactuar como cationes y/o aniones, se presenta en la Figura 12. Muestra la elongación de las raíces en el medio conteniendo KH_2AsO_4 para las tres líneas *TYC* seleccionadas y la línea control *wt*. Se observa un comportamiento similar al expuesto del CdCl_2 . En efecto, aunque con semejante resistencia, es la línea *TYC5* la que presenta mayor resistencia, según los datos obtenidos en el intervalo de concentraciones analizadas, excepto a 100 μM . Se observa un patrón de comportamiento similar para las 3 líneas modificadas genéticamente respecto a la línea *wt*, salvo para la concentración 50 μM de KH_2AsO_4 , en la que se advierte una clara diferencia negativa en la línea *TYC 7* frente a las líneas *TYC 5* y *TYC 11*, fenómeno muy similar al observado para CdCl_2 . En cuanto a la relación general de tolerancia comparativa a la línea silvestre, en presencia de este metal, se distinguen (como ya se ha mencionado) mayores diferencias entre las líneas modificadas -5, -7 y -11 (longitud de raíz mayor) y la línea silvestre (longitud de raíz menor) lo que demuestra que los genes insertados afectan de forma positiva la tolerancia a KH_2AsO_4 aumentando comparativamente la raíz de la planta y por consiguiente, seguramente la cantidad de metal acumulado en la misma.

Para la sal de mercurio HgCl_2 , véase la Figura 13 donde se presenta la elongación de las raíces en medio conteniendo HgCl_2 para las tres líneas *TYC* -5, -7 y -11, y la línea control (*wt*) bajo ventana amplificada por sus bajos resultados. Se observa que las plantas (tanto las modificadas como la silvestre) solo desarrollan raíces a concentraciones muy bajas, hasta 20 μM , concentración a la cual ya no desarrollan raíces, aspecto éste que está de acuerdo con la literatura, pues está descrito que el Hg es extremadamente tóxico y que concentraciones en torno a 1 ppm ya son consideradas tóxicas en algunas legislaciones sobre suelos contaminados. En efecto una concentración de HgCl_2 de 5 μM equivale aproximadamente a 1 ppm. Como para los metales anteriormente expuestos Cd y As, las líneas *TYC*-5, -7 y -11 presentan una mayor tolerancia, manifestada en un mayor tamaño de las raíces en comparación con la *N. glauca* silvestre.

Es de señalar que aún en presencia del mercurio, al comparar las tres líneas *TYC*-5, -7 y -11, con la línea control *wt*, las tres líneas modificadas poseen raíces más largas que la *N. gl.* silvestre *wt*. No obstante, es pertinente subrayar que el mayor cociente entre el tamaño de las raíces de las líneas *TYC* -5, -7 y -11 y la *N. gl.* silvestre se produce a una concentración de CdCl_2 de 100 μM , donde se llega a duplicar en promedio el tamaño de las raíces *wt*.

No obstante, la comparación con los resultados obtenidos para los dos metales analizados anteriormente muestra que existen algunas diferencias muy claras:

1. En presencia del Cd y As, a bajas concentraciones, el tamaño de las raíces de la línea TYC- 7 era más próximo a la línea silvestre que a las modificadas (véase 18, 50 μM de CdCl_2 y 50 μM de KH_2AsO_4). Este comportamiento muestra una evolución del tamaño de las raíces frente al incremento de la concentración, inusual, característica y diferencial para la línea TYC 7.
- 5 2. Las líneas TYC -5, -7 y -11 con el Hg^{2+} siguen un comportamiento de característica similar y prácticamente idéntica, pero mayor en valores absolutos a la *N. gl.* silvestre.
3. La línea TYC-11, en presencia Hg, pese a seguir el mismo comportamiento, presenta valores absolutos mayores que el resto de líneas modificadas y que la *N. gl.* silvestre. Así, según los resultados, la línea TYC-11, es la que mejor resiste el Hg en las condiciones analizadas.
- 10 4. Para los metales Cd y As, el máximo cociente de elongación de raíces para las distintas concentraciones analizadas, es idéntico e igual a 2, es decir, en el punto de la máxima diferencia, i. e., las raíces de las plantas TYC duplican en tamaño las raíces de la planta silvestre. Para el Cd esto ocurre a una concentración 100 μM , y para el As, esto se produce a 200 μM . Sin embargo para el Hg, este valor es inferior a 2, está en torno al 1.3, por tanto, claramente inferior.
- 15
- En consecuencia, tras analizar los datos obtenidos en el experimento *in vitro*, los resultados obtenidos demuestran que las líneas modificadas se desarrollan mejor que la *N. gl.* silvestre en medios con iones de metales tóxicos. El hecho de que presenten raíces de mayor longitud lleva a pensar que son capaces de acumular mayor concentración de iones de metales que la planta
- 20 silvestre de *Nicotiana glauca*. Para comprobar si esta hipótesis es cierta se realizaron también ensayos en medio hidropónico con iones de metales

REALIZACIÓN N°3B ENSAYO EN HIDROPONÍA FRENTE A LOS IONES DE METALES

- 25 Para la realización del ensayo se seleccionaron soluciones de los iones de Cd y Pb, y una de Na. Se preparó una solución control de agua destilada para los tres experimentos y las siguientes soluciones acuosas con las siguientes concentraciones de metales: CdCl_2 (0,05 y 0,1 mM) y PbNO_3 (0,8, 1,5 mM), así como solución salina NaCl (125 y 500 mM).
- 30 a. Acumulación de cadmio en los distintos genotipos
- En la Figura 14 se presenta la concentración de cadmio acumulado en peso seco en las hojas de las diferentes líneas a concentraciones 0,05 y 0,1 mM de CdCl_2 . Se observa que la concentración de cadmio acumulada en peso seco en las hojas es superior en las plantas modificadas TYC que en las modificadas TAP, y a su vez que en la *N. gl. wt.* Es importante señalar que las
- 35 concentraciones acumuladas son muy elevadas en comparación con las acumulaciones estándar en las plantas, incluidas las hiperacumuladoras.
- b. Acumulación de plomo en los distintos genotipos:
- En la Figura 15 se presenta la concentración de plomo acumulada en peso seco en la raíz de las
- 40 diferentes líneas TYC frente a las concentraciones de 0,8 y 1,5 mM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Adicionalmente, en la Figura 16 se presenta la concentración de plomo acumulada en peso seco en las hojas de las diferentes líneas TYC a las concentraciones 0,8 y 1,5 mM de PbNO_3 , y en la Figura 17 se

presenta la concentración total de plomo acumulada en peso seco (raíz + tallo + hoja) de las diferentes líneas TYC a concentraciones 0,8 y 1,5 mM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$.

Se observa que la concentración de plomo acumulada en peso seco tanto en la raíz como en las hojas, es superior en las plantas modificadas TYC que en las modificadas TAP, y a su vez que en la *N. gl. wt*. En el caso de las hojas a la concentración 1,5 mM, esto no se cumple, sin embargo este hecho podría explicarse por la cinética de acumulación de la planta, puesto que al haber mayor acumulación de metal en la planta, el tiempo que necesita ésta para transportarlo a la parte aérea es mayor del que requieren el resto de los genotipos para transportar sólo una inferior cantidad de metal. Probablemente esto puede estar relacionado con las dimensiones de las diversas formas en las que el plomo puede encontrarse justamente al entrar en la planta, siendo en forma de catión, anión, o compuesto organometálico. En cualquier caso, los valores de acumulación observados son extraordinariamente altos comparados con los referidos en la literatura para otras plantas acumuladoras de metales, lo que demuestra las grandes potencialidades de las plantas *Nicotiana glauca* modificadas genéticamente por el método de la presente invención.

REALIZACIÓN N°4 TOLERANCIA DE LAS PLANTAS DE NICOTIANA GLAUCA MODIFICADAS A LOS DETERGENTES INDUSTRIALES

El experimento realizado se basa en el uso de dos detergentes de uso industrial. El *primer* detergente es no iónico, el cual se identifica como muestra 2, véase la Figura 18 donde se presenta el número de semillas germinadas de las plantas *wt* y TYC frente a la concentración del detergente no iónico (% v/v, ml soluto/ml disolución). Su fórmula química es $\text{C}_{12}\text{H}_{25}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{12}\text{OH}$. La concentración inicial de esta muestra 2 es de 90% p/v.

El siguiente detergente utilizado es un detergente iónico cuya fórmula es $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{OSO}_3\text{Na}$ identificado como muestra 7, véase la Figura 19 donde se presenta el número de semillas germinadas de las plantas *wt* y TYC frente a la concentración del detergente iónico (% v/v, ml soluto/ml disolución). La concentración de la disolución madre de esta muestra 7 es de un 27% p/v.

Para este ensayo se utilizó el medio sólido, MS+ 3% sacarosa, como placas control para las semillas silvestre (*wt*) y TYC. En otras 3 placas se añadió el medio detergente a diferentes concentraciones, tal y como se puede observar en las anteriores figuras. Las concentraciones utilizadas fueron 0.25%, 0,5% y 1% v/v (ml soluto/ml disolución) de cada uno de los dos detergentes mencionados anteriormente. En cada placa, tanto el control como las de diferentes concentraciones de detergentes, se sembraron 20 semillas de *wt* y 20 semillas de TYC.

A los 9 días de crecimiento de las semillas de las plantas *wt* y TYC, se observa en la Figura 18, detergente no iónico, que las semillas de TYC son capaces de germinar mientras que las semillas de las plantas *N. gl. wt* no germinan. Dato interesante debido a la alta concentración del detergente industrial, 90% p/v, que demuestra la capacidad y resistencia superior de TYC frente a *wt*. Las

diferencias aportadas por los genes *TYC* en este caso son claras pues sobrevive un número elevado de semillas *TYC* prácticamente hasta un 75% de dilución del detergente mientras de la planta silvestre no sobrevive ninguna.

- 5 En el caso del detergente iónico, se puede apreciar en la Figura 19 como a la concentración 0.5% v/v la germinación de las semillas *TYC* es mucho más notable que la de las semillas *N. gl. wt.* No obstante en las demás concentraciones las plantas silvestres se comportan mejor.

REALIZACIÓN N°5 TOLERANCIA DE LAS PLANTAS DE *NICOTIANA GLAUCA* MODIFICADAS A LOS PETRÓLEOS CRUDOS.

Se han crecido las plantas TAP y TYC en sustratos naturales con distintos contenidos de petróleo crudo. Podemos observar véase la Figura 20 las barras correspondientes a las distintas concentraciones en agua ensayadas del petróleo crudo de las plantas. En la Figura se presenta la evolución de la longitud de las plantas TaP, durante el primero, segundo y tercer período de tres semanas ensayados. En cada tiempo se ensayaron tres grupos de plantas de altura alta, media y baja, los que se representan como las barras correspondientes de izquierda a derecha según la altura inicial de las plantas, respectivamente.

- 20 En general, para las concentraciones en agua más bajas 0-0,5% se observó un incremento significativo de las plantas de mayor altura. Para concentraciones del petróleo crudo superiores en algunos casos el incremento de la altura de las plantas con el tiempo de crecimiento es negativo en el segundo y/o tercer período, lo que habla del efecto ya predominante de las sustancias tóxicas presentes en el crudo (polinucleares aromáticos, hetero-compuestos de azufre y de nitrógeno, resinas y asfaltenos)

Se observó en general un incremento de la defoliación y decadencia con el incremento de la concentración de crudo, muy visible a partir de la concentración de 1,5%; las plantas más “bajas” fueron las que en general sufrieron más, tanto en defoliación como en decadencia en general y finalmente muerte de la planta. Se debe señalar que la época del año también favorece a la defoliación, lo que es evidente al comparar la evolución del control en las 3 lecturas.

Los resultados preliminares de tolerancias de las plantas modificadas de *Nicotiana glauca* a los petróleos crudos son prometedores ya que nos permite con seguridad utilizar concentraciones del mismo tan altas como hasta 0,5 % crudo (p/p) y eventualmente utilizar las plantas “altas” para concentraciones de 1,5% y 3 %. La utilización para una concentración de petróleo crudo de 5% (de por sí muy elevada) con los presentes datos determina el límite en las condiciones ensayadas.

REALIZACIÓN N°6 TOLERANCIA DE LAS PLANTAS DE *NICOTIANA GLAUCA* MODIFICADAS A PRODUCTOS COMERCIALES DE PETRÓLEO

Se han ensayado las plantas en presencia de distintos productos comerciales de petróleo: ligeros - gasolina, medios - gasóleo, y pesados - mezcla de aceites lubricantes usados para coches.

En la Figura 21 se presenta la longitud de las raíces de plántulas de *Nicotiana glauca* sembradas en sustratos artificiales con distintos contenidos de gasolina (Figura 21a), gasóleo (Figura 21b) y mezcla de aceites usados (Figura 21c). Se aprecia la longitud de raíces de plántulas de *Nicotiana glauca* (wt y TYC) sembradas en medio conteniendo diferentes concentraciones de gasolina, gasóleo ligero (diesel), o mezcla de aceites usados.

Los resultados de crecimiento de las plantas en muestras de tierra contaminadas con un contenido de ppm de los siguientes productos son:

Gasolina, al ser un producto ligero con un contenido menor de componentes nocivos como compuestos aromáticos (polinucleares aromáticos, ausentes o bajos), así como el contenido de compuestos de azufre y nitrógeno (muy bajos) se obtienen longitudes de raíces significativas hasta concentraciones de 5% de gasolina.

Gasóleo ligero, por el contrario, el contenido de fracciones de pesos moleculares medios superior; de compuestos aromáticos significativamente superior (presencia polinucleares aromáticos); así como el de compuestos de azufre y nitrógeno superior condicionan longitudes de raíces significativamente inferiores ya desde concentraciones de 0,50% de Gasóleo ligero.

Aceites lubricantes usados para coches: Los aceites lubricantes comerciales son productos del petróleo sometidos a procesos de depuración profundas por lo que cabía esperar que la presencia de elementos nocivos fuera significativamente inferior, lo que en efecto se confirma por la aparición de longitudes de raíces apreciables a concentraciones tan elevadas como 10%.

Por su tolerancia a estos productos los resultados obtenidos son esperanzadores y hablan sobre la potencialidad de la *Nicotiana glauca* wt y *Nicotiana glauca* modificada TYC para la fitorremediación de suelos contaminados por vertidos accidentales de productos de la refinación de petróleos crudos.

REALIZACIÓN N°7. TOLERANCIA DE LAS PLANTAS DE *NICOTIANA GLAUCA* MODIFICADAS A LOS IONES SODIO

La evaluación de la tolerancia a los iones sodio de las plantas TAP, TYC y de la especie *N. glauca* silvestre se llevó a cabo en condiciones de hidroponía. Para la realización del ensayo se preparó una solución salina de Na. Se preparó una solución control de agua destilada y una solución salina NaCl a dos concentraciones, para los dos siguientes casos prácticos:

- a) Caso de tierras sujetas a la influencia de aguas salobres situadas, por ejemplo, en la desembocadura de los ríos y estuarios: 125 mM,
- b) Caso de plantas sometidas directamente a la acción de agua de mar: - 500 mM

Las plantas wt, TaP y TYC, se ensayaron en estas soluciones hidropónicas. Las plantas se colocaron en un tubo y allí se dispuso la solución salina. Los resultados obtenidos son asombrosos, véase la Figura 22, donde se presenta la concentración de sodio acumulada en peso seco en la raíz de las diferentes líneas TYC, a las concentraciones de 125 y 500 mM de NaCl. En la Figura 22 se observa que la cantidad de Na⁺ absorbida por las plantas TYC en las raíces es superior al resto de genotipos analizados.

Sin embargo, los resultados obtenidos de cantidad total de sodio absorbido son aparentemente contradictorios, véase la Figura 23 donde se presenta la concentración total de sodio acumulada en raíz + tallo + hojas, i.e., en peso seco, en las plantas de las diferentes líneas a las concentraciones de 125 y 500 mM de NaCl; pues a 500 mM se invierte la tendencia, son algo inferiores en las plantas modificadas TAP y TYC con respecto a la planta silvestre *N. gl.*

Esto puede deberse a un factor cinético, puesto que la cantidad de sodio almacenada en las raíces de las líneas de las plantas TAP y TYC es muy elevada, la velocidad relativa de transporte hacia la parte aérea disminuye (limitaciones por la velocidad de difusión del sodio a través de la planta), ya que la planta debe adaptar sus mecanismos para distribuir el sodio por toda la planta hasta llegar a las hojas. Si hubiera durado más tiempo el experimento la cantidad de sodio en tallo y hojas sería superior, tal como sucede en el resto de líneas, en las cuales, al haber absorbido del medio una cantidad inferior de sodio, éste sí se ha podido distribuir por la planta durante los 10 días que ha tenido lugar el experimento llegando a la parte aérea. Este mecanismo físico-cinético propuesto se apoya en la interpretación de la Figura 23 de acumulación total. En efecto, lo más reseñable es que la cantidad total de Na es mayor en las TYC > TaP > wt, pues dada una concentración más de tres veces superior el gradiente de concentración hace que la acumulación total sea algo superior, aunque no sea proporcionalmente tal como es posible inferir de los resultados obtenidos para sólo las cantidades de las raíces.

REALIZACIÓN N°8. RESISTENCIA DE LA *NICOTIANA GLAUCA* MODIFICADA A LAS ENFERMEDADES

Con la finalidad de analizar la resistencia a enfermedades que presentan las plantas que poseen los genotipos de *N. glauca* silvestre (wt) y las modificadas genéticamente (TaP y TYC), se ha realizado un ensayo en sustrato de invernadero en el que se mide sus diferencias de sensibilidad a la agresión por dos agentes patógenos el hongo *Botrytis* y la bacteria *Pseudomonas syringae*

Para analizar dicha sensibilidad se mide el diámetro de necrosis presentado en las hojas de las diferentes plantas a los 5 días de la inoculación del hongo en el haz y el envés de las mismas. En la Figura 24 se presenta el diámetro de necrosis en diferentes genotipos de *Nicotiana glauca* infectada por el hongo *Botrytis*. En las plantas TAP se observa, que en casos de plantas grandes el diámetro de necrosis llega a alcanzar un máximo de 19,32 mm ocasionando la podredumbre de varias hojas de la planta tras 5 días de la infección.

Respecto a la infección por la bacteria *Pseudomonas syringae*, las plantas TYC presentan la misma resistencia a enfermedades que las plantas del genotipo silvestre wt. Se obtienen diámetros de necrosis similares entre estos dos genotipos. Esto es, sin duda, un resultado positivo, puesto que al modificar genéticamente una planta ésta normalmente pierde vigor y es más sensible a los agentes patógenos, lo que no ha ocurrido en nuestro caso.

REALIZACIÓN N°9. TOLERANCIA DE LAS PLANTAS DE *Nicotiana glauca* MODIFICADAS A TEMPERATURAS AMBIENTALES ELEVADAS.

Se evaluaron las plantas TAP, TYC y la *N. glauca* (wt) en experimentos llevados a cabo en cajas estériles depositadas en un medio sintético en fitotrones, los que permiten controlar adecuadamente la luz, humedad y temperatura. Los resultados, véase la Tabla a continuación, correspondientes a diversas condiciones climáticas y en presencia o no de iones Na, Pb y Cd, arrojan una supervivencia del 100%. Son especialmente esperanzadores y permiten recomendar el empleo de estas plantas en la fitorremediación intensificada de terrenos semidesérticos, sometidos a temperaturas elevadas y con frecuente contaminación por metales.

Tabla
Supervivencia de plantas wt, TAP y TYC en suelos a temperaturas extremas y en presencia de metales

Régimen climático	Medios cultivo	Genotipos (n° plantas/ plántulas)				Supervivencia (%)
		wt	TAP	TYC	Total	
Al'Aziziyah	Control (medio cultivo simple)	1	1	1	3	100
	Medio cultivo + 125 mM NaCl	1	---	1	2	100
	Medio cultivo + 1,5 mM Pb	1	1	1	3	100
	Medio cultivo + 0,05 mM CdCl	1	1	1	3	100
Hiroshima	Medio cultivo + 0,8 mM Pb	1	1	1	3	100
	Medio cultivo + 0,05 mM CdCl	1	---	1	2	100
	Medio cultivo + 0,1 mM CdCl	1	1	1	3	100
Dubai	(procedente del estudio de Hiroshima)					100

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Una de las características más importantes en la fitorremediación es la cantidad de biomasa que desarrollan las especies vegetales seleccionadas, aunque el aumento de la biomasa fue sorprendente al introducir los genes TaPCS1 y AtPCS1, como hemos indicado antes, se ha investigado el aumento de esta característica con otros genes y se descubrió que mediante la introducción del gen YCF, la producción de biomasa aumentaba en más de un 30%, por lo que añadiendo esta transformación a las obtenidas anteriormente con la introducción de los genes TaPCS 1 y AtPCS 1, se conseguiría un aumento total de la biomasa de las plantas muy importante, además de una fitorremediación que acortara el tiempo considerablemente. Se realizó un estudio comparativo del crecimiento en plantas de *Nicotiana glauca* modificadas genéticamente (GMOs) y sin modificar. Para ello, se partió de las siguientes líneas de plantas: wt L1, L7 y L3 transformadas con el gen YCF1. Se realizó un estudio del crecimiento de cada una de las líneas, evaluando primero el número de hojas de cada planta y, en un segundo experimento, la longitud

de las raíces. Se puede observar en la figura 5 el número de hojas que desarrollan las plantas sin modificar con este gen wt y las modificadas a los 26 días. En las plantas transformadas con el gen YCF1 se observan unos valores de crecimiento homogéneos dentro de las líneas, y además, superiores a los valores de las plantas wt en prácticamente todos los casos, como puede observarse en la figura 6 la longitud de las raíces a los 21 días. Dentro de cada grupo de líneas se observa un crecimiento radicular homogéneo, ya que no hay grandes diferencias en la longitud de las raíces de las líneas del mismo grupo. Las plantas transformadas con el gen YCF1 son las que presentan un mayor crecimiento radicular, siendo la longitud de sus raíces superior a de las plantas wt. Al estudiar los 3 casos conjuntamente se observa que los gráficos muestran un patrón de crecimiento común, es decir, en los 3 experimentos se ve que las líneas transformadas con el gen YCF1 proporcionan los mayores valores de crecimiento.

Se concluye que con las especies vegetales modificadas disminuyen de 100 a 200 veces el tiempo necesario para la descontaminación de suelos. La metodología utilizada para la introducción de los genes con los que se consigue incrementar la síntesis de fitoquelatinas es la siguiente: En primer lugar se incluyeron los genes en el plásmido adecuado para la especie vegetal.

El problema que se resuelve con este método es el de encontrar la especie vegetal ideal para la descontaminación de suelos, solucionando los problemas planteados anteriormente como son:

- Disminución del tiempo de la fitorremediación en 100 a 150 veces.
- Aumento de la producción de biomasa.
- Adaptación a diferentes condiciones climáticas y edafológicas.
- Aumento del rango de extracción de metales pesados.

Así, estas especies vegetales tendrán capacidad de adaptación a diferentes condiciones climáticas y edafológicas, produciendo una gran cantidad de biomasa, y acumulando elementos o mezcla de los mismos anteriormente clasificados en dos grandes grupos; nocivos y no nocivos. Dentro de los nocivos, con estas especies vegetales se pueden eliminar metales pesados como plomo, cadmio, mercurio, plata, boro, aluminio, hierro, manganeso, cobre, níquel y cromo. Elementos radiactivos como uranio, rodio, torio y plutonio, y elementos no nocivos como sodio, magnesio, litio, potasio, calcio, etc...

Además, la especie *N. glauca* modificada es una planta que se puede decir agradable a la vista.

CAMPOS DE APLICACIÓN DE LAS PLANTAS *NICOTIANA GLAUCA* WT, Y TYC

Propiedades de partida de la especie silvestre (wt) para su modificación genética:

- La especie *Nicotiana glauca* es una planta naturalizada y común en muchos espacios degradados de la geografía española y mundial. Por consiguiente, es una especie adaptada a un amplio rango de condiciones climatológicas y edafológicas, normalmente áridas y eventualmente contaminadas.

- Es una planta muy competitiva, vigorosa y de rápido crecimiento, tanto en situaciones normales como de exceso de sustancias contaminantes.
- Es una especie de marcada frugalidad, que se adapta con facilidad a suelos poco fértiles y con bajos niveles de humedad. Resiste, por tanto, muy bien el estrés hídrico y nutricional.

5

b) Plantas wt modificadas con los genes TaPCS1, YCF1 y CBP4 - superplantas TYC

La aplicación de las superplantas de la presente invención en suelos contaminados con distintas sustancias tóxicas comporta las siguientes ventajas de tipo técnico, económico y medioambiental:

10

1. **Descontaminación eficaz de bajo coste.** La mayoría de los métodos requieren tratamientos *ex situ* y ello conlleva la movilización de grandes cantidades de residuos tóxicos. Los tratamientos *in situ* con las técnicas convencionales no recuperan el suelo sino que inmovilizan o reducen la toxicidad de los metales sin eliminarlos del suelo, trasladando los suelos a zonas más seguras. Son soluciones poco viables económicamente y no recomendables desde un punto de vista medioambiental.

15

2. **Viabilidad económica y medioambiental de la descontaminación por *N. glauca* con los genes TaPCS1, YCF1 y CBP4.** Eficaz descontaminación económica *in situ*.

20

3. **Trazabilidad de la acumulación de contaminantes.** Perfecto control del número de individuos en comparación con el crecimiento descontrolado de los microorganismos del método biológico. Con bajo impacto sobre el medio ambiente. Solución real al problema de acumulación de iones de metales y sales.

4. **Fitorremediación intensificada de suelos de cultivo contaminados y/o abandonados.** Igualmente brinda una alternativa económica y eficaz.

25

5. **Liberación de suelos confinados.** Permite la reutilización de los depósitos de seguridad de dichos suelos.

6. **Revalorización de suelos contaminados.** Permite su conversión en suelos fértiles al cultivar de la *Nicotiana glauca* con el posterior aprovechamiento de ésta.

7. **Disminución de la desertificación y del efecto invernadero.** La disminución de la concentración del CO₂ atmosférico por su absorción en las plantas sembradas.

30

Aunque las realizaciones preferentes de la invención han sido descritas con unos detalles de modificación genética, unos materiales y unas formas de implementación y siembras determinadas, resultará obvio para los expertos en la técnica que se pueden hacer variaciones en las formas de modificación, materiales y detalles sin apartarse del ámbito de la invención, tal como se reivindica a continuación.

40

45

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método de fitorremediación de espacios degradados mediante especies vegetales modificadas genéticamente **que** comprende:
- a) Selección de especies vegetales que tengan capacidad de adaptación climatológica, edafológica, raíces profundas, capacidad de absorción de los elementos nocivos o sus mezclas, elementos no nocivos y/o sus mezclas, gran capacidad de reproducción, aspecto ornamental, extensión geográfica mundial y que no entren en la cadena trófica.
 - b) Modificación genética de dichas especies para aumentar significativamente su capacidad de producción de biomasa y de fitorremediación intensificada de espacios degradados.
 - c) Plantación de dichas especies en los espacios a recuperar, con una densidad de 1 a 70 especies por metro cuadrado.
- 2.- El método de fitorremediación de espacios degradados según la reivindicación 1, **caracterizado porque** las especies vegetales seleccionadas según el paso (a) son *Populus tremula x tremuloides* cv. *Etropole* para terrenos húmedos y *Nicotiana glauca* para terrenos secos
- 3.- Un método de modificación de la especie vegetal *Populus tremula x tremuloides* cv. *Etropole* para la fitorremediación intensificada de terrenos húmedos degradados, seleccionada según la reivindicaciones 1 y 2, **donde** los genes utilizados para la modificación genética de dicha especie vegetal *Populus tremula x tremuloides* cv. *Etropole* son los genes TaPCS1 y AtPCS1 en un primer paso, y el gen YCF en un segundo paso.
- 4.- Un método de modificación de la especie vegetal *Nicotiana glauca* para la fitorremediación intensificada de terrenos secos degradados, seleccionada según las reivindicaciones 1 y 2, **donde** los genes utilizados para la modificación genética de dicha especie vegetal *Nicotiana glauca* es el TaPCS1 en un primer paso, y el gen YCF en un segundo paso.
- 5.- Un método de modificación de especies vegetales para la fitorremediación intensificada de espacios degradados según la reivindicación 1 **caracterizado porque** dichas especies vegetales de partida para la modificación genética son especies silvestres, *wild type* (wt), seleccionadas entre espacios contaminados específicos; y **porque** dichas especies silvestres de partida se han modificado genéticamente por la inserción de los genes TaPCS1, YCF1 y CBP4 previamente a su siembra.
- 6.- El método de modificación genética de especies vegetales para la fitorremediación intensificada de espacios degradados según la reivindicación 5 **caracterizado porque** dicha modificación genética se realiza por la inserción del gen TaPCS1, obteniendo las plantas TAP, en un primer paso; y por la inserción conjunta de los genes YCF1 y CBP4, obteniendo las plantas TYC, en un único segundo paso, y en donde no se pierde dicho gen TaPCS1 previamente introducido ni sus características beneficiosas para la fitorremediación.

7.- El método de modificación genética de especies vegetales para la fitorremediación intensificada de espacios degradados según las reivindicaciones 5 y 6 **caracterizado porque** dichos tres genes se introducen en la *Nicotiana glauca* vía *Agrobacterium* (cepa EHA105), en donde en dicho un primer paso se expresa el gen de la fitoquelatina sintasa *TaPCS1* en las plantas de *Nicotiana glauca* por el que se obtienen líneas F3 homocigotas estables, las dichas plantas TAP; y porque las dichas plantas TYC se obtienen en dicho un único segundo paso por la inserción sobre dichas líneas F3 homocigotas del vector *pRAF9*, conteniendo los genes *YCF1* ("yeast cadmium factor") que codifican un transportador vacuolar de conjugados del glutatión de levadura, y conteniendo los genes *CBP4*, esto es genes *CNGC1* ("cyclic nucleotide gated channel") que codifican para un canal catiónico de la membrana plasmática de *Arabidopsis*.

8.- El método de modificación genética de especies vegetales para la fitorremediación intensificada de espacios degradados según las reivindicaciones 5 a 7 **caracterizado porque** dicho vector *pRAF9* se obtiene a partir de la inclusión de dichos dos genes *YCF1* y *CNGC1* en el vector binario *pGREEN0029* bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor y del terminador de la octopina sintasa, Tocs.

9.- El método de modificación genética de especies vegetales para la fitorremediación intensificada de espacios degradados según las reivindicaciones 5 a 8 **caracterizado porque** dicha modificación genética se realiza en un primer paso por la inserción del gen *TaPCS1*, por la que se obtienen las dichas plantas TAP; y consecutivamente en un segundo paso por la inserción del gen *YCF1* y en un tercer paso por la inserción del gen *CBP4*, por las que se obtienen las dichas plantas TYC; y en donde no se pierden dichos genes *TaPCS1* e *YCF1* previamente introducidos en la planta a modificar, ni sus características beneficiosas para la fitorremediación intensificada.

10.- El método de modificación genética de especies vegetales para la fitorremediación intensificada de espacios degradados según las reivindicaciones 5 a 9 **caracterizado porque** dicha modificación genética se realiza por la inserción del gen *YCF1* en un primer paso; y por la introducción conjunta de los genes *TaPCS1* y *CBP4* en un segundo único paso; por los que se obtienen las dichas plantas TYC; y en donde no se pierde dicho gen *YCF1* previamente introducido en la planta a modificar, ni sus características beneficiosas para la fitorremediación intensificada.

11.- El método de modificación genética de especies vegetales para la fitorremediación intensificada de espacios degradados según las reivindicaciones 5 a 10 **caracterizado porque** dicha modificación genética se realiza por la inserción al mismo tiempo de los genes *TaPCS1*, *YCF1* y *CBP4*, por el que se obtienen las dichas plantas TYC en un solo único paso, en donde no se pierden las características beneficiosas para la fitorremediación intensificada.

12.- Uso de especies vegetales modificadas para el aumento de la biomasa vegetal por unidad de área de suelos normales o degradados **caracterizado por** cultivar en condiciones de agricultura biológica o convencional dichos suelos con plantas de la especie *Nicotiana glauca* modificadas según las reivindicaciones 5 a 11 por introducción de los genes *TaPCS1*, *YCF1* y *CBP4* para la

obtención de las plantas TYC, y en donde dicho aumento de la biomasa vegetal siempre es mayor en las plantas portadoras de dichos tres genes *TaPCS1*, *YCF1* y *CBP4*, las dichas plantas TYC, que en las plantas portadoras solamente de dicho gen *TaPCS1*, las dichas plantas TAP.

5 13.- El uso de especies vegetales modificadas para la fitorremediación intensificada de espacios contaminados con metales de diferentes niveles de toxicidad **caracterizado por** cultivar dichos espacios contaminados con plantas de la especie *Nicotiana glauca* modificadas según las reivindicaciones 5 a 11 por la introducción de los genes *TaPCS1*, *YCF1* y *CBP4*, en donde la capacidad de acumulación de dichos metales de diferente toxicidad siempre es mayor en las
10 plantas con dichos tres genes *TaPCS1*, *YCF1* y *CBP4*, las dichas plantas TYC, que en las plantas portadores solamente de dicho gen *TaPCS1*, las dichas plantas TAP.

14.- El uso de especies vegetales modificadas para la fitorremediación intensificada de espacios contaminados con detergentes industriales, y domésticos iónicos o no iónicos **caracterizado por**
15 cultivar dichos espacios contaminados con plantas de la especie *Nicotiana glauca* modificadas según las reivindicaciones 5 a 11 por la introducción de los genes *TaPCS1*, *YCF1* y *CBP4*, dichas plantas TAP y TYC, o con plantas silvestres de la especie *Nicotiana glauca*, en donde para concentraciones de detergentes hasta 0,5% v/v la resistencia a los detergentes iónicos o no iónicos siempre es mayor en las plantas con dichos tres genes *TaPCS1*, *YCF1* y *CBP4*, las dichas
20 plantas TYC, que en las plantas portadores solamente de dicho gen *TaPCS1*, las dichas plantas TAP, y que en las plantas silvestres de la especie *Nicotiana glauca*.

15.- Uso de especies vegetales modificadas para la fitorremediación intensificada de espacios contaminados por vertidos accidentales o sistemáticos de petróleos crudos **caracterizado por**
25 cultivar dichos espacios contaminados con plantas de la especie *Nicotiana glauca* modificadas según las reivindicaciones 5 a 11 por la introducción de los genes *TaPCS1*, *YCF1* y *CBP4*, las dichas plantas TAP y TYC, o por cultivar dichos espacios con plantas silvestres de la especie *Nicotiana glauca*, en donde dicho cultivo se realiza para concentraciones de emulsión de petróleos crudos en agua hasta 0-0,5%, y porque la tolerancia al petróleo crudo siempre es mayor en las
30 plantas modificadas con dichos genes *TaPCS1*, *YCF1* y *CBP4*, las dichas plantas TYC y TAP, que en las plantas silvestres *wt* de la *Nicotiana glauca*.

16.- Uso de especies vegetales modificadas para la fitorremediación intensificada de espacios contaminados por vertidos accidentales o sistemáticos de solventes de hidrocarburos, o productos
35 ligeros, medios o pesados de la refinación de petróleos **caracterizado por** cultivar dichos espacios contaminados con plantas de la especie *Nicotiana glauca* modificadas según las reivindicaciones 5 a 11 por la introducción de los genes *TaPCS1*, *YCF1* y *CBP4*, las dichas plantas TAP, TYC o por cultivar dichos espacios con plantas silvestres *wt* de la especie *Nicotiana glauca*, en donde dicho cultivo se realiza para concentraciones de emulsión de gasolina hasta 5%; dicho cultivo se realiza
40 para concentraciones de emulsión de gasóleo hasta 0,50%; y dicho cultivo se realiza para concentraciones de emulsión de mezcla de aceites lubricantes usados hasta 10%.

- 17.- Uso de especies vegetales modificadas para la fitorremediación intensificada de espacios contaminados con iones sodio en condiciones de aguas salobres, infiltraciones de aguas marinas en suelos, **caracterizado por** cultivar dichos espacios contaminados con plantas de la especie *Nicotiana glauca* modificadas según las reivindicaciones 5 a 11 por la introducción de los genes *TaPCS1*, *YCF1* y *CBP4*, las dichas plantas *TAP*, *TYC*, o por cultivar dichos espacios con plantas silvestres de la especie *N. glauca* en donde dicho cultivo se realiza para concentraciones de ión sodio hasta 125 mM en aguas salobres, e incluso hasta 500 mM en infiltraciones de agua marina.
- 18.- Uso de especies vegetales modificadas para la fitorremediación intensificada de espacios degradados por enfermedades que afectan especies vegetales **caracterizado por** cultivar dichos espacios degradados por enfermedades, con plantas de la especie *Nicotiana glauca* modificadas según las reivindicaciones 5 a 11 por la introducción de los genes *TaPCS1*, *YCF1* y *CBP4*, las dichas plantas *TAP*, *TYC*, o por cultivar dichos espacios con plantas silvestres de la especie *N. glauca*.
- 19.- Uso de especies vegetales modificadas para la fitorremediación intensificada de espacios desérticos a temperaturas ambiente elevadas **caracterizado por** cultivar dichos espacios desérticos con plantas de la especie *Nicotiana glauca* modificadas según las reivindicaciones 5 a 11 por la introducción de los genes *TaPCS1*, *YCF1* y *CBP4* las dichas plantas *TAP*, *TYC*, o por cultivar dichos espacios con plantas silvestres de la especie *N. glauca* a dichas temperaturas promedios elevadas.

Características	M4	M15	M3	MT	UE*
pH	7.70	7.86	6.76		6 / 7
EC (dS m ⁻¹)	2.21	0.15	1.56		
CaCO ₃ (%)	28.0	15.0	-		
CEC (cmolc kg ⁻¹)	10.6	n.d.	-		
OM (%)	0.65	7.6	-		
Orgánico-C (g kg ⁻¹)	3.8	4.4	1.18		
Total-N (g kg ⁻¹)	0.3	0.6	0.073		
Fe (g kg ⁻¹)	53.1	n.d.	n.d.		
Mn (g kg ⁻¹)	1.6	n.d.	n.d.		
Cu (mg kg ⁻¹)	42	35	322		140
Pb (mg kg ⁻¹)	1572(35 3)	2345(17 9)	11.426	25000	300
Zn (mg kg ⁻¹)	2602(14 7)	1826 (7.7)	4539	12000	300
Ni (mg kg ⁻¹)	<2.0	27	32	n.d.	75
Cd (mg kg ⁻¹)	<0.2	0.3	60	70	3
Cr (mg kg ⁻¹)	<2.0	36	17	n.d	150
As (mg kg ⁻¹)	n.d.	n.d.	n.d.	13500	n.d.

Figura 1

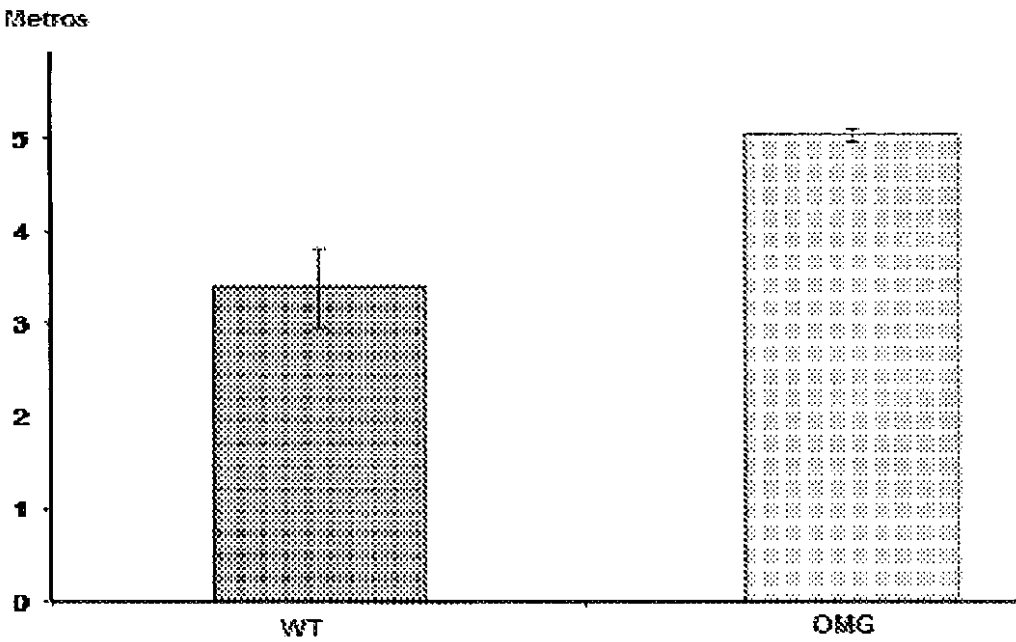


Figura 2

	Biomasa			Concentración (mg·Kg ⁻¹)				Acumulación (µg)		RCF		RCF	
	Peso (g)			Pb		Zn		Pb	Zn	Pb	Zn	Pb	Zn
	T	A	R	A	R	A	R						
Suelo M4													
wt	2.4	1.4(0.5)	1.0(0.2)	29(3)	330(23)	362(38)	307(25)	371	813	0.08	2.5	0.93	2.1
PTa3	4.4	2.5(0.3)	1.9(0.1)	35(4)	337(30)	382(31)	321(33)	728	1565	0.10	2.6	0.95	2.2
PTa5	4.2	2.3(0.2)	2.3(0.2)	28(5)	343(42)	394(37)	334(22)	648	1474	0.08	2.7	0.97	2.3
Suelo M15													
wt	6.8	4.6(0.2)	2.2(0.4)	5(1)	220(17)	258(38)	212(10)	507	1653	0.03	33.5	1.23	27.5
PTa3	6.5	4.0(0.3)	2.5(0.2)	9(3)	215(23)	268(29)	207(11)	574	1590	0.05	34.8	1.20	26.9
PTa5	5.9	3.4(0.2)	2.3(0.1)	7(3)	246(31)	273(25)	225(21)	590	1446	0.04	35.5	1.37	29.2

Figura 3



Figura 4

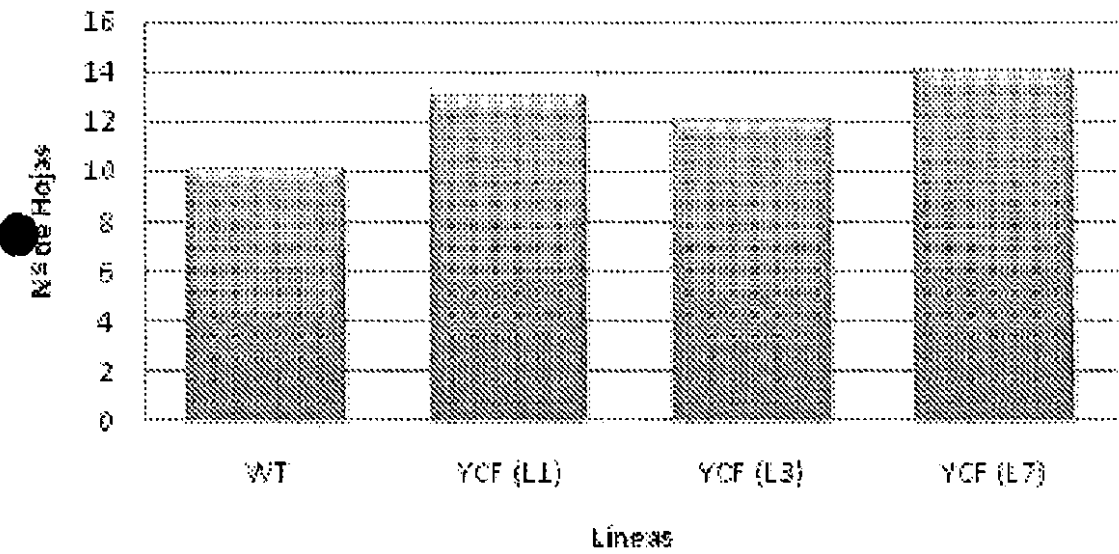


Figura 5

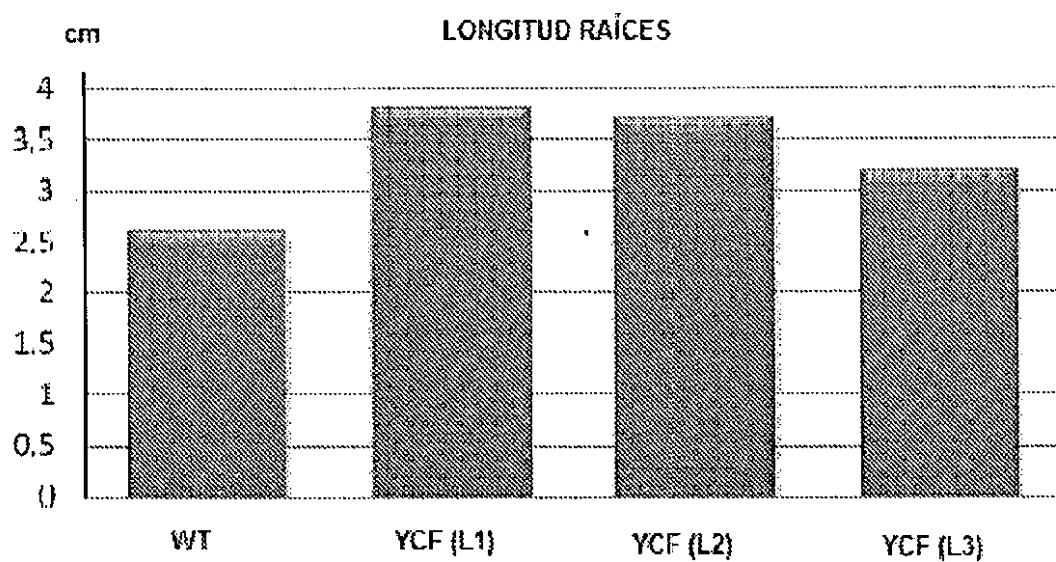


Figura 6

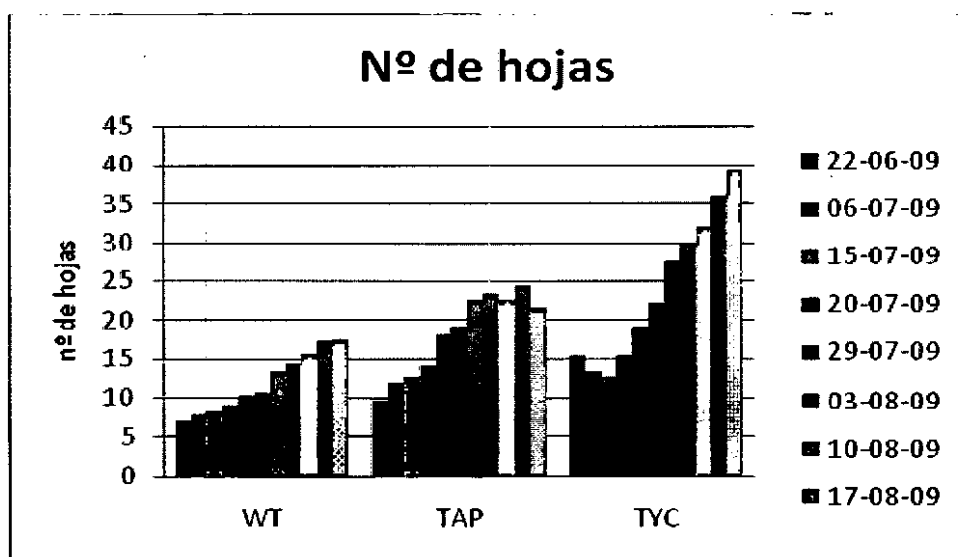


Figura 7

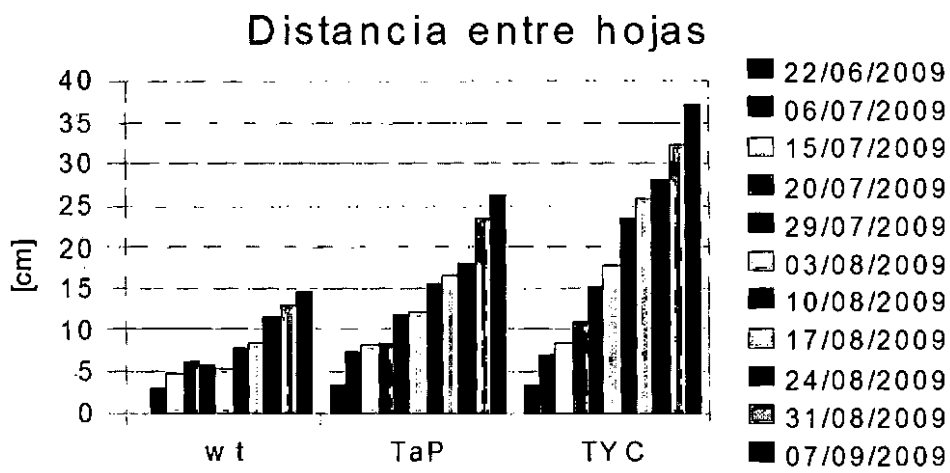


Figura 8

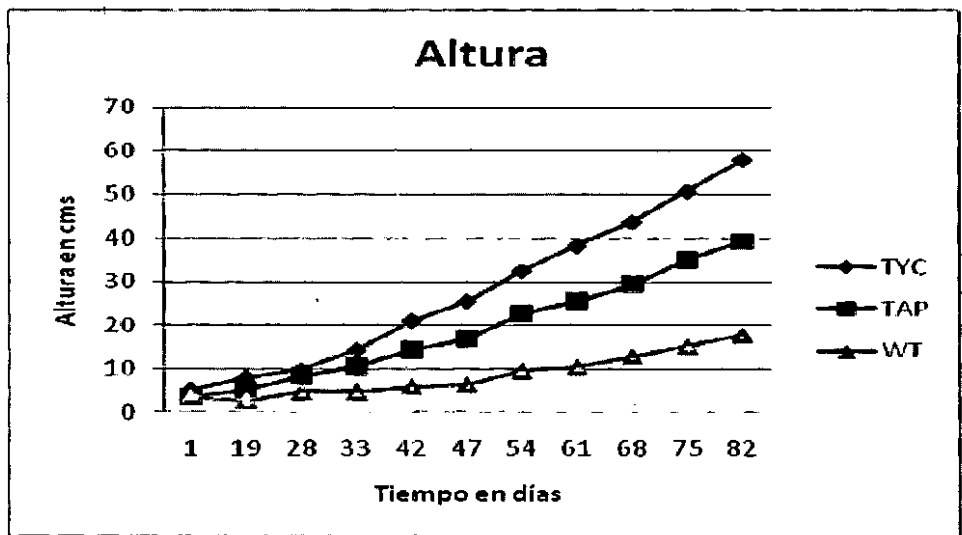


Figura 9

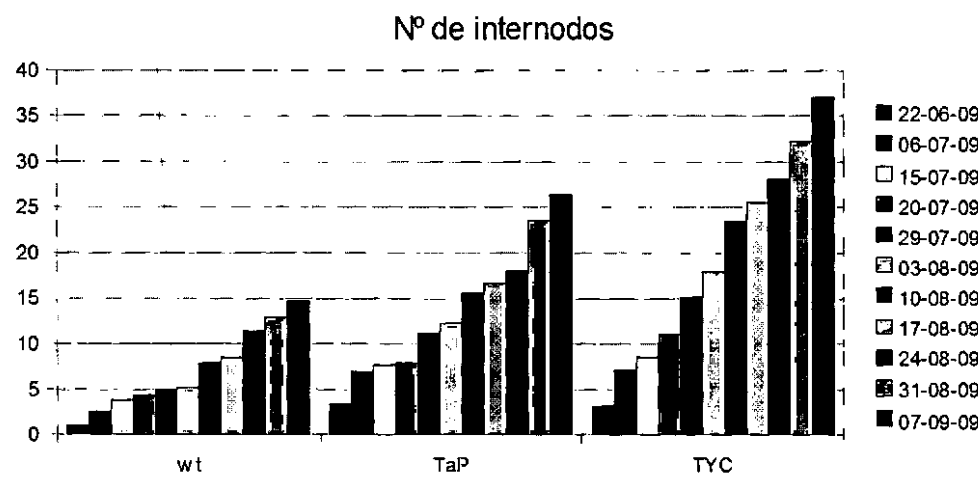


Figura 10

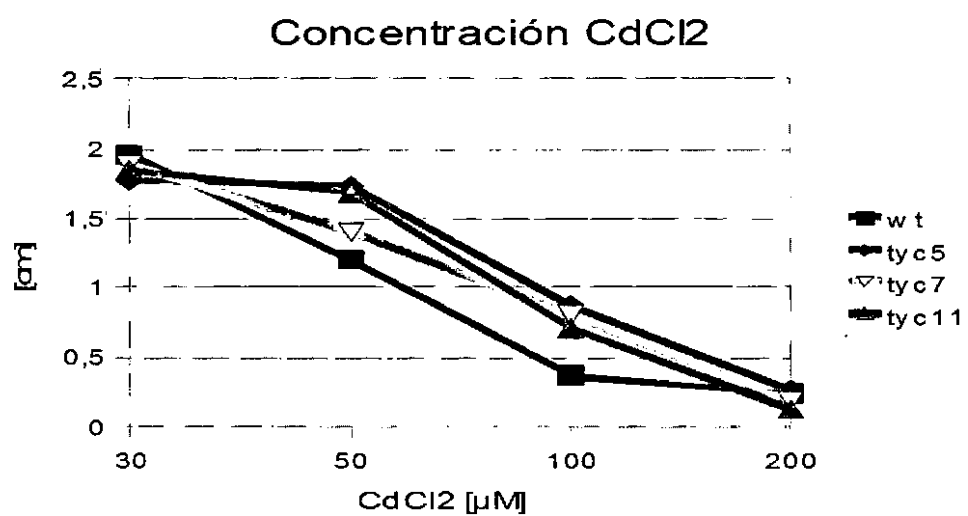


Figura 11

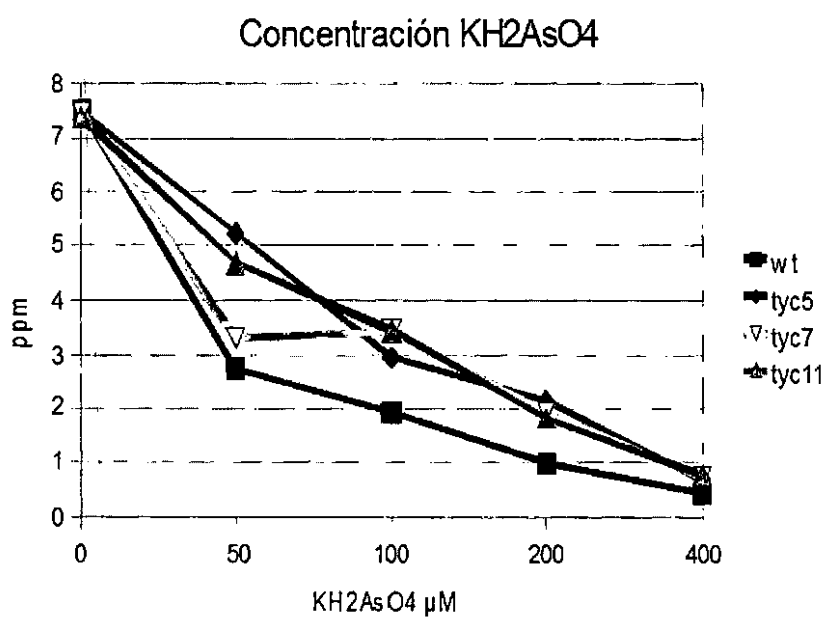


Figura 12

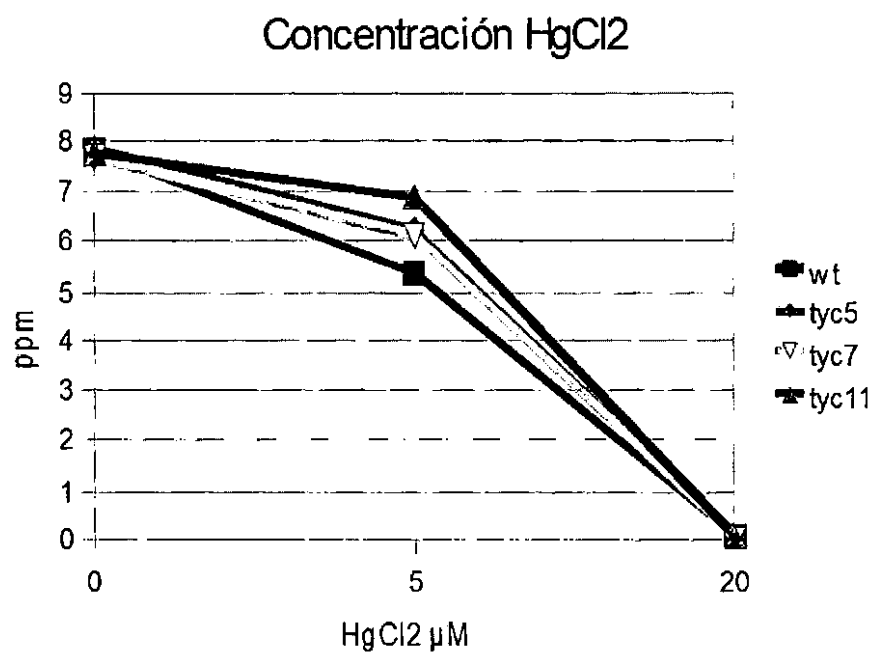


Figura 13

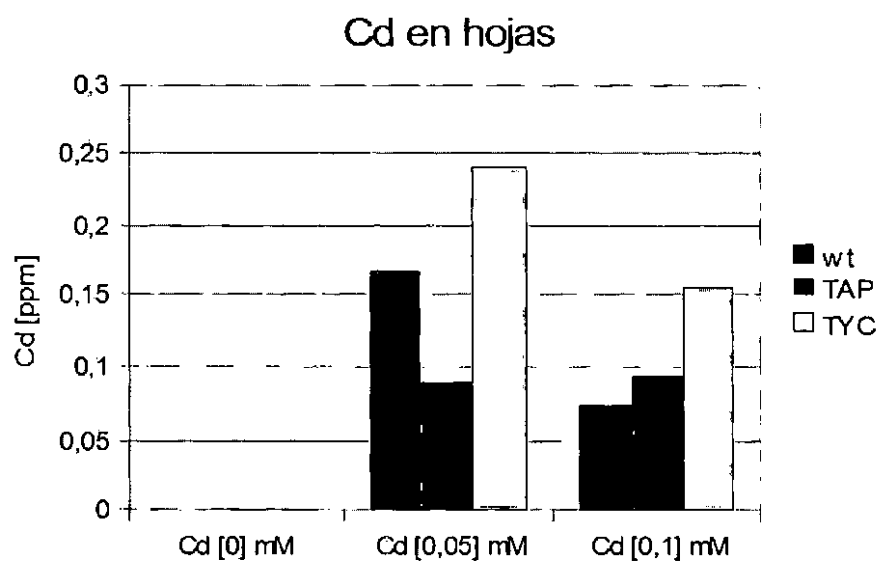


Figura 14

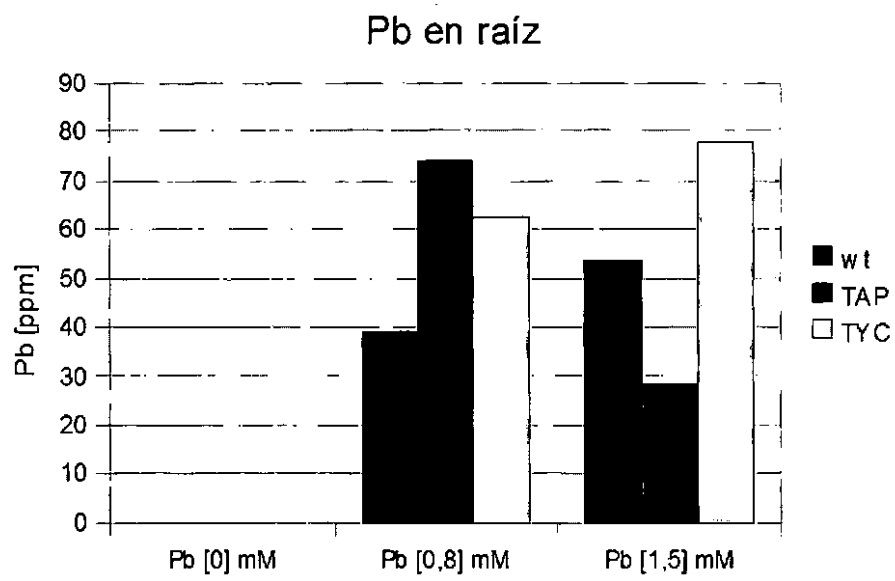


Figura 15

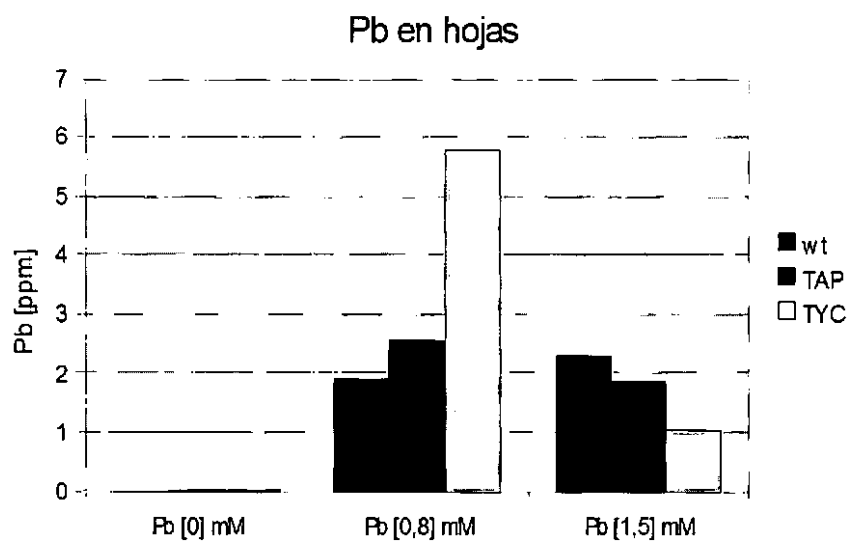


Figura 16

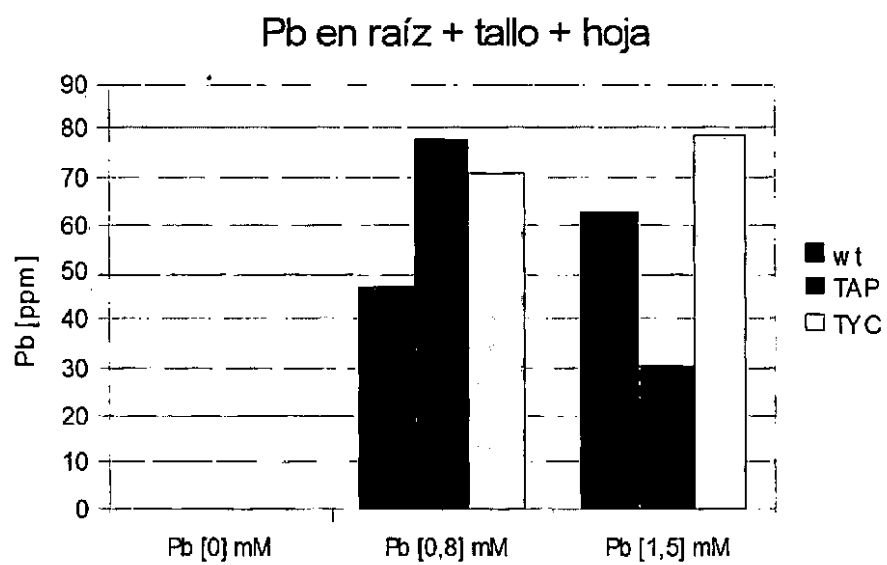


Figura 17

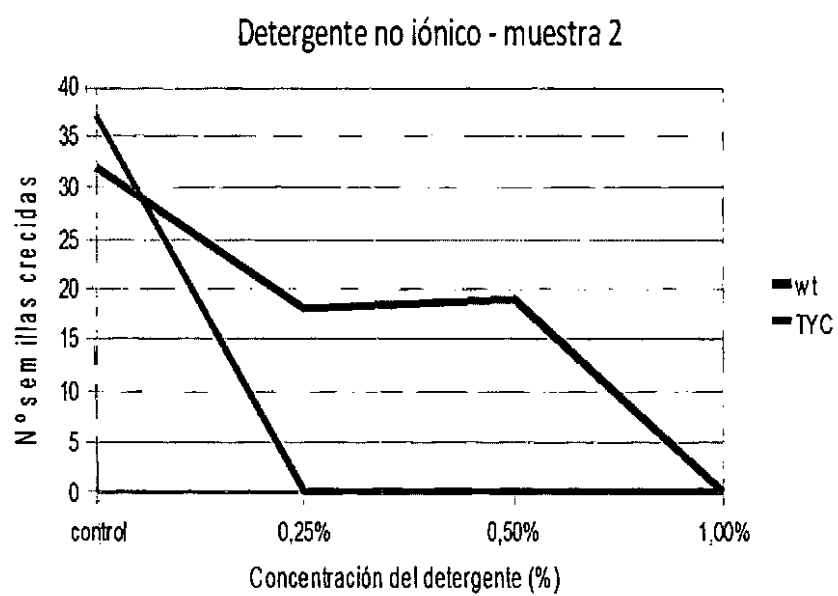


Figura 18

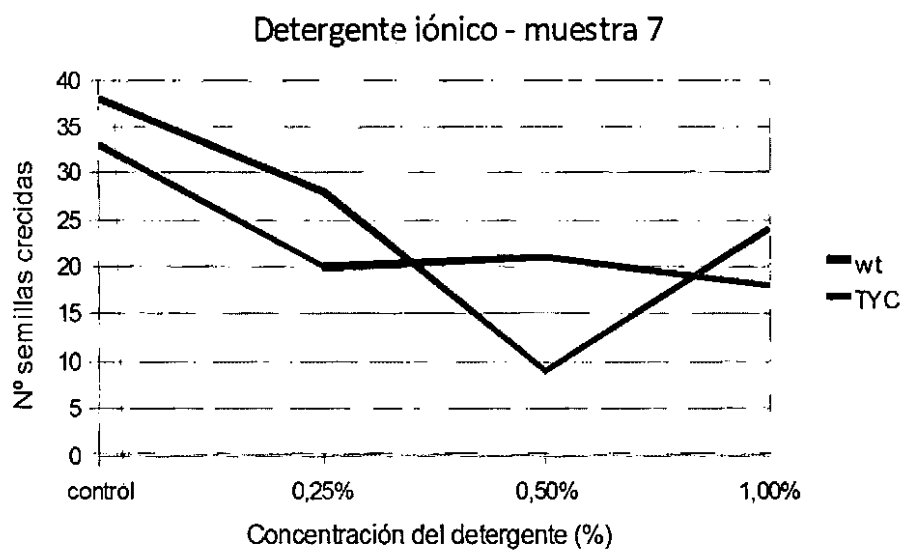


Figura 19

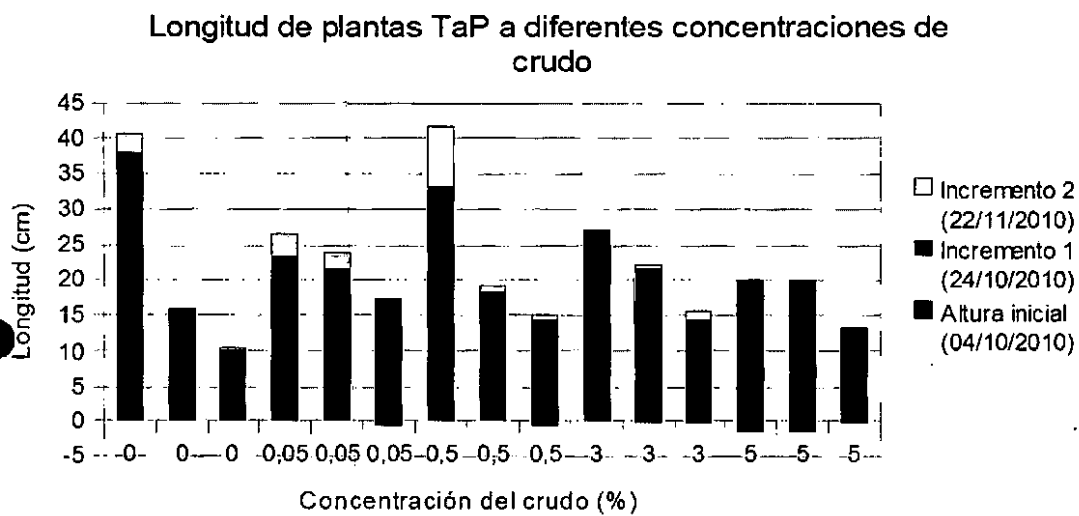
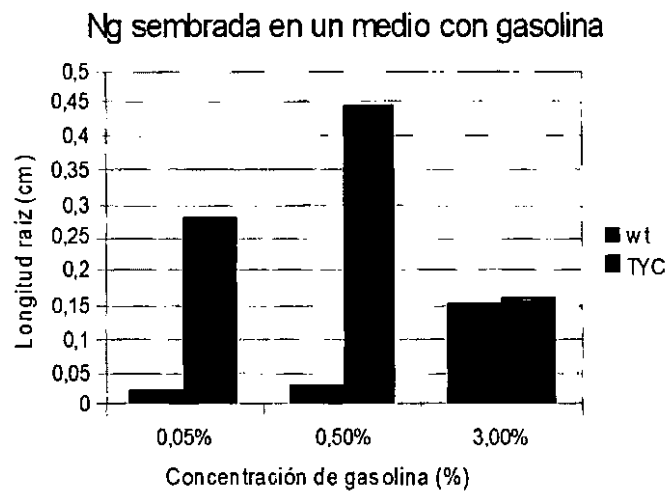
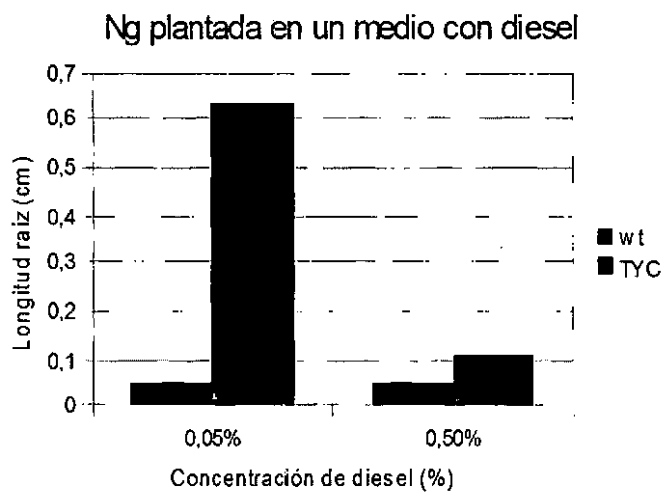


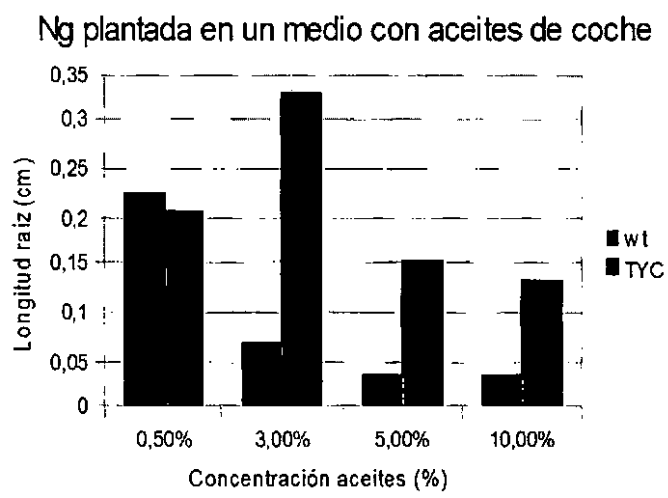
Figura 20



Figuras 21a



Figuras 21b



Figuras 21c

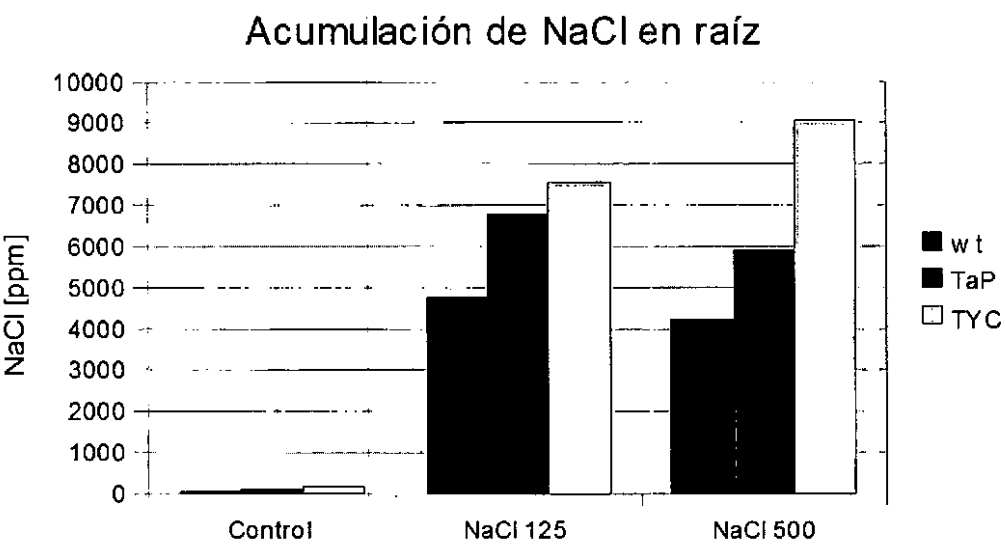


Figura 22

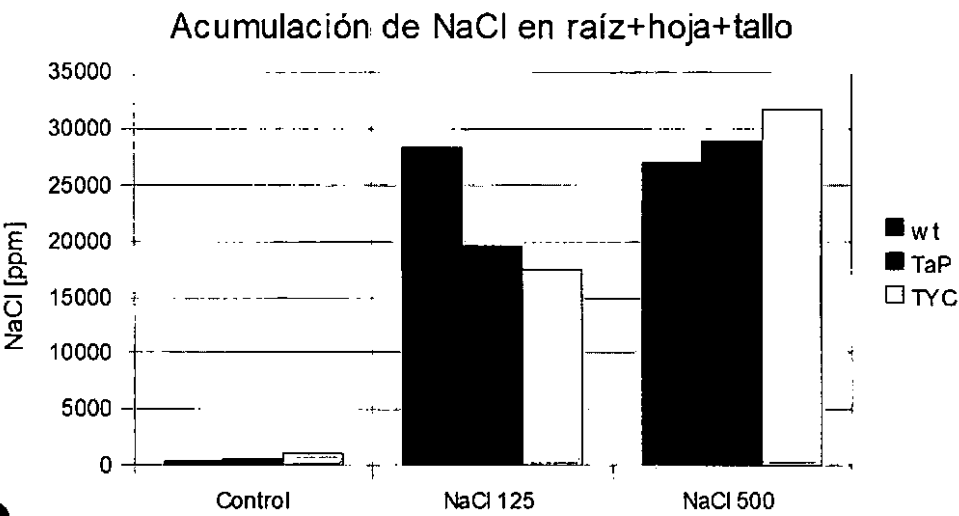


Figura 23

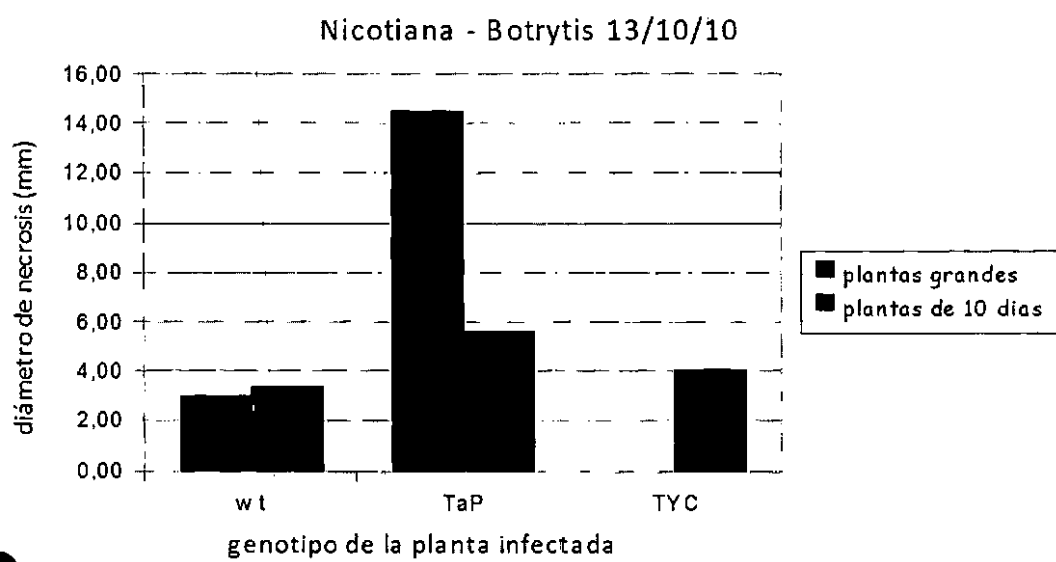


Figura 24

RESUMEN

La invención se refiere a la búsqueda, selección y modificación genética de especies vegetales silvestres, más aún consiste en la definición del efecto de la introducción de varios genes en las propiedades para la fitorremediación de las especies vegetales modelo *Populus tremula x tremuloides* cv. *Etropole* proposed para terrenos húmedos, y *Nicotiana glauca* para terrenos secos. Las especies de partida usadas para la modificación genética son del tipo *silvestre* (wt), seleccionadas entre espacios contaminados específicos. La modificación genética de la especie *Populus tremula x tremuloides* cv. *Etropole* consiste en la introducción de los genes *TAPCS1* y *AtPCS1*, y del gen *YCF* en una segunda etapa. La modificación genética de la *Nicotiana glauca* consiste en la introducción de los genes *TaPCS1* e *YCF*; o de los genes *TaPCS1*, *YCF1* y *CBP4*. La modificación aumenta la producción de biomasa; y al mismo tiempo la tolerancia a los elementos pesados o radiactivos de diferente toxicidad; a los detergentes industriales y domésticos; aumenta la tolerancia a los derrames de petróleo crudos y solventes hidrocarbonados, o a los productos de la refinación de petróleo, ligeros, medios o pesados; aumenta la fitorremediación de espacios contaminados con iones sodio en condiciones de aguas salobres, infiltraciones de agua de mar en los suelos; las especies propuestas aumentan la tolerancia a las enfermedades de las especies vegetales; y a la baja humedad y altas temperaturas ambientales de los espacios desérticos.

Mpx 3832

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 104488

Bogotá D.C., Octubre 25 de 2011 - 15:54:45

RECIBIDO DE : GOMEZ PINZON ASEMARCAS S.A. NI 830.121.797

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	186853052	25/10/2011	25.494.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-147166- -00000-0000

Fecha: 2011-10-31 15:01:58 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 50

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Octubre 25 de 2011 - 15:54:48

48

Mpex 3832

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
-/-



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 104471

Bogotá D.C., Octubre 25 de 2011 - 15:54:45

RECIBIDO DE : GOMEZ PINZON ASEMARCAS S.A. NI 830.121.797

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	186853052	25/10/2011	25.494.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNITARIO	Vr. CONCEPTO
5	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	27.000.00	135.000.00
				\$135.000.00

SON: **CIENTO TREINTA Y CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-147166- -00000-0000
Fecha: 2011-10-31 15:01:58 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 50

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: Info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Octubre 25 de 2011 - 15:54:47

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 106457

Bogotá D.C., Octubre 31 de 2011 - 14:52:00

RECIBIDO DE : GOMEZ PINZON ASEMARCAS S.A. NI 830.121.797

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	186853085	31/10/2011	108.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	108.000.00	108.000.00
				\$108.000.00

SON: **CIENTO OCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Resibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-147166- -00000-0000

Fecha: 2011-10-31 15:01:58 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 50

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Octubre 31 de 2011 - 14:52:01

50

PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO

☐ Indicación que se solicita una patente.

☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐ Descripción de la invención

☐ Dibujos de ser estos pertinentes

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒ Indicación que se solicita una PCT

☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☒ Dibujos de ser estos pertinentes

☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

☐ Indicación que se solicita Diseño industrial

☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐ Representación gráfica de un esquema de trazado

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐