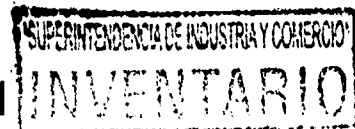


Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Organización y
Digitalización CSA Ltda



Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

de PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

09-111673

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO PLANTA DE TABACO MUTAGENIZADA COMO CULTIVO DE

SEMILLAS PARA LA PRODUCCION DE ACEITE PARA USOS ENERGETICOS,
INDUSTRIALES Y ALIMENTICIOS.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE AEP-ADVANCE ECOPOWER PATENTS S.A.

DOMICILIO LOCARNO, SUIZA

74. APODERADO JUAN CARLOS URIBE PRESTREPO

22. BOGOTÁ, D.C., OCTUBRE 08 | 2009

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-111673-00000-0000

Fecha: 2009-10-08 15:25:05 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Follos: 92

FORMULARIO ÚNICO

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE :

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☒ Capítulo I.☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE
(71)Nombre: AEP - ADVANCED ECOPOWER
PATENTS SADirección: VIA LUINI 12, CH-6600 LOCARNO,
SWITZERLAND

Nacionalidad o Domicilio: SUIZA

Lugar de Constitución: SUIZA

Teléfono: Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: JUAN CARLOS URIBE RESTREPO

Dirección: CALLE 93B No. 12 - 48, Piso 4o.

Teléfono: 601 9660 Fax: 611 4209

E-mail: tum@tumnet.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.159.313 TP 54.493

④

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: CORRADO FOGHER

Dirección: VIA TICINO 32, I-26041, CASALMAGGIORE CR., ITALIA

Nacionalidad o Domicilio ITALIA

⑤ PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2007-053412

Fecha 27/08/2007

Publicación Internacional No. WO/2008/110876

Fecha 18/09/2008

⑥

Título (54) PLANTA DE TABACO MUTAGENIZADA COMO CULTIVO DE SEMILLAS PARA
LA PRODUCCIÓN DE ACEITE PARA USOS ENERGÉTICOS, INDUSTRIALES Y ALIMENTICIOS.

⑦

Clasificación Internacional (51)

C12N 15/82 (2006.01); A01H 1/06 (2006.01)

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

ITALIA

(32) Fecha

14/03/2007

(31) Número de Solicitud

RM2007A000129

⑨

Comprobante de pago No.

Fecha

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

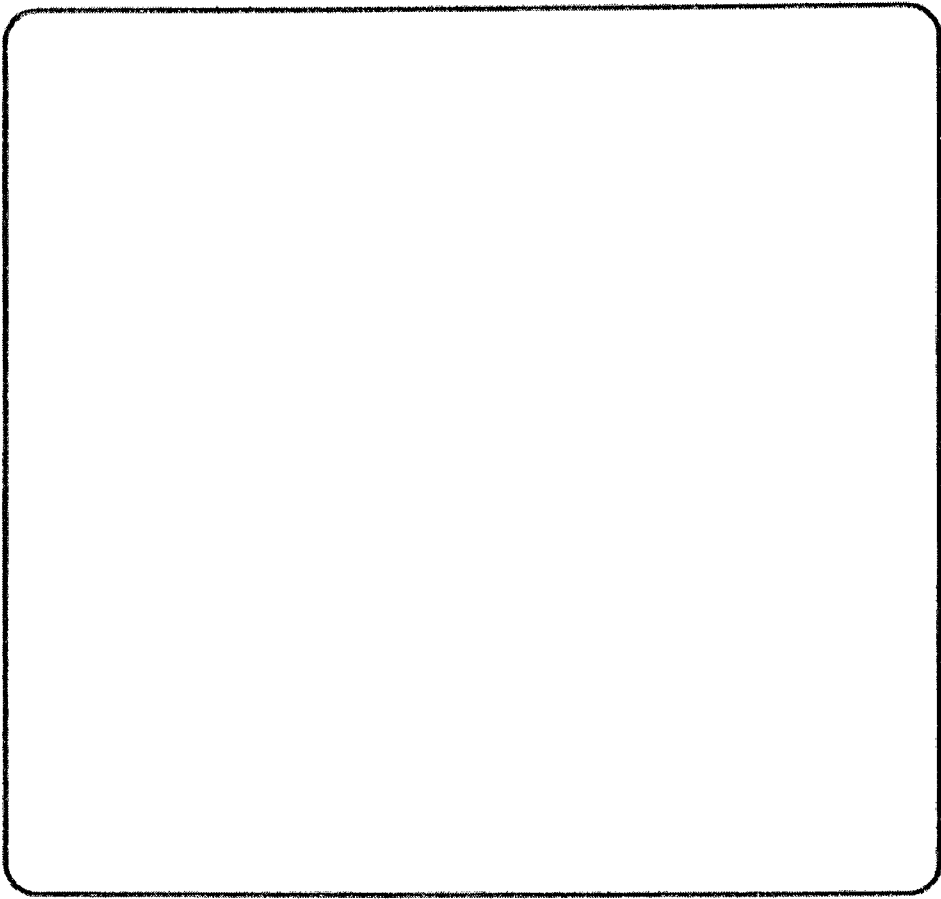
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredite 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 de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ 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 12x12.
- ☒ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos 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.
- ☒ Otros BÚSQUEDA INTERNACIONAL

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JUAN CARLOS URIBE RESTREPO

FIRMA: 

C.C. 79.189.313 T.P. 54.493

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 75,571
 FECHA : OCTUBRE 7 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-111673- -00000-0000

Fecha: 2009-10-08 15:25:05 Dep. 2020 NUECREACION
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONAL
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 92

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
TRIANA URIBE & MICHELSEN CONSIGNACION		BANCO DE BOGOTA	062754387	7127282	07/10/2009	740,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 75,573
FECHA : OCTUBRE 7 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-111673- -00000-0000

Fecha: 2009-10-08 15:25:05 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 92

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
TRIANA URIBE & MICHELSEN CONSIGNACION		BANCO DE BOGOTA	062754387	7127282	07/10/2009	740,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
8 50005-01-01 SOLICITUDES	*** REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL	200,000.00
	TOTAL :	\$ 200,000.00

SON: DOSCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

APLICACIÓN INTERNACIONAL

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
18 September 2008 (18.09.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/110876 A1

(51) International Patent Classification:
C12N 15/82 (2006.01) A01H 1/06 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/IB2007/053412

(22) International Filing Date: 27 August 2007 (27.08.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
RM2007A000129 14 March 2007 (14.03.2007) IT

(71) Applicant (for all designated States except US):
PLANTECHNO S.r.l. [IT/IT]; Via Staffolo 60, I-26041
Vicomosciano Cr (IT).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): FOGHER, Corrado
[IT/IT]; Via Ticino 32, I-26041 Casalmaggiore Cr (IT).

(74) Agents: PREDAZZI, Valentina et al.; Società Italiana
Brevetti S.p.A., Piazza di Pietra 39, I-00186 Roma (IT).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
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, SV, SY,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report

WO 2008/110876 A1

(54) Title: MUTAGENIZED TOBACCO PLANT AS SEED CULTURE FOR THE PRODUCTION OF OIL FOR ENERGETIC,
INDUSTRIAL AND ALIMENTARY USES

(57) Abstract: The present invention relates to the development of tobacco plants, modified through mutagenesis techniques, inter-
specific hybridisation followed by poliploidisation and recombinant DNA technologies, characterised by the fact of being capable of
producing a very high amount of seeds and their use for the production of oil for energetic and industrial scopes, such as combustion
oil, biodiesel and lubricating oil, and for animal and human alimentation.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/IB2007/053412

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

PREDAZZI, Valentina
Società Italiana Brevetti S.p.A.
Piazza di Pietra 39
I-00186 Roma
ITALIE

Date of mailing (day/month/year) 23 October 2007 (23.10.2007)		IMPORTANT NOTIFICATION	
Applicant's or agent's file reference BW477R/RVP			
International application No. PCT/IB2007/053412			
International publication date (day/month/year) Not yet published		International filing date (day/month/year) 27 August 2007 (27.08.2007)	
		Priority date (day/month/year) 14 March 2007 (14.03.2007)	
Applicant PLANTECHNO S.r.l. et al			

- By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
14 March 2007 (14.03.2007)	RM2007A000129	IT	24 September 2007 (24.09.2007)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Cecile Chatel
Facsimile No. +41 22 338 82 70	Facsimile No. +41 22 338 82 70 Telephone No. +41 22 338 92 22

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/IB2007/053412

From the INTERNATIONAL BUREAU

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

To:

PREDAZZI, Valentina
Società Italiana Brevetti S.p.A.
Piazza di Pietra 39
I-00186 Roma
ITALIE

Date of mailing (day/month/year)

18 June 2009 (18.06.2009)

Applicant's or agent's file reference

BW477R/RVP

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/IB2007/053412

International filing date (day/month/year)

27 August 2007 (27.08.2007)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant☐ the inventor☐ the agent☐ the common representative

Name and Address

PLANTECHNO S.r.l.
Via Staffolo 60
I-26041 Vicomosciano Cr
Italy

State of Nationality

IT

State of Residence

IT

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

AEP ADVANCED ECOPOWER PATENTS SA
Via Luini 12
CH-6600 Locarno
Switzerland

State of Nationality

CH

State of Residence

CH

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☐

the receiving Office

☐

the International Searching Authority

☐

the Authority(ies) specified for supplementary search

☐

the International Preliminary Examining Authority

☒

the designated Offices concerned

☐

the elected Offices concerned

☐

other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Santiago Hortensia

e-mail ro.ib@wipo.int

Telephone No. +4122 338 9588

Facsimile No. +41 22 910 06 10

Form PCT/IB/306 (January 2009)

1/D3G75JZ10

PCT REQUEST

Print Out (Original in Electronic Form)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form PCT/RO/101 PCT Request Prepared Using	PCT-SAFE Version 3.51.022.197 MT/FOP 20070701/0.20.5.10
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	International Bureau of the World Intellectual Property Organization (RO/IB)
0-7	Applicant's or agent's file reference	BW477R/RVP
I	Title of Invention	MUTAGENIZED TOBACCO PLANT AS SEED CULTURE FOR THE PRODUCTION OF OIL FOR ENERGETIC, INDUSTRIAL AND ALIMENTARY USES
II	Applicant	
II-1	This person is	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	PLANTECHNO S.r.l.
II-5	Address	Via Staffolo 60 26041 Vicomosciano CR Italy
II-6	State of nationality	IT
II-7	State of residence	IT

PCT REQUEST

Print Out (Original in Electronic Form)

III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	FOGHER, Corrado
III-1-5	Address	Via Ticino 32 26041 Casalmaggiore CR Italy
III-1-6	State of nationality	IT
III-1-7	State of residence	IT
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	PREDAZZI, Valentina
IV-1-2	Address	Società Italiana Brevetti S.p.A. Piazza di Pietra 39 00186 Roma Italy
IV-1-3	Telephone No.	+39 06 695441
IV-1-4	Facsimile No.	+39 06 69544830
IV-1-5	e-mail	brevetti.roma@sib.it
IV-2	Additional agent(s)	additional agent(s) with same address as first named agent
IV-2-1	Name(s)	DE BENEDETTI, Fabrizio; MOSCONI, Francesca; TONON, Gilberto; GERMINARIO, Claudio; PAPA, Elisabetta; DI CERBO, Mario; ROMANO, Giuseppe; BORRINI, Stefano; IACOBELLI, Daniele
V	DESIGNATIONS	
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.	
VI-1	Priority claim of earlier national application	
VI-1-1	Filing date	14 March 2007 (14.03.2007)
VI-1-2	Number	RM2007A000129
VI-1-3	Country	IT

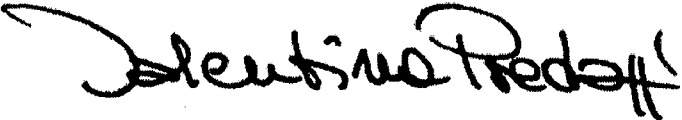
PCT REQUEST

Print Out (Original in Electronic Form)

VI-2	Incorporation by reference : where an element of the international application referred to in Article 11(1)(iii)(d) or (e) or a part of the description, claims or drawings referred to in Rule 20.5(a) is not otherwise contained in this international application but is completely contained in an earlier application whose priority is claimed on the date on which one or more elements referred to in Article 11(1)(iii) were first received by the receiving Office, that element or part is, subject to confirmation under Rule 20.6, incorporated by reference in this international application for the purposes of Rule 20.6.		
VII-1	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)	
VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	—	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	—	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	—	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	—	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	—	
IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	4	✓
IX-2	Description	25	✓
IX-3	Claims	4	✓
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	2	✓
IX-7	TOTAL	36	
	Accompanying Items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	—	✓
IX-17	PCT-SAFE physical media	—	—
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract		
IX-20	Language of filing of the international application	English	

PCT REQUEST

Print Out (Original in Electronic Form)

X-1	Signature of applicant, agent or common representative	
X-1-1	Name (LAST, First)	PREDAZZI, Valentina
X-1-2	Name of signatory	
X-1-3	Capacity	

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/EP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/B2007/053412

International filing date (day/month/year)
27.08.2007

Priority date (day/month/year)
14.03.2007

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C12N15/82 A01H1/06

Applicant
PLANTECHNO S.R.L.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Burkhardt, Peter

Telephone No. +49 89 2399-7456



DESCRIPCION EN INGLÉS

MUTAGENIZED TOBACCO PLANT AS SEED CULTURE FOR THE PRODUCTION OF OIL FOR ENERGETIC, INDUSTRIAL AND ALIMENTARY USES

DESCRIPTION

5 BACKGROUND ART

Tobacco has been cultured, in the beginnings, as an ornamental and as a medical plant, imposing itself subsequently as an essentially luxury good getting into human culture and modifying human customs and habits.

10 Tobacco has, amongst the agricultural plants, a position that is not comparable with other plant crops and presents certain peculiarities such as:

1. it is one of the few plants marketed only for its leaves;
2. it is the major non-alimentary plant in the world with a production extension higher than four million hectares in the whole world;
- 15 3. in many countries it is a very important instrument for economical and financial politic;
4. its consumption is based on the transformation of the leaves into smoking products, inhaling powders and chewable products;
5. considering its narcotic substance characteristics and its dangerousness for human health, there have always been attempts aimed to forbid its use and hence its
- 20 production.

The evolution of the *Nicotiana* genus into different habitats, initially through natural selection and poliploidisation and, later on, through human-driven selection, has brought to the appearance of a vast range of kinds, all selected on the basis of the leaf properties being the leaf considered as the only valuable part of the plant.

25 Recently, alternative uses of tobacco have been indicated in addition to the above-listed ones:

1. the production of alimentary proteins through purification thereof from leaves (Long R.C. 1979. Tobacco production for protein. Project n. 03245. North Carolina State university, Raleigh NC);
- 30 2. the extraction of pharmacologically useful active ingredients normally present in the leaves (Baraldi M. et al. 2004. Presenza di sostanze Benzodiazepino-simili in estratti di foglie di tabacco (*Nicotiana tabacum*). Atti Ist. Sper. Tab., 23 Aprile, Roma, pp.45-52);
3. the production of recombinant proteins expressed in the leaves or in the
- 35 seeds of genetically modified plants (Twyman et al. 2003. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. Trends Biotechnol. 21:570-578).

The tobacco plant presents a very large leaf area, a small inflorescence and a ratio aerial part:roots that is the highest observed among agricultural plants (Went, 1957. The experimental control of plant growth. pp. 343. Chronica Botanica, Waltham, Mass.).

40 Taking into account the economic relevance exerted by tobacco's cultivation, notwithstanding the alarming increase of tabagism amongst the youngest, Europe

provides grants for its cultivation giving rise to perplexity both of economical and ethical nature.

The European Commission on its internet site (www.ec.europa.eu/agriculture/publi/fact/tobacco) affirms: "there are no economically valid alternatives to this culture that does not use good soils. The incentives to tobacco's culture permits the survival of the rural tissue and produces an industrial activity that contributes to the survival of regions menaced by desertification".

The negative consequences, in environmental terms, of the use of fossil combustibles and the limited availability of petroleum, require the search of new energetic sources. Amongst these, biofuels are the best choice in a future perspective due to their renewability.

Considering biofuels of agricultural origin, up to date, the attention has focused on the production of bioethanol starting from simple (i.e. saccharose) or complex (i.e. cellulose) sugar producing plants. Model plants for such production have been identified in sugar cane, corn, wheat, potato, tapioca, sugar beet, barley, sorghum etc. The development of cultures aiming to the maximisation of the production of biomass to be transformed in ethanol through fermentation processes or for the production of biofuels or gas through gasification may have the same scope. Alternatively, the state of the art aims to the production of fuel oil and biodiesel starting from oleaginous or non oleaginous species but rich in oil such as soybean, sunflower, rape, peanut, flax, corn, sesame, palm, palm-kernel, coconut, ricinus etc.

The choice of the ideal species for the production of biofuels shall relate on the fulfilment of requirements such as:

1. determining a net energetic gain in the difference between culture's input and output, comprising in the said calculation the energetic costs for the production of the agricultural machinery and for the processing for the extraction and transformation/purification of the oil;
2. determining environmental benefits deriving from the supportability of the agricultural production, decrease of the CO₂ and particulate matter (e.g. PM-10) emission after combustion and limited use of agrochemicals such as pesticides herbicides and fertilizers;
3. being economically competitive and, possibly, determining social benefits that may increase the system's economy, e.g. by lowering indirect costs on the sanitary system, considering also that the fossil energy used at presents imposes environmental costs that are usually not in the cost determination; a biofuel shall envisage benefits both on the cost competitiveness side and on the environmental side;
4. being available in large quantities without decreasing the alimentary availability; the use of agricultural plants traditionally used for food production does not reasonably allow their use for the production of biofuels without determining a reduction of the food sources deriving from said plants hence increasing the costs of the raw materials;
5. the plant culture from which it derives shall possibly concern marginal

lands that are not likely to be used for alternative cultures.

In the state of the art the plants taken into account for oil production are: soybean (*Glycine max*), sunflower (*Helianthus annuus*), rape (*Brassica napus*), peanut (*Arachis hypogaea*), ricinus (*Ricinus communis*), flax (*Linum usitatissimum*), corn (*Zea mais*),
 5 sesamus (*Sesamum indicum*), palm (fruit, *Aracaceae*), palm-kernel (seed, *Aracaceae*), copra (coconut, *Cocos nucifera*), safflower (*Carthamus tinctorius*), olive (*Olea europea*), cotton (*Gossypium sp.*), acajou (*Anacardium occidentale*), hemp (*Cannabis sativa*), poppy (*Papavers sp.*), mustard (*Brassica sp.*), grape (*Vitis sp.*), apricot (*Prunus armeniaca*), pine (*Pinus sp.*), argan (*Argania spinosa*), avocado (*Persea americana*),
 10 almond (*Prunus amygdalus*), hazelnut (*Corylus avellana*), nut (*Juglans regia*), neem (*Azadirachfa indica*), niger (*Guizotia abyssinica*), jojoba (*Simmondsia chinensis*), rice (*Oryza sativa*), pumpkin (*Cucurbita sp.*), crambe (*Crambe abyssinica*).

On the contrary, in the prior art, tobacco has always been considered as an agricultural plant apt for the production of leaves.

15 The only three publications in literature, listed below, suggesting further uses for tobacco, take into account the present tobacco varieties, that have been selected for the production of leaves, as a source of the seed by-product for oil extraction.

In particular Giannelos et al. (Tobacco seed oil as an alternative diesel fuel: physical and chemical properties. Industrial Crops and Products, 2002, 16:1-9) declaring
 20 that "the seed is a by-product of the leaf production in Greece" suggest the possibility of using said seeds for the production of fuels describing methods for the extraction of oil form tobacco seeds that uses solvents, indicating, however, that the oil extracted from tobacco may not be used as such as biodiesel due the high iodine value in it.

Usta N. (Use of tobacco seed oil methyl ester in a turbocharged indirect injection
 25 diesel engine. Biomass and Bio-energy, 2005, 28:77-86) declares that tobacco seed oil is a by-product of the world production of leaves, estimates the worldwide production of seed deriving from tobacco's cultivation for leaves and describes the oil extraction from seed through the use of solvents.

Finally, Patel et al. (Production potential and quality aspects of tobacco seed oil. Tobacco Research, 1998, 24:44-49) estimate the production of tobacco seed as a by-
 30 product of leaves in India equal to 1,171 kg/ha with a content of oil of the 38% by weight and describe its extraction by the use of solvents.

The technological processes for oil extraction comprise mechanical (pressure) and chemical (solvents) techniques. In practice, the two systems are often combined. In
 35 general the mechanical extraction is carried out on seeds containing more than 20% of fat material (e.g. rape and sunflower) wherein the seeds dimensions are favourable for the pressing technique. Tobacco seed, by way of example, due to its very tiny dimensions, is subject to oil extraction by chemical treatments.

Generally, the possibility of extracting oil mechanically, facilitates the direct
 40 extraction in the seed production sites, hence also at the farm's level, with small plants.

For lower quantities of fat material chemical extraction is used, and can be applied also to the oilcake, leftover of the mechanical extraction, in order to recover the

remaining 6-12% of oil left after the mechanical treatment. The oils extracted by the use of solvents (e.g. hexane) prior to commercialisation for alimentary uses, require a refinement step. The main product of the extraction process is crude oil; the mechanical extraction further produces the protein oilcake whereas the chemical one produces flour. The latter, used in animal feeding, weights in a critical way upon the production and processing of oily seeds economy.

In certain cases the production is bound to the protein flour request (e.g. soybean). The crude oil may subsequently be rectified with a series of physicochemical treatments (e.g. pH adjustment, filtration, degumming, discolouration, etc.) depending on the intended use.

The mass balance of the entire process varies from species to species, by way of example considering a content in oil of 42% for the sunflower seeds, for a ton of seeds (that are the main product) 2.6 by-product (biomass) tons are considered, with a production of 420 kgs of crude oil, 580 kgs of oilcake, obtaining a final production of 390 kgs of refined oil and 30 kgs of process residuals. Taking into account that the average yield of sunflower seeds is about 2.6 t/ha (+/-15%) it can be calculated that the yield/hectare of oil is equal to about one ton. This relation is valid also for other species, in particular for rape, depending on the percentage in oil. Vegetable oils may be used directly as fuel oils for heat production (ovens or boilers) or mechanic energy production (engines), utilizing their gross calorific value that is about 8,500 kcal/kg or, after transesterification, transformed as biodiesel.

The use of vegetable oils in boilers may be carried out with conventional burners by substituting the industrial or the heating diesel oil with vegetable oil. This kind of solution appears quite interesting due to the fact that: (i) the price of substituted fossil fuel is often quite similar to the one of the automotive diesel oil and is subject to high excise duties; (ii) the use of oil in boilers requires the organisation of a very simple agroenergetic thread that can end directly in the rural environment, where the fuel producers and the fuel users can be located very near to each other or can even correspond. The higher or lower easiness of the oil extraction process is another important aspect to take into account when an local use of the biofuel is envisaged. The production economy and the more or less favourable energetic balance will depend mainly on the production per hectare of fuel oil.

The use of vegetable oils in diesel engines requires, on the other hand, a chemical process of transesterification with methanol and a certain fatty acid composition, which may be summarised in a iodine value that has to be equal or lower than 120. Vegetable oils are also often used for alimentary scopes. Depending on the plant, the productions can be mainly directed to alimentary or energetic scopes, or both.

On the light of the above mentioned problems, it would be highly desirable to recycle tobacco's industry for ecological scopes and harmless for human beings.

The identification of an alternative and economically valid use of tobacco does hence constitute a clear worldwide economically interesting topic.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention discloses the realisation of tobacco plants suitable for a very high production of a particular component of the plant: the seed. Said plants have been realized through somatic *in vitro*, chemical or physical mutagenesis techniques and/or by interspecific crossbreeding and subsequent chromosomal duplication. Said plants are optionally further modified by genetic engineering techniques. The tobacco's plant selection in the state of the art has always been directed towards the leaf as final product, the focusing of the attention and, hence, the plants selection for the maximisation of the seeds production has never been suggested before and allows the use of tobacco in order to maximise the production of seed to the detriment of the leaf production.

It has been surprisingly found that the selection of tobacco plants, carried out using non biological techniques of chemical, physical and somatic *in vitro* mutagenesis techniques, of crossing also between different species, followed by the induction of amphidiploids and, optionally by recombinant DNA techniques, has allowed to obtain tobacco plants presenting the following characteristics:

- they present the ideal characteristics for the transformation of the tobacco agricultural plant from a plant of leaf production to a plant for seed production;
- they have the capability of producing seeds up to values of from 20 quintals/hectare, to 50 quintals/hectare, or to 70 quintals/hectare, or even to 90 quintals/hectare with the possibility of further improvements in the yield of seed/hectare;
- they present a seed oil content up to 38% of the seed weight, or up to 40%, or up to 48%, or up to 52% or up to 58% or even up to 60%;
- they have a low necessity of agronomical inputs for the defence against parasites and weeds.

Furthermore, completely unexpectedly, due to the small dimensions of the tobacco seed that is, amongst the cultivated plants, one of the smallest seeds, the present invention shows that it is possible to extract oil from the seed by pressing reaching extraction yields that are about the 80% of the total oil present in the seed, about the 90% of the total oil present in the seed or even about 95% of the total oil present in the seed, thus granting the possibility of carrying out the extraction also in small plants for farms use.

Hence, object of the invention are tobacco plants that are mutagenised and/or obtained by interspecific crossing followed by diploidisation and selection, characterised in that they produce a seed quantity equal to at least 20 quintals/hectare, said plants optionally further modified by genetic engineering, the use of said plants for the production of seeds, for the manufacturing of oil and derivatives thereof, the use of said plants for the production of biomass for the biochemical or thermo chemical conversion, the method of producing and selecting said plants, the seeds of said plants and their use for the manufacturing of oil and derivatives thereof, the oil deriving from said seeds, the biodiesel obtained from said seeds, food supplement derived from tobacco, solid fuels comprising the oilcake resulting from pressing tobacco seeds, the method for oil extraction from tobacco seeds by pressing.

DETAILED DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1. General characteristics of the tobacco plant realised through chemical mutagenesis, intra and interspecific crossing, poliploidisation, selection, induction of somaclonal variability, genetic transformation, aimed to maximise the seed production per surface unit, with a high oil content and having characteristics suitable for the use as energetic source, for industrial uses and for human and animal nutrition. Principal induced and selected characteristics: deep and wide radical apparatus; thin and erected lanceolate leaves; robust stalk at the basis with long internodes; cob-like inflorescence compact, wide or columned; short pedicellate, non-dehiscent capsules, di- or multi-valve, straight apex, with at least 5000 seeds/capsule; oval or elliptical seeds of a length > than 1 mm; plant height between 50 and 120 cm, insect resistance, herbicides resistance, fungi resistance, drought resistance, variable ratio among the fatty acids components.

Figure 2. Example of the product oil and oilcake obtained from tobacco seed by pressing with a screw-press mod. Komet (IBG). After pressing the oil has been filtered in paper and presents high limpidity characteristics.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention, hence, relates to the realization of plants of the *Nicotiana* genus, as ideal plants for the production of seed from which fuel oil, biodiesel, proteins, oil for zootechnical use, for industrial use, for human alimentary use is obtained.

The varieties of the *Nicotiana* genus that may be used as parental plants for the carrying out of the plants of the invention may be, by way of example, comprised among the following species: *N. tabacum*, *N. rustica*, *N. glauca*, *N. paniculata*, *N. knightiana*, *N. solanifolia*, *N. benavidesii*, *N. cordifolia*, *N. raimondii*, *N. thyrsiflora*, *N. tomentosa*, *N. tomentosiformis*, *N. otophora*, *N. setchellii*, *N. glutinosa*, *N. undulata*, *N. arentsii*, *N. wigandioides*, *N. trigonophylla*, *N. palmeri*, *N. sylvestris*, *N. langsдорffii*, *N. alata*, *N. forgetiana*, *N. bonariensis*, *N. longiflora*, *N. plumbaginifolia*, *N. repanda*, *N. stocktonii*, *N. nesophila*, *N. moctiflora*, *N. tomentosiformis*, *N. otophora*, *N. setchellii*, *N. glutinosa*, *N. petunioides*, *N. acaulis*, *N. ameghinoi*, *N. acuminata*, *N. pauciflora*, *N. attenuata*, *N. miersii*, *N. corymbosa*, *N. linearis*, *N. spagazinii*, *N. bigelovii*, *N. clevelandii*, *N. nudicaulis*, *N. maritima*, *N. velutina*, *N. gossei*, *N. excelsior*, *N. megalosiphon*, *N. exigua*, *N. goodspeedii*, *N. ingulba*, *N. stenocarpa*, *N. occidentalis*, *N. rotundifolia*, *N. debneyi*, *N. benthamiana*, *N. fragrans*, *N. suaveolens*, *N. obtusifolia*.

According to the present invention, the plant will be achieved by means of mutagenesis techniques that will allow to develop plants capable of producing a quantity of seeds higher than the average with respect to the starting individuals. Mutagenesis may be induced by standard chemical and/or physical treatment techniques of tobacco seeds, or also by *in vitro* culture for the induction of somaclonal mutants. The higher production of seed may be obtained also by generating hybrid plants produced by interspecific crossing followed by diploidisation of the chromosome set (in order to obviate to the sterility events displayed by interspecific hybrids) by chemical treatment with colchicine. The plants produced by interspecific crossing may be further

mutagenised by chemical and/or physical standard techniques.

Once the mutants are obtained, they will be selected for the seed production character, so to isolate and select plants producing at least 20 quintals of seed per culture hectare.

5 According to the present invention, the plant will be hence realised starting from seeds produced by:

1. crossing between individuals of the same species or
2. crossing between individuals of different species having the same chromosome number (e.g. *N. tabacum* x *N. clevelandii*) as such or wherein said crossing is followed
10 by embryo culture methods and poliploids induction by treating with the mutagen colchicine, using techniques well known to the skilled in the art, in order to obtain amphidiploids or,

3. crossing between individuals of different species having a different chromosome number (e.g. *N. tabacum* x *N. trigonophylla*) followed by embryo culture
15 methods and poliploids induction by treating with the mutagen colchicine, using techniques well known to the skilled in the art, in order to obtain amphidiploids.

As indicated above, when there is no induction of diploidisation, as in the cases 1 and 2, the seeds will be mutagenised by chemical and/or physical techniques, when
20 mutation of the chromosome number is induced by diploidisation, as in cases 2 and 3, the selection may be carried out on said mutated seeds so produced or on said seeds further mutagenised by chemical and/or physical techniques. Standard mutation techniques known to the skilled person may be used, such as, by way of example, the treatment of the seed with Ethyl Methane Sulfonate (EMS) (e.g. in aqueous solution at a 0.5% concentration) and living EMS in contact with the seed for variable times e.g. as
25 indicated in example 1, or, as already said with colchicine, so to induce poliploidisation, by X or Gamma radiations performed in suitable fields or, anyhow, following any protocol available in literature used for plant mutagenesis and for performing large scale screenings. The so treated seeds will be allowed to germinate and the plants of the M₂ generation will be selected on the basis of the following characteristics: inflorescence
30 shape, number of capsules, number of seeds per capsule, seed dimensions, leaf shape, dimensions of the root apparatus, bearing of the leaf, etc.

According to the present invention, plants having the following characteristics will be selected: plant height 80-120 cm, leaf with thin lamina and straight bearing, compact inflorescence, number of flowers higher than 100, number of capsules higher
35 than 100, number of seeds per capsule higher than 5000, lignified and strong stalk, deep roots.

The quantity of seeds produced by the selected plants will be than verified in open field and only the plants producing at least 20 quintals of seed/hectare at a seeding density of about from 125,000 to 250,000 plants/hectare will be selected.

40 By chemical and physical mutagenesis and by somatic mutagenesis, mutants of different classes are obtained, hence increasing the probability of finding the desired variants. As an example, a mutant with a lanceolate leaf having an erect bearing allows

the increase of the seeding density without compromising the light reception that is important for the photosynthetic activity and hence to increase the seed production per ha. By way of example, a mutant having a deeper root apparatus allows a better anchorage and nourishment of the plant. As an example, a mutant with a compact inflorescence and a higher number of capsules allows to increase the quantity of seed produced by every single plant.

The present invention encompasses the thus obtained and selected plants producing a seed quantity higher or equal to 20 quintals/hectare. The plants of the present invention are modified in order to produce a seed quantity up to 90 quintals per cultivated hectare, hence 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 quintals per cultivated hectare against the 10-12 normally produced by the tobacco plants selected for the leaf production.

The plants of the invention may be obtained also by induction of somatoclonal variants, wherein the above indicated seeds may be treated with sodium hypochlorite and then with 70% ethanol, from the plants germinated from said seeds leaf parts are taken and the formation of calluses is induced and reproduced for variable times *in vitro* is hence induced from said parts. From said calluses plants having variable characteristics such as: inflorescence shape, number of capsules, number of seeds per capsule, seeds dimensions, leaf shape, dimensions of the root apparatus, leaf bearing, seed production, oil content of the seed, fatty acid composition of the oil, protein content of the seed etc. regenerate, said plant being selectable on the basis of the above mentioned parameters.

The plants of the invention may further be selected for the presence of characteristics such as: percentage of oil content of the seed, fatty acid composition of the oil, protein content of the seed, etc.

The above described plants may further be modified by recombinant DNA techniques in order to obtain further advantageous characteristics, in case said characteristics were not already present in the selected mutants, such as: increase in the percentage of the oil content of the seed, variable fatty acid composition depending on the uses envisaged for the oil, insects resistance, herbicides resistance, fungi resistance, etc.

For the genetic transformation of the plants of the invention vectors suitable for plant cells transformation may be used as well as expression cassettes allowing the in plant expression of the genes of interest. Depending whether the genes of interest are to be expressed in the green part of the plant (i.e. genes for parasites or herbicides resistance) or in the seeds (e.g. genes involved in the fatty acids metabolism) vectors known in the art, ensuring the expression of said genes in the organs of interest may be selected. Hence, vectors with constitutive promoters known in the state of the art, or with inducible promoters, e.g. by the parasites attack or in the forming capsule may be used. In particular, as the plants of the invention are selected for the high seed production and, being the product of said seed of particular interest, vectors comprising seed specific expression cassettes that will guarantee the expression of the heterologous

inserted genes in the seeds of the plant of the invention will be particularly suitable.

For the genetic transformation the *Agrobacterium tumefaciens* or physical DNA transfer systems may be used.

5 In an embodiment of the invention, it will be particularly advantageous to realise plants presenting not only a high seed productivity but also insect resistance, herbicides resistance, fungi resistance, drought resistance, this will allow to reduce significantly the cultivations inputs, thus increasing the culture productivity and reducing the environmental impact.

10 In this case vectors comprising the kanamycine resistance gene as marker, regulating regions allowing the constitutive expression (e.g. 35S or the ubiquitin promoter) of the genes of interest such as the cry gene of *Bacillus thuringiensis*, the *aroA* gene of *Salmonella typhimurium*, the Rpt1 gene of *N. obtusifolia*, may be used. Said genes allow, in the same order, the production of plants resistant respectively, to: insects, herbicides, fungal diseases and may be introduced according to standard gene transfer techniques known to the skilled person.

15 Resistances can be introduced following one or more transformation events with several vectors or, alternatively, due to the fact that plants may be very easily crossed, the resistances can be introduced singularly in different individuals of the same selected variety and subsequently assembled together in the same individual by crossing.

20 In this case it will be easy to obtain homozygosis for all the characters by duplication of haploids obtained from *in vitro* anthers cultures.

The genetic transformation can be carried out in an analogous way for metabolic engineering purposes aimed to the increase of the amount of oil accumulated in the seeds and to the fatty acids metabolic pathway modification. In this case, it is possible to use regulating regions with seed specific activity such as the globulins promoter, and directing the enzymatic proteins to the endoplasmic reticulum where they can be stabilise inserting a specific signal, such as KDEL, or where from there can be translocated to plastids, inserting amino acid specific signals, e.g. the leader sequence of the small RuBisCO subunit.

30 By way of example, the oil quantity and the fatty acids composition of the same, may be modified by modifying the expression of genes coding for enzymes such as, merely by way of example, acetyl-CoA carboxylase (ACCase), diacyl-glycerol acyltransferase (DGAT), lysophosphatidate acyl transferase (LPAT), Phosphatidate phosphohydrolase (PAPase) acyl protein carrier (ACP), malonyl-CoA:ACP transacylase, ketoacyl-ACP synthase (KAS), ketoacyl-ACP reductase, 3-hydroxyacyl-ACP dehydrase, enoyl-ACP reductase, stearoyl-ACP desaturase, acyl-ACP thioesterase, glycerol-3-phosphateacyltransferase, 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, cytidine-5-diphosphate-diacylglycerol synthase, phosphatidyl glycerophosphate synthase, phosphatidyl glycerol-3-phosphate phosphatase, FAD1-8 desaturase, phosphatidic acid phosphatase, monogalactosyl diacyl glycerol synthase, digalactosyl diacyl glycerol synthase, sulpholipid biosynthesis protein, long chain acyl-coA synthase, glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT), diacylglycerol cholinephospho transferase,

phosphatidylinositol synthase, acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase, acyl-ACP desaturase, lineoyl desaturase, sphingolipid desaturase, oleate 12-desaturase, fatty acid acetylenase, fatty acid epoxigenase, diacylglycerol kinase, cholinephosphate cytidyl transferase, choline kinase, phospholipase, phosphatidylserine decarboxylase, 5 phosphatidylinositol kinase, ketoacyl-CoA synthase, CER transcription factor, oleosin, 3-ketoacyl-CoA thiolase, acyl-CoA dehydrogenase, enoyl-CoA hydratase, acyl-CoA oxidase.

According to the invention, an increase in the total seed oil content can be obtained determining an over expression of the tobacco Acetyl CoA carboxylase or the 10 same enzyme of another species (e.g. rape). As an example, a variation in the fatty acid profile and hence in the iodine number, can be obtained by silencing through the expression of antisense constructs, the gene coding for oleate desaturase of the plastid and of the endoplasmic reticulum. The expression or the silencing of one or more of said genes in the seeds of the plants of the invention, results in the fact that the oil produced 15 by said seeds can be directly used for the production of biodiesel, as it has a iodine number inferior or equal to 120.

The expression of said genes can also affect the percentage of oil in the seed and the plants of the invention can be further selected for the seed's oil content that can be equal to about 38% of the seed weight, the 40%, the 48%, the 52%, the 58% and even 20 the 60%.

The above mentioned genes can be introduced in vectors for the seed specific expression such as the ones described in patent application WO03073839 following the teachings disclosed in said application. The expression vector used for the said embodiment will hence be a vector comprising: a. a promoter of a plant gene specific for 25 the expression in the seed storage organs; b. a DNA sequence coding for the signal sequence of a plant protein capable of direct the product of the gene of interest into the seed storage organs via the endoplasmic reticulum; c. a DNA sequence coding for said gene of interest deprived of the native signal sequence; d. a stop signal. The promoters and the leader sequences may belong, e.g., to the 7S soybean globulin or to the beta conglycinin soybean gene, or to genes coding for tobacco seed storage proteins. 30

The above mentioned genes can be introduced following one or more transformation event, or by transformation with several vectors, or, alternatively, as plants may be easily crossed, said genes may be introduced singularly in different individuals of the same selected variety and subsequently grouped together in the same 35 individual through crossing.

In this case it will be easy to obtain the homozygosis for all the characters by duplication of haploids obtained by *in vitro* anther cultures.

25

Table 1. Content in fatty acids of some tobacco varieties selected only after mutagenesis, or engineered and selected in order to change the fatty acids metabolic pathway, and selected for the stability of the character. The table points out the result obtained with mutagenesis and the genetic intervention carried out by introducing some of the listed genes in order to change the acidic composition; the oil of the three last columns has a iodine title suitable for the transformation of said oil into biodiesel.

Component	PLT 103	PLT 256	PLT 318	PLT 335
Palmitic Acid	6,31%	8,26%	7,15%	17,20%
Palmitoleic Acid	0,11%	0,18%	0,18%	1,25%
Stearic Acid	2,58%	5,20%	8,50%	12,50%
Oleic Acid	12,62%	22,58%	25,56%	53,27%
Linoleic Acid	77,48	58,78%	52,00%	6,45%
Linolenic Acid	0,65%	4,15%	5,25%	7,80%
Arachidic Acid	0,13%	0,85%	0,80%	0,85%
Eicosanoic Acid	0,13%	0,58%	0,56%	0,68%

Object of the invention are also the seeds of the plants as described above, that, being mutant plants' seeds, will be as well mutant and will thus contain DNA modifications that will make them differ from wild type seeds. Moreover, as indicated above, said seeds can have a different chromosome number compared to the parental plants (e.g. poliploids) and in most cases will also be transformed with the above mentioned vectors.

When the transformation is made with vectors expressing genes related to the fatty acids metabolism listed above, said seed will also be characterised in that it contains an oil having a iodine title lower or equal to 120 and an oil percentage comprised between the 38% and the 60% of the seed's total weight.

Object of the present application is also the method for the production of the plant of the invention comprising the following steps:

- a) seed produced by starting crossings between individuals of the same species belonging to wild type or selected varieties are subject to mutagenesis;
- b) said seeds are allowed to germinate and the plants of the M2-M4 generations are selected according to the following parameters:
 - i) presence of characteristics that manifest at the phenotypic level selected in the group comprising height of the plant of 80-120 cm, leaves with thin lamina and straight bearing, compact inflorescence, number of flowers higher than 100, number of capsules higher than 100, number of seed per capsule higher than 5,000, strong and lignified stalk, deep roots;
 - ii) stability of the selected character in generations after the M2 generation;

iii) testing of the heritability of the selected character ;

c) the seeds selected at point b) are allowed to germinate and plants are regenerated starting from the callus obtained from the *in vitro* induced leaf mesophyll in the presence of phytohormones, the plants maintaining the characters selected at point b) in R0-R2 generations are selected;

d) the plants selected at point c) are seeded in open field and plants producing at least 20 quintals per hectare are selected.

In the method described, the plants obtained at point a) can also be obtained by

a') carrying out interspecific crossings in the *Nicotiana* genus, followed by the backcrossing of the F1 or by the induction of amphidiploids by treatment of the vegetative apex with colchicine.

The plants obtained with the above described methods may be submitted to further steps e) and/or f) and to a passage g) as indicated below:

e) genetic transformation of the plants obtained at point a-d or a'-d with vectors comprising expression cassettes expressing in plant genes for insects, herbicides and/or fungal diseases resistance selected in the group comprising the cry gene of *Bacillus thuringiensis*, the aroA gene of *Salmonella typhimurium*, the Rpt1 gene of *N. obtusifolia* and selecting the thus transformed plants in the T0-T4 generations for the for insects, herbicides and/or fungal diseases resistance;

f) genetic transformation of the plants obtained at point a-d or a'-d with one or more vector comprising expression cassettes expressing in seed genes of the fatty acids metabolism selected in the group comprising, acetyl-CoA carboxylase (ACCase), diacylglycerol acyltransferase (DGAT), lysophosphatidate acyl transferase (LPAT), phosphatidate phosphohydrolase (PAPase) acyl protein carrier (ACP), malonyl-CoA:ACP transacylase, ketoacyl-ACP synthase (KAS), ketoacyl-ACP reductase, 3-hydroxyacyl-ACP dehydrase, enoyl-ACP reductase, stearoyl-ACP desaturase, acyl-ACP thioesterase, glycerol-3-phosphateacyltransferase, 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, cytidine-5-diphosphate-diacylglycerol synthase, phosphatidyl glycerophosphate synthase, phosphatidyl glycerol-3-phosphate phosphatase, FAD1-8 desaturase, phosphatidic acid phosphatase, monogalactosyl diacyl glycerol synthase, digalactosyl diacyl glycerol synthase, sulfolipid biosynthesis protein, long chain acyl-coA synthase, glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT), diacylglycerol cholinephospho transferase, phosphatidylinositol synthase, acil-CoA diacylglycerol acyltransferase, acyl-ACP desaturase, lineoyl desaturase, sphingolipid desaturase, oleate 12-desaturase, fatty acid acetylenase, fatty acid epoxygenase, diacylglycerol kinase, cholinephosphate cytidyl transferase, choline kinase, phospholipase, phosphatidylserine decarboxylase, phosphatidylinositol kinase, ketoacyl-CoA synthase, CER transcription factor, oleosin, 3-ketoacyl-CoA thiolase, acyl-CoA dehydrogenase, enoyl-CoA hydratase, acyl-CoA oxidase, followed by selection of the plants in the T0-T4 generations for characteristics such as total oil content of the seed and fatty acid composition of the same;

g) crossing of the materials obtained at points a-f or a'-f and selecting the

resulting progenies for characteristics such as: high seed productivity, high oil content in the seed, variable fatty acids oil composition depending on the intended use, insects resistance, herbicides resistance, fungal resistance.

5 The plants at points comprised between b. and f. may, by way of example, be selected for the presence of characteristics that can be pointed out by chemical analysis such as the total oil content of the seed and/or the content in single acidic components of the seed and/or the protein content of the seed.

10 A further object of the invention is a method for extracting oil from tobacco seeds wherein the oil yield is equal to values of 70 to 95% of the oil contained in said seeds comprising the following steps:

a) mechanically extracting of said oil by pressing producing oil and a residual oilcake;

b) filtering said oil produced in step a) with paper or cloth filters.

15 The above indicated method has, surprisingly, a yield higher than 70%, which is a totally unexpected yield after using said pressing methods on seeds as small as the tobacco ones. In the present invention, wherein plants having a high seed production are selected with the aim of increasing the tobacco oil production per plant, the discovery that the pressing method applied onto tobacco seeds has a yield comparable to the yield obtainable on large sized seeds, has extremely advantageous applications.

20 Besides the lower production costs and the totally unexpected yields given the state of the art, said method allows to extract tobacco oil directly in the sites where it can be used for energetic scopes.

25 In one embodiment, the seed of the invention can be subject to cold pressing using a screw-press or another kind of press, loaded with the seeds. The press may reach temperatures up to about 60°C when it is steady operating and the oil pressed from the seed is collected and filtered on paper or with cloth filter-press. Other pressing systems suitable for seeds may be used for pressing tobacco seeds.

30 In order to further improve the yield of the method of the invention, where the oil productivity from the seed is to be exploited at its maximum, it is possible to perform a further step of

c) chemically extracting with solvents the residual oil present into the oilcake obtained at point a).

35 Table 2. Characteristics of the tobacco oil obtained by pressing the seed and filtering. The table points out the higher gross calorific value, the low sulphur content, the low viscosity when compared to other vegetable oils.

Determination	Result	Mis. Un.	Methods
Flash point	236.0	°C	UNI EN ISO 27 19 2005
Sulphur	<0.01	%m/m	ISO 8754 1992
Ashes	0.005	%m/m	EN ISO 6245 2002
Viscosity at 50°C	21.630	mm2/s	UNI EN ISO 3104 200

Melting point	-18	°C	ISO 3016 1994
Calorific value	9,670	Kcal/Kg	ASTM D240-97
Volumic mass at 15°C	925.0	Kg/m3	UNI EN ISO 3675 2002
Saponification value	193.6	mg KOH/g	ASTM D94-02

It is also object of the invention the use of the plants of the invention and/or of their seeds for the production of liquid or solid fuels, biodiesel, industrial lubricants, plastic materials such as linoleum, dietary supplements for animal feeds, dietary supplements for human use.

The plants of the invention, in fact, do show characteristics that are extremely advantageous for the production of said products as:

- they produce an oil obtained by pressing that is ideal, also without refinement as a simple filtering is sufficient, to be used as combustible oil as it has a clear aspect, a cinematic viscosity at 40°C of 29.11 mm2/s and at 50°C of 21.63 mm2/s and a sulphur content lower than the 0.01%, entering in a class with very good physical and thermodynamic characteristics;

- they produce an oil, obtained from pressing the seed that, even in the simplest embodiment of the invention, hence without the transformation for the expression of genes of the fatty acids metabolism indicated above, may be used for the production of biodiesel once mixed, e.g., with 25% of palm oil, or with other vegetable oil percentages having a lower iodine title, in order to lower the iodine value under the value 120 and that, in the embodiment comprising the expression of one or more of said genes, with the aim to change the fatty acids metabolism, can be directly used for transforming it in biodiesel, having a iodine number equal to 120, or better equal to 100, or even better, equal to 80;

- they produce an oilcake, resultant from the pressing of the seed, having an oil content variable from about 6 to 12% and a protein content of about 35%, which is ideal for the dietary supply of animal feeds given its high content of omega 6 fatty acids (linoleic acid);

- they produce an oilcake resultant from the pressing of the seed that, as an alternative to its use as animal feed, may be used as solid combustible in coal or biomass' pellet working plants due to its calorific value higher than 4,950 KCal/kg;

- they produce an oil with a flashpoint of 236°C and a melting point of -18°C thus being suitable for use as non polluting lubricant, e.g. for chainsaw chains, or as lubricant in general;

- they produce an oil that, taking into account its composition abounding in polyunsaturated fatty acids (C18:2, PUFA) that are essential for humans and are hence requested for healthiness scopes (omega 6), may be used as food or as dietary supply for humans;

- they produce a residual biomass (leaves, stalks, inflorescences, capsules' coating) after the seed harvest, that may reach values of 100 quintals per hectare or,

better, of 200 quintals per hectare or, even better, of 300 quintals per hectare with the possibility of further improving the yield per hectare;

- they produce a residual biomass that may be used for the uses normally ascribed to it, such as, e.g., gasification, combustion, pyrolysis, anaerobic digestion, fermentation or steam explosion, thus contributing to ameliorate the economical yield of the culture.

Consequently, object of the invention is the use of the plants of the invention in general for the large-scale production of tobacco seeds.

Object of the invention is the use of the said plants and/or seeds for the production of tobacco oil.

Also object of the invention is the use of the plants and/or the seeds for the preparation of tobacco-oil-based or essentially tobacco-oil-consisting fuels for boilers or diesel engines.

In a particularly advantageous embodiment of the invention, said tobacco oil is obtained with the pressing method of the invention and not by solvent extraction.

The extraction method of the invention, in fact, allows the production of an oil that is directly usable as fuel due to the fact that said oil has a kinematic viscosity of 29.11 mm²/s at 40°C and of 21.63 mm²/s at 50°C which allows to nebulise it into burners without the need of a fluidifying pre-heating treatment.

A further object of the invention is the use of the plants and/or the seeds of the invention for the preparation of biodiesel by admixing tobacco's seeds oil with, e.g., 25% of palm oil or with other percentages of plant oils reducing the iodine final title. The production of biodiesel according to the invention may be carried out admixing the tobacco oil extracted with the above described method (pressing) with plant oils capable of lowering its iodine title to a value equal or lower than 120.

Also object of the invention is the use of the plants and/or seeds of the invention for the preparation of tobacco's seeds oil having a iodine title equal or lower than 120 without carrying out any procedure aimed to reduce the iodine title on the oil extracted according to the method of the invention. In this embodiment of the invention, transgenic plants and/or transgenic seeds expressing one or more genes, among the ones listed above, of the fatty acids metabolism according to the invention producing a tobacco oil having a iodine title equal or lower than 120 will be used.

In this case, hence, no refining or treating process of the oil will be carried out after the pressing according to the invention, in order to lower the iodine title of the oil thus obtained. The biodiesel according to the invention may hence have a composition of 100% tobacco oil. The biodiesel will be obtained from the tobacco oil according to the normal transesterification procedures with methanol known to the person skilled in the art.

In an embodiment of the invention the biodiesel will consist entirely of tobacco oil having a iodine title lower than 120, or even equal or lower than 100, or even equal or lower than 80, said oil being transesterified with methanol according to the methods known to the skilled person.

Object of the invention is also the use of the plants and/or the seeds of the invention for the preparation of solid fuels for coal or biomass pellets functioning plants. In this case the biomass resulting from the cultivation may be used, said biomass having a calorific value higher than 4,200 KCal/kg.

5 Object of the invention are also the fuels obtainable as indicated above, i.e. fuels comprising the oilcake obtained from tobacco's seeds pressing.

 Alternatively, the plants and/or the seeds of the invention, may be used for the preparation of dietary supplements for animal feeds. The oilcake resulting from the pressing of tobacco's seeds according to the invention, has an oil content from about the
10 6% to about the 12% and a protein content of about the 35% of the oilcake weight and a high omega 6 fatty acids content (linoleic acid) that renders it ideal for said scope. In trials carried out on rearing piglets, the substitution of soybean protein flour with the tobacco oilcake in percentages variable from 3% to 7% in isoproteic diets, did not show significant differences in the animals development.

15 In a further embodiment of the invention, the plants and/or the seeds of the invention may be used for the preparation of non-polluting lubricants. By way of example, the oil obtained with the method of the invention, from plants producing the seed of the invention having no other modifications besides the mutations for the appearance of the basic character (i.e. the high seed production) already show a flash
20 point of 236°C and a melting point of -18°C, characteristics that renders it suitable for use even as such as non-polluting lubricant e.g. for chainsaw chains or for engines in general.

 In a further embodiment, the plants and/or seeds of the present invention, can be used for the preparation of foods or food supplements for human use.

25 In this case, the oil obtained by the process of the invention, will be further refined in order to eliminate waxes, gums, complex carbohydrates, phospholipids and de-acidified. Once refined it can be used as such or as dietary supplement for human use. The advantage of said use is given by the richness of said oil in polyunsaturated fatty acids (C18:2, PUFA) that are essential for humans and that are required for health
30 reasons (omega 6).

 It is obvious that all the embodiments envisaging the use of tobacco's seeds oil, preferably obtained by pressing, or of oilcake resulting from the seed pressing, can be carried out also on non-mutagenised tobacco plants. The unquestionable advantage of the plants of the invention is obviously given by the high seed production and the
35 resulting higher yield of product obtainable by the plants of the invention and by their seeds compared to the yield obtainable from wild type plants and tobacco seeds planted in a comparable cultivating area and with comparable cultivating methods.

 The use of tobacco oil for the preparation of lubricants, of human or animal dietary supplements have never been disclosed in the art. Obviously, also all the
40 embodiments in which an oil having a iodine title equal or lower than 120 extracted by pressing and no further treated have never been described.

 The plants of the invention, also show a residual biomass (leaves, stalks, capsules

and inflorescences coating) that, after the seed harvest, can reach values between 100 and 300 quintals or more per hectare, the use of the plants of the invention as a biomass source for gasification, combustion, pyrolysis, anaerobic digestion, aerobic digestion, fermentation or steam explosion processes as described in the art in order to further increase the economic yield of the culture, is hence an object of the invention.

Object of the invention are also: a tobacco's seeds oil obtainable from the seeds of the plants of the invention with the extraction method of the invention, a biodiesel obtained by said oil by transesterification, fuels comprising said oil, food supplements for humans deriving from said oil further refined, lubricants comprising said oil, tobacco's seeds oil obtainable from the seeds of the plants of the invention by the extraction method of the invention characterised in that it has a iodine title equal or lower than 120 without the need of admixing it with other oils for lowering said title, biodiesel comprising the said oil having a iodine title equal or lower than 120.

EXAMPLES:

EXAMPLE 1

Chemical mutagenesis

The seed of the variety selected for the mutants induction by chemical mutagenesis, has been placed in a 100 ml flask in the amount of 20 gr per experiment, corresponding to about 200,000 seeds. 50 ml of deionised water have been added to the flask and the seeds have been rehydrated for 14 hours at 25°C. The water has been than substituted with an 0.5% EMS aqueous solution. The seeds have been shaken using a magnet for a time variable from 0.5 to 5 hours, depending on the variety, that in preliminary trials showed a higher mutation frequency for morphological characters such as height of the plant, seeds dimensions, leaves shape, capsules numbers, seed production per plant etc.

Once the treatment period was ended, the mutagenic solution has been discarded by pouring the seeds in a thin sieve and rinsing them for several minutes under running water. Afterwards, the seeds have been rinsed for 6 times in a flask, by adding 50 ml of water and shaking them for 10 minutes at each rinsing.

The seeds have than been dried on filter paper and have been sent to a specialised firm for pelleting.

The pelleted seeds had a final diameter of 1.2 mm and have been used for direct in field seeding (M_1) at a 100,000 plants per hectare density. The M_1 generation has been allowed to flower, and has been examined for the possible presence of dominant mutations and, once the seeds were ripe, a capsule per plant has been hand-harvested in order to obtain the mass seed that has been used for the open field seeding of the following year and for the phenotypic screening of the M_2 generation. Each mutant of interest has been singularly harvested and controlled in the following generations.

EXAMPLE 2

Somaclonal variants induction

The seed of the variety selected for inducing somatoclonal variants has been sterilised by immersion for 5 minutes in a 20% sodium hypochlorite solution followed

by an immersion for 1 minute in 70% ethanol followed by 5 washes in sterile water. The seed has been allowed to germinate in rectangular plastic containers of 10 cm per side and of 12 cm of height containing agarised MS medium. From the fully developed plants, parts of 0.5 cm per side of leaf have been cut and placed in Petri discs with MS1 (MS + 1 mg/l 2,4-D) medium in order to induce the formation of the callus. Also individuals F₁ obtained from interspecific crossings have been used. The callus collected from leaf discs has been placed in liquid MS1 medium in 250 ml flasks containing 50 ml of medium and shaken at 80 rpm on a rotating plate maintained at 28°C with a 16 hours photoperiod.

The callus has been maintained in liquid culture for several generations renewing the culture every 20 days and inoculating a new 50 ml liquid media flask with 2.5 ml of the preceding culture. At each generation a part of the callus was distributed on Petri dishes containing agarised MS2 (MS + 1 mg/l NAA + 1,5 mg/l Kinetin) medium in order to induce the formation of sprouts that, once reached 2 cm of length were transferred on MS3 (MS + 1 mg/l IBA) medium to root and for the subsequent transfer in pot in a greenhouse. The obtained variants were screened in the R₁ and R₂ generations and concerned the leaves dimensions, the leaves shape, the capsules dimensions, the number of seeds per capsule, the oil content of the seeds, etc.

EXAMPLE 3

Crossing and chromosomal duplication

Many *Nicotiana* species are sexually compatible with *Nicotiana tabacum* and, even if the crossing product is sterile, it is possible to backcross using the parental plants as pollinators or induce the formation of amphidiploids. In this species, the work is facilitated by the fact that it is possible to obtain intergeneric hybrids F₁ populations of many thousands of individuals, allowing to perform the improvement program based on amphidiploids. The crossings have been carried out both using parental *Nicotiana* spp. having the same chromosome number (e.g. *N. paniculata* x *N. solanifolia*; *N. tabacum* x *N. rustica*) or a different chromosome number (eg.. *N. tabacum* x *N. paniculata*; *N. tabacum* x *N. longiflora*). The F₁ individuals obtained by some cross combination have been cultivated in greenhouse, in order to verify their phenotypic characteristics and to cross them with both the parental plants, as well as allowed to germinate in vitro and micro propagated. The micro propagated material has been used to carry out chromosome duplication experiments by treatment with colchicine in the sprouts reproduction phase or later after the transplantation in pot and before flowering. The sprouts of the germinated seeds have been cut at the basis and transferred on MS media containing 2 mg/litre of benzylaminopurine (BAP). After about 4-5- weeks the lateral sprouts formed were excised and maintained on the same medium. In order to obtain entire plants the transfer was performed on MS medium without hormones in order to induce roots formation. After few days from the excided sprouts transfer on the rooting medium, a drop of a 0.5% colchicine solution was laid onto the same. Once the plants rooted, they were transferred into pots in a greenhouse and allowed to flower in order to verify their fertility and their capability of forming vital seeds. In some cases, in order to

allow the hybridisation between different species, it has been necessary to duplicate the aploids and to perform the hybridisation on autotetraploids.

The materials obtained by the backcrossing generations or by the *in vitro* propagation followed by the chromosome duplication were screened for their phenotypic characteristics and optionally used in the genetic improvement programs.

The chromosome number control in the stabilised amphidiploids lines has been carried out using the root apex.

EXAMPLE 4

Genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

Day 1: a small quantity of *Agrobacterium tumefaciens* of the EHA 105 strain containing the plasmid of interest, collected from a culture on Petri dish with a sterile handle, has been inoculated in 2 ml of sterile LB medium. Subsequently, a leaf of a healthy plant presenting no alterations whatsoever and showing, on the other hand, ideal turgidity conditions, has been collected. The leaf has been briefly rinsed in bi-distilled water in order to eliminate the superficial impurities and dipped in a 20% sodium hypochlorite 0.1% SDS solution for 8 minutes and allowed to dry in a sterile cabinet flux. and all the successive operations have been carried out under sterile conditions. In particular the leaf has been dipped into 95% ethanol and shaken in order to fully wet both sides for about 30 - 40 sec. The leaf has been then allowed to dry completely.

With an ethanol sterilised punch discs from all the leaf surface have been obtained and have been dropped onto plates containing antibiotics-free MS10; in detail, not more than 30 disks per plate have been placed. Subsequently, 2 ml of LB plus *agrobacterium* (freshly inoculated) have been poured on the plate and the bacterial suspension has been uniformly spread with a gentle rotating movement in order to obtain a homogeneous bacterial distribution onto the discs. The LB in excess has been carefully aspirated with a pipette. A negative control where nothing or mere LB has been added has been carried out.

The plates have hence been incubated for 24-48 hours at 28°C, with constant illumination and the bacterial growth has been pointed out by the appearance of a thin opaque halo diffused onto all the plate.

Day 2: the leaf discs have been carefully transferred on a plate containing MS10 + cephotaxime 500 mg/l, and incubated for 6 days at 28°C, in constant lighting. This step determines the *agrobacterium* inactivation.

Day 8: the leaf discs have then been carefully transferred onto MS10 + cephotaxime 500 mg/l and Kanamicyne 200 mg/l, and incubated for 14 days at 28°C, in constant lighting. This step determined the selection of the transformed plants since the kanamycine resistance gene is carried by the plasmid inserted in *Agrobacterium*.

Day 22: the leaf discs that have grown in the meantime, thus forming a callus, have been carefully transferred onto MS10 + cephotaxime 500 mg/l, kanamycine 200 mg/l and carbenicillin 500 mg/l, and incubated for 6 days. This step determines the elimination of the *agrobacteria* possibly survived to the preceding antibiotic treatments.

Day 28: the leaf discs have been once more transferred onto MS10 +

cephotaxime 500 mg/l and kanamycine 200 mg/l, and incubated up to the appearance of sprouts. Once the sprouts presented at least two leaves, they have been separated from the callus mass and transferred onto rooting medium MSO + cephotaxime 500 mg/l and kanamycine 200 mg/l.

5 Once the roots appeared, the small plants have been extracted from the plate, freed from the agar residues, gently rinsed in running water and planted in small plastic pots in soil and sand (2:1). The soil has been previously saturated with water, subsequently, the pots have been covered with plastic transparent lids in order to maintain high humidity conditions and have been placed in a growing chamber at 25°C
10 with a daily lighting period of 16 hours. The transgene presence was screened on all plants collecting a leaf portion (250 mg), extracting the DNA and carrying out a first PCR analysis and then, on positive plants, a Southern analysis in order to verify the number of copies of the transgene.

15 EXAMPLE 5

Oil extraction from the seed.

 The tobacco seed produced by certain selected varieties has been used for oil production. In one case the analysed seed has a humidity content of 7.01% and a fatty substances content (extraction with hexane) of 39.4%. The oil extraction has been
20 carried out as a cold extraction, using a screw press mod. Komet (IBG, Germany), manually loaded with tobacco seeds. At steady state the press has reached and maintained a temperature of 60°C. After pressing the oil has been filtered on paper and shows high clearness characteristics. The yield of oil extracted has proven to be of the 81.1% of the total oil contained in the seed. The residual oilcake had a oil content of
25 0.74% and a protein content of 34.5% .

EXAMPLE 6

Combustion tests

 The oil coldly extracted and filtered with paper filters as in example 5, has been transesterified with methyl alcohol in presence of NaOH. The oil has been heated up to
30 55°C and the methanol-NaOH solution added and mixed for 90 minutes. At the end of this step, after cooling down, the mixture has been allowed to stratify thus dividing the lower glycerol layer from the ester. The ester has been washed two times with water and in the first washing phosphoric acid (2.5 ml/litre) has been added to the water. At the end of the process the oil has been heated under vacuum at 90°C in order to remove all
35 water residuals and the ester obtained is named with the abbreviation TOE (Tobacco Oil Ester). The trials have been carried out with an indirect injection diesel engine (details: 4 cylinders, rotary injection pump, compression ratio 21.5:1, maximum power 55kW at 4500 rpm). Prior to the combustion trials, analytic parameters such as viscosity at 50°C (21.63 mm²/s), melting point (-18°C), superior calorific value (9,670 KCal/kg), volumic
40 mass at 15°C (925.0 kg/m³), sulphur (<0.01 % m/m), ashes (0.005 % m/m) have been verified. During the trial a gas analyzer and an hydraulic dynamometer have been used. The oil ester has been used admixed at 20% with diesel having the following main

characteristics in comparison with TEO (indicated in brackets): density 840.8 (886.6), viscosity at 40°C 2.9 (3.3), sulphur content (mg/kg) 6,750 (6). The test results have not pointed out detectable variations in the engine performance using the two products and showed a more complete combustion that resulted in a higher thermal efficiency when the diesel was added up with TEO. The maximum power increase has been observed at 2,200 rpm with a 3.5% increase in comparison with pure diesel (29.86 kW against 28.85 kW). The produced CO is lower in the mixture in comparison to the sole diesel and also the sulphur content is lower, which determines a decrease in the SO₂ emission (up to the 40%).

10

EXAMPLE 7

Animal feeding trials

The oilcake obtained from the tobacco's seeds pressing has been analysed in order to evaluate its suitability for using as a protein dietary supplement in animal feeds. The analytical data of the oilcake resulting from the pressing point out a fatty substances content of the 10.74%, a protein content of 34.5% and a humidity and volatile substances of 5.97%. The total aminoacids after the sample hydrolysis are: aspartic acid 2.40%, threonine 1.06%, serine 1.17%, glutamic acid 5.53%, proline 0.83%, glycine 1.29%, alanine 1.18%, valine 1.27%, methionine 0.45%, isoleucine 1.13%, leucine 1.84%, tyrosine 0.97%, phenylalanine 1.43%, histidine 0.72%, lysine 0.72%, arginine 3.36%. Of the total content of fatty substances, the 76.59% consists of linoleic acid that ascribes to the Omega 6 class, that are of particular relevance for animal diet.

The feeding trial has been carried out on piglets having a starting weight of about 8 kg, divided in two groups, each of 20 individuals, a control group fed with a feed having a soybean protein supplement (C), the second one having the same protein amount with respect to the first, wherein soybean was partially substituted with 3% of the tobacco oilcake (T). The animals treated with the oilcake did not show any problems in beginning and continuing for all the test's duration the intake of said feed. The test was constantly monitored and the piglets showed no gastroenteric trouble. The animals showed a different daily weigh growth (237 gr/head/day with tobacco oilcake, 170 gr/head/day with soybean oilcake), and a final, after 27 days, weigh of 15.2 kg for T and 12.8 for C.

CLAIMS

1. A mutagenised tobacco plant characterised in that it produces a seed quantity of at least 20 quintals per hectare.
2. The plant according to claim 1, wherein said seed quantity is of about 50 quintals per hectare, or of about 70 quintals per hectare, or of about 90 quintals per hectare.
3. The plant according to anyone of claims 1 or 2, characterised in that it is further modified in the fatty acid metabolism by genetic transformation and by the fact that it produces a seed containing an oil having a iodine title lower or equal to 120.
4. The plant according to anyone of claims from 1 to 3, characterised in that it is further modified in the fatty acid metabolism by genetic transformation and by the fact that it produces a seed containing an oil percentage comprised between about 40% to about 60% of the seed.
5. The plant according to claims 3 or 4, modified by transformation with one or more expression vectors comprising a seed specific expression cassette comprising, ordered from 5' to 3' a DNA sequence coding for a promoter of a plant gene specific for the expression in seed storage organs; a DNA sequence coding for the signal sequence of a plant protein capable of directing said protein to the endoplasmic reticulum (ER); a DNA sequence coding for a signal sequence capable of directing the protein to the plastid or a DNA sequence coding for a signal sequence able to anchor the protein to the ER; a DNA sequence coding for a protein selected from the group comprising the genes acetyl-CoA carboxylase (ACCase), diacyl-glycerol acyltransferase (DGAT), lysophosphatidate acyl transferase (LPAT), phosphatidate phosphohydrolase (PAPase) acyl protein carrier (ACP), malonyl-CoA:ACP transacylase, ketoacyl-ACP synthase (KAS), ketoacyl-ACP reductase, 3-hydroxyacyl-ACP dehydrase, enoyl-ACP reductase, stearoyl-ACP desaturase, acyl-ACP thioesterase, glycerol-3-phosphate acyltransferase, 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, cytidine-5-diphosphate-diacylglycerol synthase, phosphatidyl glycerophosphate synthase, phosphatidyl glycerol-3-phosphate phosphatase, FAD1-8 desaturase, phosphatidic acid phosphatase, monogalactosyl diacyl glycerol synthase, digalactosyl diacyl glycerol synthase, sulpholipid biosynthesis protein, long chain acyl-coA synthase, glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT), diacylglycerol cholinephospho transferase, phosphatidylinositol synthase, acil-CoA diacylglycerol acyltransferase, acyl-ACP desaturase, lineoyl desaturase, sphingolipid desaturase, oleate 12-desaturase, fatty acid acetylenase, fatty acid epoxygenase, diacylglycerol kinase, cholinephosphate cytidyl transferase, choline kinase, phospholipase, phosphatidylserine decarboxylase, phosphatidylinositol kinase, ketoacyl-CoA syntase, CER transcription factor, oleosin, 3-ketoacyl-CoA thiolase, acyl-CoA dehydrogenase, enoyl-CoA hydratase, acyl-CoA oxidase, and a polyadenilation signal.
6. The plant according to anyone of the preceding claims characterised in that it is further modified by genetic transformation for insects, herbicides and fungi resistance..
7. The use of the plant according to anyone of claims from 1 to 6, for the

production of seeds for the manufacturing of tobacco oil, fuel oils, biodiesel, animal dietary supplements, solid fuels, human dietary supplements, lubricants.

8. The use of the plant according to anyone of claims from 1 to 6, for the production of biomass for biochemical conversion or for thermochemical conversion by direct combustion, carbonisation, pyrolysis, gasification, anaerobic digestion, aerobic digestion, alcoholic fermentation or steam explosion procedures.

9. A method for the production of the plants according to anyone of claims from 1 to 4, comprising the following steps:

a) subjecting to mutagenesis seeds produced by initial crossings between individuals of the same species belonging to wild type or to selected varieties;

b) allowing said seeds to germinate and selecting the plants of the M2-M4 generations according to the following parameters:

i) presence of one or more phenotypic manifest characteristics selected from: plant height 80-120 cm, leaves with a thin lamina and upright bearing, compact inflorescence, flowers number higher than 100, capsules number higher than 100, number of seeds per capsule higher than 5,000, lignified and robust stalk, deep roots;

ii) stability of the selected character in the generations following M2;

iii) verification of the hereditariness of the selected character;

c) allowing to germinate the seeds selected at step b) and regenerating the plants starting from the leaf mesophyll callus induced *in vitro* at the presence of phytohormones and selecting the plants maintaining the characters selected at step b) in the R0-R2 generations;

d) seeding in open field the plants selected at step c) and further selecting plants producing at least 20 quintals of seed per hectare.

10. The method according to claim 9 wherein step a) is substituted by step

a') producing mutagenised seeds by carrying out interspecific crossings in the *Nicotiana* genus, followed by backcrossing of the F1 individuals or by amphidiploids induction by treating the vegetative apex of the plants produced by said crossings with colchicine.

11. Method according to claims 9 or 10 further comprising the following steps:

e) transforming the plants obtained at step d) with vectors comprising expression cassettes expressing in plant genes for insects, herbicides and/or fungal diseases resistance and selecting the thus transformed plants in the T0-T4 generations for insects, herbicides and/or fungal diseases resistance and/or;

f) transforming the plants obtained at step d) with one or more vectors comprising expression cassettes expressing in seed genes of the fatty acids metabolism followed by selection of the transformed plants in the T0-T4 generations for characteristics such as total oil content of the seeds and fatty acid composition of the same;

g) crossing the plants obtained at steps e) and/or f) and selecting the resulting progeny for one or more of the characteristics selected in the group: high seed

production ability in a quantity higher than 40 quintals per hectare, seed oil content higher than the 42%, iodine title in the oil obtained from the seeds of said progeny lower than 120, fatty acids composition of the oil contained in said progeny seeds variable with respect to the wild type plant, insect resistance, herbicides resistance, fungi resistance.

5 12. The seed of the plants according to anyone of claims from 1 to 6.

13. The use of the seed according to claim 12 for the manufacturing of tobacco oil, fuel oils, biodiesel, animal dietary food supplements, solid fuels, dietary food supplements for humans.

10 14. A method for the extraction of oil from tobacco seeds wherein the oil yield is between the 70 and the 95% of the oil contained in said seeds comprising the following steps:

a) mechanically extracting said oil by pressing with helical press and obtaining oil and a residual oilcake;

b) filtering said oil extracted in step a) with paper or cloth filters.

15 15. The method according to claim 14 further comprising step

c) chemically extracting by the use of solvents the residual oil contained in the oilcake obtained in step a).

16. The method according to claims 14 or 15 wherein said oil is extracted from seeds according to claim 12.

20 17. The method according to claims 15 or 16 further comprising step

d) refining the oil obtained in steps a) or b), and c).

18. Tobacco's seed oil obtainable with the extraction method according to claims 15 or 16 characterised in that it has a iodine title lower than or equal to 120.

25 19. Biodiesel comprising oil of tobacco seeds according to claim 12, transesterified with methanol.

20 20 Food supplement for human use characterised in that it comprises tobacco's seeds oil obtainable with the process according to claim 17.

21. Feed supplement for animal use comprising the oilcake obtainable in step a) of claims 14 or 16 when depending from claim 14.

30 22. Solid fuel comprising the oilcake obtainable in step a) of claims 14 or 16 when depending from claim 14.

23. Industrial lubricant comprising the tobacco's seed oil obtainable from anyone of the claims from 14 to 16.

DESCRIPCION EN ESPAÑOL

PLANTA DE TABACO MUTAGENIZADA COMO CULTIVO DE SEMILLAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ACEITE PARA USOS ENERGÉTICOS, INDUSTRIALES Y ALIMENTICIOS

DESCRIPCIÓN

LA TÉCNICA

El tabaco se ha cultivado, en los comienzos, como planta ornamental y medicinal, imponiéndose posteriormente como un bien de lujo en esencia, entrando en la cultura humana y la modificando hábitos y costumbres humanas.

El tabaco tiene, entre las plantas agrícolas, una posición que no es comparable con otros cultivos, y presenta ciertas peculiaridades, tales como:

1. es una de las pocas plantas comercializadas sólo por sus hojas;
2. es la planta no alimenticia más importante del mundo con una extensión de producción de más de cuatro millones de hectáreas en todo el mundo;
3. en muchos países es un instrumento muy importante para la política económica y financiera;
4. su consumo se basa en la transformación de las hojas en productos de tabaco, polvos para inhalar y productos masticables;
5. considerando sus características de sustancias estupefacientes y su peligrosidad para la salud humana, siempre ha habido intentos de prohibir su uso y por lo tanto su producción.

La evolución del género *Nicotiana* en diferentes hábitats, inicialmente a través de la selección natural y poliploidización y, posteriormente, a través de la selección inducida por el hombre, ha llevado a la aparición de una amplia gama de tipos, todos ellos seleccionados sobre la base de las propiedades de la hoja, siendo ésta considerada como la única parte valiosa de la planta.

Recientemente, se han indicado usos alternativos del tabaco, además de los arriba mencionados:

1. la producción de proteínas alimenticias a través de la purificación del mismo a partir de hojas (Long R.C. 1979. Tobacco production for protein. Project n. 03245. North Carolina State university, Raleigh NC);
2. la extracción de principios activos farmacológicamente útiles normalmente presentes en las hojas (Baraldi M. et al. 2004. Presenza di sostanze Benzodiazepino-simili in estratti di foglie di tabacco (*Nicotiana tabacum*). Atti Ist. Sper. Tab., 23 Aprile, Roma, pp.45-52);
3. la producción de proteínas recombinantes expresadas en las hojas o en las semillas de plantas modificadas genéticamente (Twyman et al. 2003. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. Trends Biotechnol. 21:570-578).

La planta del tabaco presenta un área foliar muy grande, una inflorescencia pequeña y una relación de parte aérea: raíces que es la más alta observada entre las plantas agrícolas (Went, 1957.).

Teniendo en cuenta la importancia económica ejercida por el cultivo del tabaco, a pesar del aumento alarmante de tabaquismo entre los más jóvenes, Europa ofrece subvenciones para su cultivo que da lugar a la perplejidad, tanto de carácter económico y ético.

La Comisión Europea en su sitio de Internet (), afirma: "no existen alternativas económicamente válidas a este cultivo que no use buenos suelos. Los incentivos al cultivo del tabaco permite la supervivencia del tejido rural y genera una actividad industrial que contribuye a la supervivencia de regiones amenazadas por la desertización".

Las consecuencias negativas, en términos ambientales, el uso de combustibles fósiles y la limitada disponibilidad de petróleo, exige la búsqueda de nuevas fuentes de energía. Entre estos, los biocombustibles son la mejor opción en una perspectiva de futuro debido a su renovabilidad.

Teniendo en cuenta los biocombustibles de origen agrícola, hasta la fecha, la atención se ha centrado en la producción de bioetanol a partir de plantas productoras de azúcar simple (es decir, sacarosa) o complejo (es decir, la celulosa). Plantas modelo para dicha producción han sido identificadas en la caña de azúcar, maíz, trigo, papa, yuca, remolacha azucarera, cebada, sorgo, etc. El desarrollo de los cultivos con el objetivo de la maximización de la producción de biomasa, para ser transformada en etanol a través de procesos de fermentación o para la producción de biocombustibles o gas a través de la gasificación puede tener el mismo alcance. Alternativamente, el estado de la técnica tiene por objeto la producción de aceite combustible y el biodiesel a partir de especies oleaginosas o no oleaginosas, pero ricas en petróleo como la soja, el girasol, el orujo, maní, lino, maíz, ajonjolí, palma, palmiste, coco, ricinos, etc.

La elección de especies ideales para la producción de biocombustibles se refieren al cumplimiento de requisitos tales como:

1. determinar una ganancia neta de energía en la diferencia entre la entrada y salida del cultivo, que comprende en dicho cálculo los costes energéticos para la producción de la maquinaria agrícola y para el tratamiento para la extracción y transformación / purificación del aceite;
2. determinar los beneficios ambientales derivados de la compatibilidad de la producción agrícola, la disminución del CO₂ y emisión de materia particulada () después de la combustión y el uso limitado de productos agroquímicos como los plaguicidas, herbicidas y fertilizantes;
3. ser económicamente competitivo y, posiblemente, determinar los beneficios sociales que pueden incrementar la economía del sistema, por ejemplo, al reducir los costes indirectos sobre el sistema sanitario, teniendo en cuenta también que la energía fósil utilizada actualmente impone costos ambientales que están por lo general no en la determinación de costos; un biocombustible preverá beneficios tanto en el lado de la competitividad de costes y en el lado del medio ambiente;
4. estar disponible en grandes cantidades sin disminuir la disponibilidad alimenticia, el uso de plantas agrícolas utilizadas tradicionalmente para la producción de alimentos no permite razonablemente su utilización para la producción de biocombustibles sin determinar una reducción de las fuentes de alimentos derivados de dichas plantas, por tanto aumentando los costes de la materia prima;
5. de la planta de la que deriva, posiblemente, comprenderá tierras marginales que no son susceptibles de ser utilizadas para cultivos alternativos.

En el estado de la técnica, las plantas tomadas en cuenta para la producción de aceite son: soja (*Glycine max*), girasol (*Helianthus annuus*), orujo (*Brassica napus*), maní (*Arachis hypogaea*), ricinus (*Ricinus communis*), lino (*Linum usitatissimum*), maíz (*Zea mais*), sésamo (*Sesamum indicum*), palma (fruta, *Aracaceae*), palmiste (semilla, *Aracaceae*), la copra (coco, *Cocos nucifera*), alazor (*Carthamus tinctorius*), olivo (*Olea europea*), algodón (*Gossypium sp.*), Caoba (*Anacardium occidentale*), cáñamo (*Cannabis sativa*), amapola (*Papavers sp.*), mostaza (*Brassica sp.*), uva (*Vitis sp.*), albaricoque (*Prunus armeniaca*), pino (*Pinus sp.*), argán (*Argania spinosa*), aguacate (*Persea americana*), almendra (*Prunus amygdalus*), avellano (*Corylus avellana*), nueces (*Juglans regia*), el nim (*Azadirachta*

indica), Níger (*Guizotia abyssinica*), jojoba (*Simmondsia chinensis*), arroz (*Oryza sativa*), calabaza (*Cucurbita sp.*), Crambe (*Crambe abyssinica*).

Por el contrario, en la técnica anterior, el tabaco ha sido siempre considerado como una de plantas agrícolas aptas para la producción de hojas.

Las únicas tres publicaciones en la literatura, enumeradas a continuación, que sugieren otros usos del tabaco, toman en cuenta las variedades de tabaco, que han sido seleccionadas para la producción de hojas, como una fuente de la semilla-subproducto para la extracción de aceite.

En particular, Giannelos et al. () declarando que "la semilla es un subproducto de la producción de hojas en Grecia" sugieren la posibilidad de utilizar dichas semillas para la producción de combustibles describiendo métodos para la extracción de aceite de semillas de tabaco que utiliza solventes, indicando, sin embargo, que el aceite extraído de tabaco podría no ser utilizado como biodiesel por el alto valor de yodo en él.

Usta N. declara que el aceite de semilla de tabaco es un subproducto de la producción mundial de hojas, estima la producción mundial de semillas derivadas del cultivo de tabaco para hojas y describe la extracción de aceite de la semilla a través del uso de disolventes.

Por último, Patel et al. stima la producción de semillas de tabaco como un subproducto de las hojas en la India igual a 1.171 kg/ha con un contenido de aceite de 38% en peso, y describe su extracción mediante el uso de disolventes.

Los procesos tecnológicos para la extracción de petróleo comprenden técnicas mecánicas (presión) y químicas (disolventes). En la práctica, los dos sistemas se combinan a menudo. En general, la extracción mecánica se realiza en las semillas que contienen más del 20% de material de grasa (por ejemplo, orujo y girasol) en el que las dimensiones de las semillas son favorables para la técnica de prensado. La semilla de tabaco, a modo de ejemplo, debido a sus dimensiones muy pequeñas, está sujeta a la extracción de aceite mediante tratamientos químicos.

En general, la posibilidad de extraer el aceite mecánicamente, facilita la extracción directa en los sitios de producción de semillas, por lo tanto, también a nivel de la finca, con plantas pequeñas.

Para cantidades menores de extracción química de material de grasa se usa, y puede ser aplicado también a las tortas de aceite, los restos de la extracción mecánica, a fin de recuperar el resto del 6-12% de aceite que queda después del tratamiento mecánico. Los aceites extraídos por el uso de disolventes (hexano, por ejemplo) antes de su comercialización para usos alimenticios, requieren un paso de refinamiento. El principal producto del proceso de extracción es aceite crudo; la extracción mecánica además produce la torta de aceite de proteína mientras que el producto químico produce harina. Este último, utilizado en la alimentación animal, posee gran influencia en la producción y transformación de la economía de aceite de semillas.

En algunos casos, la producción está ligada a la solicitud de la proteína de harina (de soja, por ejemplo). El aceite crudo, posteriormente se puede corregir con una serie de tratamientos físico-químicos (por ejemplo, el ajuste del pH, filtración, desgomado, decoloración, etc.) en función del uso deseado.

El balance de masa de todo el proceso varía de especie a especie, a modo de ejemplo, considerando un contenido de aceite de 42% para las semillas de girasol, de una tonelada de semillas (que son el producto principal) 2,6 toneladas de sub-producto (biomasa) se consideran, con una producción de 420 kg de aceite crudo, 580 kilos de torta de aceite, se obtiene una producción final de 390 kilos de aceite refinado y 30 kilos de residuos de

proceso. Teniendo en cuenta que el rendimiento medio de las semillas de girasol es de 2,6 t / ha (+ / -15%), puede calcularse que el rendimiento por hectárea de aceite es igual a cerca de una tonelada. Esta relación es válida también para otras especies, en particular, para la colza, dependiendo del porcentaje de aceite. Los aceites vegetales pueden utilizarse directamente como combustible para la producción de calor (hornos o calderas) o la producción de energía mecánica (motores), utilizando su valor calorífico superior que está a 8.500 kcal / kg o, después de transesterificación, transformado como biodiesel.

El uso de aceites vegetales en las calderas pueden llevarse a cabo con quemadores convencionales mediante la sustitución de la industria o el gasóleo de calefacción con aceite vegetal. Este tipo de solución parece muy interesante debido al hecho de que: (i) el precio de los combustibles fósiles sustituidos con frecuencia es bastante similar a la del gasóleo de automoción y está sujeto a elevados impuestos especiales, (ii) el uso de petróleo en calderas requiere la organización de un hilo agroenergético muy simple que puede terminar directamente en el medio rural, donde los productores de combustible y los usuarios de combustible puede estar situados muy cerca uno de los otros o incluso pueden corresponder. La mayor o menor facilidad del proceso de extracción de aceite es otro aspecto importante a tener en cuenta cuando se prevé un uso local de los biocombustibles. La economía de la producción y el balance energético, más o menos favorable dependerá principalmente de la producción por hectárea de aceite combustible.

El uso de aceites vegetales en motores diesel requiere, por otra parte, un proceso químico de transesterificación con metanol y una cierta composición de ácidos grasos, que pueden resumirse en un valor de yodo que tiene que ser igual o menor que 120. Los aceites vegetales se utilizan a menudo para los ámbitos alimenticios. Dependiendo de la planta, las producciones pueden ser dirigidas principalmente a los ámbitos alimenticio o energético, o ambos.

En la luz de los problemas antes mencionados, sería muy conveniente reciclar la industria del tabaco para los ámbitos ecológico e inofensivo para los seres humanos.

La identificación de una alternativa económica válida y el uso de tabaco por lo tanto, no constituyen un tema de todo el mundo claramente interesante desde el punto de vista económico.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención revela la realización de plantas de tabaco adecuadas para una producción muy alta de un componente particular de la planta: la semilla. Dichas plantas se han realizado a través de técnicas de mutagénesis somáticas *in vitro*, químicas o físicas y / o por los cruzamientos interespecíficos y la posterior duplicación de los cromosomas. Dichas plantas están opcionalmente modificadas por técnicas de ingeniería genética. La selección de plantas de tabaco en el estado de la técnica siempre ha sido dirigida a la hoja como producto final, la focalización de la atención y, por tanto, la selección de plantas para la maximización de la producción de semillas nunca se ha sugerido antes y permite el uso de de tabaco con el fin de maximizar la producción de semillas en detrimento de la producción de la hoja.

Se ha encontrado sorprendentemente que la selección de plantas de tabaco, llevada a cabo usando técnicas no biológicas de técnicas de mutagénesis químicas, físicas y somáticas *in vitro*, de cruzamiento también entre diferentes especies, seguida por la inducción de anfidiplóides y, opcionalmente, mediante técnicas de ADN recombinante, se ha permitido obtener plantas de tabaco presentando las siguientes características:

-se presentan las características ideales para la transformación de la planta de tabaco agrícola a partir de una planta de producción de la hoja a la producción de semillas de la planta;

-tienen la capacidad de producción de semillas hasta valores de entre 20 quintales / hectárea a 50 quintales / hectárea, o a 70 quintales / hectárea, o incluso a 90 quintales / hectárea, con la posibilidad de nuevas mejoras en el rendimiento de semillas / hectárea;

-presenten un contenido de aceite en las semillas hasta el 38% del peso de la semilla, o hasta un 40%, o hasta 48%, o hasta 52% o hasta un 58% o incluso hasta un 60%;

tienen una necesidad baja los insumos agronómicas para la defensa contra parásitos y las malas hierbas.

Por otra parte, totalmente inesperado, debido al pequeño tamaño de la semilla del tabaco, es decir, entre las plantas cultivadas, una de las semillas más pequeñas, la presente invención pone de manifiesto que es posible extraer el aceite de la semilla presionando los rendimientos de extracción que están alrededor del 80% del total de aceite presente en la semilla, alrededor de 90% del total de aceite presente en las semillas o incluso alrededor del 95% del total de aceite presente en la semilla, por lo que se concede la posibilidad de realizar la extracción también en las plantas pequeñas para el uso de campos.

Por lo tanto, objeto de la invención son las plantas de tabaco que se mutagenizan y / o se obtienen mediante el cruzamiento interespecífico seguido por diploidización y selección, que se caracteriza en que producen una cantidad de semilla igual o de al menos 20 quintales / hectárea, dichas plantas, opcionalmente, modificadas por la ingeniería genética, el uso de dichas plantas para la producción de semillas, para la producción de petróleo y sus derivados, el uso de dichas plantas para la producción de biomasa para la conversión bioquímica o termoquímica, el método de producción y selección de dichas plantas, las semillas de dichas plantas y su utilización para la producción de petróleo y sus derivados, el aceite que se deriva de las semillas, dicho biodiesel obtenido a partir de dichas semillas, suplementos alimenticios derivados del tabaco, los combustibles sólidos que comprenden la torta de aceite resultante de presionar semillas de tabaco, el método para extracción de aceite de semillas de tabaco presionando.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FIGURAS

Características generales de la planta del tabaco realizada mediante mutagénesis química, cruzamiento intra e interespecífico, poliploidización, selección, inducción de la variabilidad somaclonal, la transformación genética, con el objetivo de maximizar la producción de semillas por unidad de superficie, con un alto contenido de aceite y que poseen características apropiadas para la utilización como fuente de energía, para usos industriales y para la nutrición humana y animal. Características principalmente inducidas y seleccionadas: aparato radical profundo y amplio, hojas lanceoladas erguidas y finas; tallo robusto en la base, con entrenudos largos; inflorescencia compacta similar a COB, de ancho o columnas; pediceladas corta, no cápsulas dehiscentes, di-o multi - válvula de punta recta, con al menos 5000 semillas / cápsula; semillas ovales o elípticas de una longitud > a 1 mm, altura de planta entre 50 y 120 cm, la resistencia a insectos, resistencia a los herbicidas, la resistencia a los hongos, la resistencia a la sequía, relación variable entre los grasos ácidos componentes.

Ejemplo de producto y tortas de aceite obtenido de semillas de tabaco por presión con un tornillo de prensa-modelo Después de presionar, el petróleo ha sido filtrado en papel y presenta características de alta limpieza.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención, por lo tanto, se refiere a la realización de plantas del género *Nicotiana*, como plantas ideales para la producción de semillas de las cuales se obtiene aceite combustible, biodiesel, proteínas, aceite para uso zootécnico, para uso industrial y para uso alimenticio humano.

Las variedades del género *Nicotiana* que pueden ser utilizadas como plantas padres para la realización de las plantas de la invención puede comprender, a modo de ejemplo, las siguientes especies: *N. tabacum*, *N. rustica*, *N. glauca*, *N. paniculata*, *N. knightiana*, *N. solanifolia*, *N. benavidesii*, *N. cordifolia*, *N. raimondii*, *N. thyrsiflora*, *N. tomentosa*, *N. tomentosiformis*, *N. otophora*, *N. setchellii*, *N. glutinosa*, *N. undulata*, *N. arentsii*, *N. wigandoides*, *N. trigonophylla*, *N. palmeri*, *N. sylvestris*, *N. langsdorffii*, *N. alata*, *N. forgetiana*, *N. bonariensis*, *N. longiflora*, *N. plumbaginifolia*, *N. repanda*, *N. stocktonii*, *N. nesophila*, *N. noctiflora*, *N. tomentosiformis*, *N. otophora*, *N. setchellii*, *N. glutinosa*, *N. petunioides*, *N. acaulis*, *N. ameghinoi*, *N. acuminata*, *N. pauciflora*, *N. attenuata*, *N. miersii*, *N. corymbosa*, *N. linearis*, *N. spegazinii*, *N. bigelovii*, *N. clevelandii*, *N. nudicaulis*, *N. maritima*, *N. velutina*, *N. gossei*, *N. excelsior*, *N. megalosiphon*, *N. exigua*, *N. goodspeedii*, *N. ingulba*, *N. stenocarpa*, *N. occidentalis*, *N. rotundifolia*, *N. debneyi*, *N. benthamiana*, *N. fragrans*, *N. suaveolens*, *N. obtusifolia*.

De acuerdo con la presente invención, la planta se logrará por medio de técnicas de mutagénesis que permitirán desarrollar plantas capaces de producir una mayor cantidad de semillas que el promedio con respecto a los individuos de partida. La mutagénesis se puede inducir por medio de técnicas químicas estándar y/o de tratamiento físico de semillas de tabaco, o también por el cultivo *in vitro* para la inducción de mutantes somaclonales. También se puede obtener una mayor producción de semillas mediante la generación de plantas híbridas mediante el cruzamiento interespecífico seguido por la diploidización de la dotación (con el fin de evitar los acontecimientos de esterilidad mostrados por los híbridos interespecíficos) por el tratamiento químico con colchicina. Las plantas producidas por interespecíficas cruce puede ser más mutagenised por químicos y / o técnicas físicas estándar.

Una vez obtenidos los mutantes, se seleccionarán por el carácter de la producción de semillas, a fin de aislar y seleccionar las plantas que producen al menos 20 quintales de semilla por hectárea de cultivo.

De acuerdo con la presente invención, la planta se realizará por lo tanto, a partir de semillas producidas por:

1. cruzamiento entre individuos de la misma especie o
2. cruzamiento entre individuos de especies diferentes que tienen el mismo número de cromosomas (por ejemplo, *N. tabacum* x *N. clevelandii*) como tal o en donde dicho cruzamiento es seguido por métodos de cultivo de embriones e inducción de poliploidia por tratamiento con la colchicina mutágeno, utilizando técnicas bien conocidas para el experto en la técnica, a fin de obtener anfidiplóides o,
3. cruzamiento entre individuos de diferentes especies con un número de cromosomas diferentes (por ejemplo, *N. tabacum* x *N. trigonophylla*), seguido de los métodos de cultivo de embriones e inducción de poliploidia por medio del tratamiento con la colchicina mutágeno, utilizando técnicas bien conocidas por el experto en la técnica, para poder obtener anfidiplóides.

Como se indicó anteriormente, cuando no hay inducción de diploidización, como en los casos 1 y 2, las semillas se mutagenizarán por técnicas químicas y/o físicas, cuando la mutación del número de cromosomas es inducida por la diploidización, como en los casos 2 y 3, la selección puede llevarse a cabo en dichas semillas mutadas obtenidas de ese modo o en esas semillas mutagenizadas adicionalmente por medio de técnicas químicas y/o físicas. Las técnicas de mutación estándar conocidas por el experto puede ser utilizadas, como, a

modo de ejemplo, el tratamiento de la semilla con metanosulfonato de etilo (EMS) (por ejemplo, en solución acuosa a una concentración al 0,5%) y EMS vivo en contacto con la semilla en tiempos variables por ejemplo, como se indica en el ejemplo 1, o, como ya se dijo con colchicina, para inducir la poliploidización, por radiaciones X o gamma realizadas en campos apropiados, o, en todo caso, siguiendo cualquier protocolo disponible en la literatura utilizada para la mutagénesis de plantas y para la realización de análisis a gran escala. Las semillas así tratadas se dejarán germinar y las plantas de la generación M₂ se seleccionarán en base a las siguientes características: forma de inflorescencia, número de cápsulas, número de semillas por cápsula, dimensiones de la semilla, forma de la hoja, dimensiones del aparato de raíz, orientación de la hoja, etc.

De acuerdo con la presente invención, se seleccionarán las plantas con las siguientes características: 80-120 cm de altura de la planta, hoja con lámina fina y orientación derecha, inflorescencia compacta, número de flores mayor que 100, número de cápsulas mayor que 100, número de semillas por cápsula mayor que 5000, tallo lignificado y fuerte, raíces profundas.

La cantidad de semillas producidas por las plantas seleccionadas se verificará en campo abierto y sólo se seleccionarán las plantas que produzcan al menos 20 quintales de semilla/hectárea a una densidad de siembra de aproximadamente de 125.000 a 250.000 plantas/hectárea.

Por medio de la mutagénesis química y física y por la mutagénesis somática, se obtienen los mutantes de las diferentes clases; incrementando así la probabilidad de encontrar las variantes deseadas. Como ejemplo, un mutante con una hoja lanceolada que tiene una orientación erecta permite el aumento de la densidad de siembra, sin comprometer la recepción de luz que es importante para la actividad fotosintética y por lo tanto para aumentar la producción de semillas por hectárea. A modo de ejemplo, un mutante con un aparato de raíz más profunda permite una mejor fijación y nutrición de la planta. Como ejemplo, un mutante con una inflorescencia compacta y un mayor número de cápsulas permite aumentar la cantidad de semillas producidas por cada planta.

La presente invención comprende las plantas así obtenidas y seleccionadas, que producen una cantidad de semillas superior o igual a 20 quintales/hectárea. Las plantas de la presente invención son modificadas con el fin de producir una cantidad de semillas de hasta 90 quintales por hectárea cultivada, por lo tanto, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 quintales por hectárea cultivada en vez del 10-12 producido normalmente por las plantas de tabaco seleccionadas para la producción de hojas.

Las plantas de la invención se pueden obtener también por la inducción de variantes somatoclonales, en donde las semillas antes indicadas pueden ser tratadas con hipoclorito de sodio y luego con etanol al 70%; se toman partes de hojas de las plantas germinadas de dichas semillas y se induce y reproduce la formación de callos en tiempos variables *in vitro* se induce entonces de dichas partes. A partir de dichas plantas con callos que tienen características variables, tales como: forma de inflorescencia, número de cápsulas, número de semillas por cápsula, dimensiones de las semillas, forma de la hoja, las dimensiones del aparatos de raíz, porte de la hoja, producción de semillas, contenido de aceite de la semilla, composición de ácidos grasos del aceite, contenido de proteínas de la semilla, etc, se regeneran, siendo dicha planta elegible en base a los parámetros parámetros antes mencionados.

Las plantas de la invención pueden también ser seleccionadas por la presencia de características tales como: porcentaje de contenido de aceite de la semilla, composición de ácidos grasos del aceite, contenido de proteínas de las semillas, etc.

Las plantas descritas anteriormente pueden ser modificados adicionalmente por medio de técnicas de ADN recombinante, a fin de obtener características más ventajosas,

en caso de que dichas características no estuvieran ya presentes en los mutantes seleccionados, tales como: aumento en el porcentaje del contenido de aceite de la semilla, composición variable de ácidos grasos dependiendo de los usos previstos para el aceite, la resistencia a insectos, resistencia a los herbicidas, la resistencia a hongos, etc.

Para la transformación genética de las plantas de la invención, se pueden usar vectores adecuados para la transformación de células de la planta, así como casetes de expresión que permite la expresión en plantas de los genes de interés. Dependiendo de si los genes de interés se deben expresar en la parte verde de la planta (es decir, genes de resistencia a herbicidas o parásitos) o en las semillas (por ejemplo, los genes implicados en el metabolismo de ácidos grasos) se pueden seleccionar vectores conocidos en la técnica, garantizando así la expresión de dichos genes en los órganos de interés. Por lo tanto, se pueden utilizar vectores con promotores constitutivos conocido en el estado de la técnica, o con los promotores inducibles, por ejemplo, por medio del ataque de parásitos o en la cápsula en formación. En particular, debido a que las plantas de la invención son seleccionadas para la alta producción de semillas y, siendo el producto de dichas semillas de particular interés, serán particularmente adecuados los vectores que incluyen casetes de expresión específicos de semillas que garantizarán la expresión de los genes heterólogos insertados en las semillas de la planta de la invención.

Para la transformación genética se puede utilizar el *Agrobacterium tumefaciens* o sistemas de transferencia física de ADN.

En una realización de la invención, será especialmente ventajoso realizar plantas que presenten no solo una alta productividad de semilla sino también resistencia a insectos, resistencia a herbicidas, resistencia a hongos, resistencia a sequía, lo que permitirá reducir significativamente las entradas de los cultivos, aumentando así la productividad del cultivo y reduciendo el impacto ambiental.

En este caso se podrán usar vectores que incluyen el gen de resistencia kanamicina como marcador, que regulan las regiones lo que permite la expresión constitutiva (por ejemplo, 35S o el promotor de la ubiquitina) de los genes de interés, como el gen cry de *Bacillus thuringiensis*, el gen aroA de *Salmonella typhimurium*, el gen Rpt1 de *N. obtusifolia*. Dichos genes permiten, en el mismo orden, la producción de plantas resistentes, respectivamente, a: insectos, herbicidas, enfermedades causadas por hongos y se pueden introducir siguiendo las técnicas estándar de transferencia de genes conocidas por el experto.

Las resistencias se pueden introducir después de uno o más eventos de transformación con varios vectores o, alternativamente, debido al hecho de que las plantas pueden cruzarse muy fácilmente, las resistencias se pueden introducir singularmente en los diferentes individuos de la misma variedad seleccionada y, posteriormente, juntarse en el mismo individuo por medio del cruzamiento.

En este caso, será fácil obtener homocigosis para todos los tipos por la duplicación de haploides obtenidos en cultivos *in vitro* de anteras.

La transformación genética se puede realizar de forma análoga para los propósitos de ingeniería metabólica destinados a aumentar la cantidad de aceite acumulado en las semillas y a la modificación de la senda metabólica de los ácidos grasos. En este caso, es posible utilizar regiones de regulación con actividad específica de semillas tales como el promotor de las globulinas, y dirigir las proteínas enzimáticas al retículo endoplásmico donde se pueden estabilizar por medio de la inserción de una señal específica, como KDEL, o desde donde se pueden trasladar a plástidos, insertando señales específicas de aminoácido, por ejemplo, la secuencia líder de la subunidad pequeña RuBisCO.

A modo de ejemplo, la cantidad de aceite y la composición de ácidos grasos del mismo, pueden ser modificadas por la modificación de la expresión de los genes que codifican enzimas tales como, sólo a modo de ejemplo, la acetil-CoA carboxilasa (ACCase), aciltransferasa de diacil-glicerol (DGAT), lisofosfatidato acil transferasa (LPAT), fosfatidato fosfohidrolasa (PAPasa), proteína transportadora de acilo (ACP), malonil-CoA: ACP transacilasa, cetoacil-ACP sintasa (KAS), cetoacil-ACP reductasa, 3-hidroxiacil deshidrasa ACP, enoil-ACP reductasa, Estearoil-desaturasa ACP, acil-tioesterasa ACP, glicerol-3-fosfatoaciltransferasa, 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa, citidina-5-difosfato sintasa diacilglicerol, sintasa glicerofosfato fosfatidil, fosfatidilglicerol - 3-fosfato fosfatasa, FAD1-8 desaturasa, fosfatasa del ácido fosfatídico, monogalactosil sintasa glicerol diacilo, digalactosil sintasa glicerol diacilo, proteína de biosíntesis sulfolípida, acilo de cadena larga-CoA sintasa, glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT), diacilglicerol cholinfosfo transferasa, fosfatidilinositol sintasa, acil-CoA diacilglicerol acil transferasa, acil-ACP desaturasa, desaturasa lineoil, desaturasa esfingolípido, oleato 12-desaturasa, acetilenasa de ácidos grasos, epoxigenasa de ácidos grasos, diacilglicerol quinasa, transferasa citidil colinfofosfato, colina quinasa, fosfolipasa, descarboxilasa fosfatidilserina, fosfatidilinositol quinasa, cetoacil-CoA sintasa, factor de transcripción CER, oleosina, 3-cetoacil tiolasa-CoA, acil-CoA deshidrogenasa, enoil-CoA hidratasa, acil-CoA-oxidasa.

Según la invención, se puede obtener un aumento en el contenido total de aceite en las semillas, lo que determina una sobreexpresión de la Acetil CoA carboxilasa de tabaco o la misma enzima de otra especie (por ejemplo, colza). Como ejemplo, se puede obtener una variación en el perfil de ácidos grasos y por lo tanto en el número de yodo, a través del silenciamiento a través de la expresión de construcciones antisentido, la codificación de genes para la desaturasa oleato del plastidio y del retículo endoplásmico. La expresión o el silenciamiento de uno o más de dichos genes en las semillas de las plantas de la invención, se traduce en el hecho de que el aceite producido por dichas semillas puede ser utilizado directamente para la producción de biodiesel, ya que tiene un índice de yodo inferior o igual a 120.

La expresión de dichos genes puede también afectar el porcentaje de aceite en las semillas y las plantas de la invención puede ser además seleccionadas por el contenido de aceite de la semilla que puede ser igual a aproximadamente 38% del peso de la semilla, el 40%, el 48%, el 52%, el 58% y hasta el 60%.

Los genes antes mencionados pueden ser introducidos en vectores para la expresión específica de semillas, tales como las descritas en la solicitud de patente WO03073839 a raíz de la divulgación de las enseñanzas en dicha solicitud. El vector de expresión utilizado para dicha realización será, por lo tanto, un vector que comprende: a. un promotor de un gen vegetal específico para la expresión en los órganos de almacenamiento de semillas; b. una secuencia de ADN que codifica la secuencia de señal de una proteína vegetal capaz de dirigir el producto del gen de interés en los órganos de almacenamiento de semillas a través del retículo endoplásmico, c. una secuencia de ADN que codifica dicho gen de interés privado de la secuencia de señales nativas; d. una señal de parada. Las secuencias de los promotores y los líderes puede pertenecer, por ejemplo, a la globulina de soja 7S o al gen de la beta conglucina de soja, o a genes que codifican las proteínas de almacenamiento de las semillas del tabaco.

Los genes antes mencionados pueden ser introducidos después de uno o más eventos de transformación, o por transformación con varios vectores, o, alternativamente, debido a que plantas pueden ser fácilmente cruzadas, dichos genes pueden ser introducidos singularmente en diferentes individuos de la misma variedad seleccionada y, posteriormente, agrupados en el mismo individuo a través del cruzamiento.

En este caso, será fácil obtener la homocigosis para todos los tipos por la duplicación de los haploides obtenidos mediante cultivos *in vitro* de anteras.

Tabla 1. Contenido en ácidos grasos de algunas variedades de tabaco seleccionados, sólo después de la mutagénesis o modificados y seleccionados con el fin de cambiar la senda metabólica de los ácidos grasos, y seleccionados para la estabilidad del tipo. La tabla señala el resultado obtenido con la mutagénesis y la intervención genética llevada a cabo por la introducción de algunos de los genes mencionados a fin de cambiar la composición de ácidos; el aceite de las tres últimas columnas tiene un título de yodo adecuado para la transformación de dicho aceite en biodiesel.

Componente	PLT 103	PLT 256	PLT 318	PLT 335
Ácido palmítico	6,31%	8,26%	7,15%	17,20%
Ácido palmitoléico	0,11%	0,18%	0,18%	1,25%
Ácido esteárico	2,58%	5,20%	8,50%	12,50%
Ácido oléico	12,62%	22,58%	25,56%	53,27%
Ácido linoléico	77,48	58,78%	52,00%	6,45%
Ácido linolénico	0,65%	4,15%	5,25%	7,80%
Ácido araquídico	0,13%	0,85%	0,80%	0,85%
Ácido eicosanóico	0,13%	0,58%	0,56%	0,68%

Son también objeto de la invención las semillas de las plantas como se describió anteriormente, que, siendo semillas de plantas mutantes, serán también mutantes y por lo tanto contendrán modificaciones de ADN que las hará diferentes de las semillas silvestres. Además, como se indicó anteriormente, dichas semillas pueden tener un diferente número de cromosomas en comparación con las plantas padres (por ejemplo, poliploides) y en la mayoría de los casos, también se transformarán con los vectores antes mencionados.

Cuando la transformación se realiza con vectores que expresan genes relacionados con el metabolismo de los ácidos grasos mencionados anteriormente, dicha semilla también se caracterizará por contener un aceite con un título de yodo inferior o igual a 120 y un porcentaje de aceite comprendido entre el 38% y el 60% del peso total de la semilla.

Es también objeto de la presente solicitud el método para la producción de la planta de la invención que comprende los siguientes pasos:

- a) las semillas producidas a partir de cruzamientos de partida entre individuos de la misma especie del tipo silvestre o variedades seleccionadas, están sujetas a la mutagénesis;
- b) dichas semillas se dejan germinar y las plantas de las generaciones M2-M4 se seleccionan de acuerdo con los siguientes parámetros:
 - i) la presencia de las características que se manifiestan a nivel fenotípico seleccionadas en el grupo formado por la altura de la planta de 80-120 cm, hojas con lámina fina y porte derecho, inflorescencia compacta, número de flores mayores que 100, número de cápsulas mayores que 100 , número de semillas por cápsula mayores que 5.000, tallo fuerte y lignificado, raíces profundas;
 - ii) la estabilidad del tipo seleccionado en las generaciones después de la generación M2;
 - iii) las pruebas de la heredabilidad del tipo seleccionado;

c) las semillas seleccionadas en el punto b) se dejan germinar y las plantas se regeneran a partir de los callos obtenidos del mesófilo de hoja inducido *in vitro* en la presencia de fitohormonas, se seleccionan las plantas que mantienen los tipos elegidos en el punto b) en las generaciones R0-R2;

d) las plantas seleccionadas en el punto c) se siembran en el campo abierto y se seleccionan las que producen al menos 20 quintales por hectárea.

En el método descrito, las plantas obtenidas en el punto a) también puede ser obtenidas por

a') la realización de cruzamientos interespecíficos dentro del género *Nicotiana*, seguido por el cruzamiento inverso de las F1 o por la inducción de anfidiploides por el tratamiento del ápice vegetativo con colchicina.

Las plantas obtenidas con los métodos antes descritos pueden ser sometidas a nuevos pasos e) y / o f) y un pasaje g) como se indica a continuación:

e) la transformación genética de las plantas obtenidas en el punto a-d o a'-d con vectores que comprenden casetes de expresión que expresan los genes de planta para la resistencia a insectos, herbicidas y / o enfermedades fúngicas seleccionadas en el grupo que comprende el gen cry de *Bacillus thuringiensis*, el gen aroA de *Salmonella typhimurium*, el gen de Rpt1 de *N. obtusifolia* y la selección de las así plantas transforman en las generaciones T0-T4 para resistencia a insectos, herbicidas y / o enfermedades fúngicas;

f) transformación genética de las plantas obtenidas en el punto a-d o a'-d con uno o más vectores que comprenden casetes de expresión que expresan genes de semilla del metabolismo de ácidos grasos seleccionados en el grupo que comprende, la acetil-CoA carboxilasa (ACCase), diacilglicerol acil transferasa (DGAT), lisofosfatidato acil transferasa (LPAT), fosfatidato fosfatidato (PAPase), proteína transportadora de acilo (ACP), malonil-CoA: ACP transacilasa, cetoacil-ACP sintasa (KAS), cetoacil-ACP reductasa, 3-hidroxiacil-deshidrasa ACP, glicerol-enoil ACP reductasa, Esteroil-desaturasa ACP, acil-tioesterasa ACP, glicerol-3-fosfatoaciltransferasa, 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa, citidina-5-difosfato sintasa diacilglicerol, sintasa glicerofosfato fosfatidil, fosfatidil -3-fosfato fosfatasa, FAD1-8 desaturasa, la fosfatasa ácido fosfatídico, monogalactosil sintasa glicerol diacilo, digalactosil sintasa glicerol diacilo, la biosíntesis de proteínas sulfolípidas, acilo de cadena larga-CoA sintasa, glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT), diacilglicerol cholinfosfo transferasa, sintasa fosfatidilinositol, acil-CoA diacilglicerol acil transferasa, acil-ACP desaturasa, desaturasa lineoilo, desaturasa esfingolípidos, oleato 12-desaturasa, acililénasa de ácidos grasos, epoxigenasa de ácidos grasos, diacilglicerol quinasa, transferasa citidil cholinfosfato, colina quinasa, fosfolipasa, descarboxilasa fosfatidilserina, fosfatidilinositol quinasa, cetoacil-CoA sintasa, factor de transcripción CER, oleosina, 3-cetoacil-CoA tiolasa, acil-CoA deshidrogenasa, enoil-CoA hidratasa, acil-CoA oxidasa, seguido por la selección de las plantas en las generaciones T0-T4 para características tales como el contenido total de aceite en la semilla y la composición de ácidos grasos de la misma;

g) cruzamiento de los materiales obtenidos en los puntos a-f o a'-f y la selección de las progenies resultantes por características tales como: alta productividad de semilla, alto contenido de aceite en la semilla, composición variable de aceite de ácidos grasos en función del uso previsto, la resistencia a insectos, resistencia a los herbicidas, resistencia a los hongos.

Las plantas en los puntos comprendidos entre b. y f. pueden, a modo de ejemplo, seleccionarse por la presencia de características que pueden ser señaladas por el análisis químico, como el contenido total de aceite de la semilla y / o el contenido en un solo componente ácido de la semilla y / o el contenido de proteínas de las semillas.

Otro objeto de la invención es un método para extraer aceite de semillas del tabaco en el que el rendimiento de aceite es igual a los valores de 70 a 95% del aceite contenido en dichas semillas, que comprende los siguientes pasos:

- a) extraer de forma mecánica dicho aceite presionando el aceite productivo y una torta de aceite residual;
- b) filtrar dicho aceite producido en el paso a) con filtros de papel o tela.

El método antes indicado tiene, sorprendentemente, un rendimiento superior al 70%, que es un rendimiento totalmente inesperado después de usar dichos métodos de presión en semillas tan pequeñas como las del tabaco. En la presente invención, en la que se seleccionan plantas que tienen una alta producción de semillas con el objetivo de aumentar la producción de aceite de tabaco por planta, el descubrimiento de que el método de presión aplicado a las semillas de tabaco tiene un rendimiento comparable a los rendimientos que puedan obtenerse en las semillas de gran tamaño, tiene aplicaciones muy ventajosas.

Además de los menores costos de producción y los rendimientos totalmente inesperado dado el estado de la técnica, dicho método permite la extracción de aceite de tabaco directamente en los sitios donde se puede utilizar para ámbitos energético.

En una realización, la semilla de la invención puede ser objeto de presión en frío, con un tornillo de prensa u otro tipo de prensa, cargada con las semillas. La prensa puede alcanzar temperaturas de hasta unos 60 ° C en el momento de funcionamiento regular y el aceite extraído de la semilla se recoge y se filtra en papel o con prensa de filtro de tela. Otros sistemas de prensado adecuado para las semillas pueden ser utilizados para el prensado de las semillas del tabaco.

Con el fin de mejorar el rendimiento del método de la invención, cuando la productividad de aceite de la semilla deba ser explotado al máximo, es posible llevar a cabo un paso adicional de

- c) extracción química con disolventes el aceite residual presente en la torta de aceite obtenido en el punto a).

Tabla 2. Características del aceite de tabaco obtenido por prensado de la semilla y filtrado. La tabla señala el valor calorífico bruto más alto, el bajo contenido de azufre, la viscosidad baja en comparación con otros aceites vegetales.

	Mis. Las Naciones Unidas.	Métodos
	236,0 ° C	UNI EN ISO 27 19 2005
Azufre	<0,01	ISO 8754 1992
Cenizas	0.005	EN ISO 6245 2002
Viscosidad a 50 ° C	21.630	UNI EN ISO 3104 200
Punto de fusión	-18	ISO 3016 1994
Valor calorífico	9,670	ASTM D240-97
Masa de volumen a 15 ° C	925,0	UNI EN ISO 3675 2002
Índice de saponificación	193,6	ASTM D94-02

También es objeto de la invención el uso de las plantas de la invención y/o de sus semillas para la producción de combustibles líquidos o sólidos, biodiesel, lubricantes industriales,

materiales plásticos, tales como linóleo, suplementos dietéticos para alimentación animal, suplementos dietéticos para uso humano.

Las plantas de la invención, de hecho, muestran las características que son muy ventajosas para la producción de dichos productos como:

- producen un aceite obtenido por presión, que es ideal, también sin el refinamiento como un simple filtrado es suficiente, para ser utilizado como aceite combustible, ya que tiene un aspecto claro, una viscosidad cinemática a 40° C, de 29,11 mm²/s, y a 50° C de 21,63 mm²/s, y un contenido de azufre menor al 0,01%, entrando en una clase con muy buenas características físicas y termodinámicas;
- producen un aceite, obtenido a partir de presionar la semilla que, incluso en la más simple realización de la invención, por lo tanto, sin la transformación para la expresión de genes del metabolismo de ácidos grasos que se ha indicado anteriormente, podrá utilizarse para la producción de biodiesel una vez mezclado, por ejemplo, con el 25% de aceite de palma, o con otros porcentajes de aceite vegetal con un título bajo en yodo, a fin de reducir el índice de yodo al 120 y que, en la realización que comprende la expresión de uno o varios de dichos genes, con el fin de cambiar el metabolismo de ácidos grasos, se puedan usar directamente para su transformación en biodiesel, con un índice de yodo igual a 120, o mejor aún igual a 100, o mejor aún, igual a 80;
- producen una torta de aceite, resultante del prensado de la semilla, con un contenido de aceite de forma variable de alrededor del 6 a 12% y un contenido de proteínas de alrededor del 35%, que es ideal para la oferta alimentaria de alimento para animales debido a su alto contenido de ácidos grasos de omega 6 (ácido linoleico);
- producen una torta de aceite resultante del prensado de la semilla que, como alternativa a su uso en alimentación animal, puede utilizarse como combustible sólido precipitado en las plantas de carbón o biomasa granulados debido a su poder calorífico superior a 4.950 kcal/kg;
- producen un aceite con un punto de inflamación de 236° C y un punto de fusión de -18° C por lo tanto aptas para su uso como lubricantes no contaminantes, por ejemplo, para las cadenas de motosierra, o como lubricantes en general;
- producen un aceite que, teniendo en cuenta su composición, abundante en ácidos grasos poliinsaturados (C18:2, PUF A) que son esenciales para los seres humanos y son por lo tanto necesarios para alcanzar la salubridad (omega 6), se puede utilizar como alimento o como suplemento dietético para los seres humanos;
- producen una biomasa residual (hojas, tallos, inflorescencias, revestimiento de cápsulas) después de la cosecha de semillas, que puede alcanzar valores de 100 quintales por hectárea, o mejor, de 200 quintales por hectárea o, mejor aún, de 300 quintales por hectárea con la posibilidad de seguir mejorando el rendimiento por hectárea;
- producen una biomasa residual que puede ser utilizada para los usos que normalmente se le asigna, como, por ejemplo, la gasificación, la combustión, pirólisis, digestión anaeróbica, fermentación o la explosión de vapor, lo que contribuye a mejorar el rendimiento económico del cultivo.

En consecuencia, objeto de la invención es el uso de las plantas de la invención, en general, para la producción a gran escala de las semillas del tabaco.

Objeto de la invención es el uso de las mencionadas plantas y/o semillas para la producción de aceite de tabaco.

También objeto de la invención es el uso de las plantas y/o las semillas para la preparación de combustibles a base de aceite de tabaco o de combustibles esencialmente consistentes en aceite de tabaco para calderas o motores diesel.

En una realización particularmente ventajosa de la invención, dicho aceite de tabaco se obtiene con el método de prensado de la invención y no por la extracción con disolventes.

El método de extracción de la invención, de hecho, permite la producción de un aceite que se puede utilizar directamente como combustible, debido al hecho de que dicho aceite tiene una viscosidad cinemática de 29,11 mm²/s, a 40° C y de 21,63 mm²/s, a 50° C, que permite nebulizarlo en quemadores sin la necesidad de un tratamiento fluidificante previo a la calefacción.

Otro objeto de la invención es el uso de las plantas y/o las semillas de la invención para la elaboración de biodiesel mezclando aceite de semillas de tabaco con, por ejemplo, el 25% de aceite de palma o con otros porcentajes de aceites vegetales reduciendo el título final de yodo. La producción de biodiesel según la invención puede ser llevada a cabo mezclando el aceite de tabaco extraído con el método descrito anteriormente (presión) con aceites vegetales capaces de bajar su título de yodo a un valor igual o inferior a 120.

También objeto de la invención es el uso de las plantas y/o semillas de la invención para la preparación de las aceite de semillas de tabaco con un título de yodo igual o inferior a 120 sin llevar a cabo ningún procedimiento destinado a reducir el título de yodo en el aceite extraído de acuerdo con el método de la invención. En esta realización de la invención, las plantas transgénicas y/o semillas transgénicas que expresan uno o más genes, entre los que figuran más arriba, del metabolismo de ácidos grasos según la invención que producen un aceite de tabaco con un título de yodo igual o inferior a 120 son utilizadas.

En este caso, por lo tanto, no se llevará a cabo el proceso de refinado o de tratamiento del aceite tras el prensado de acuerdo con la invención, a fin de reducir el título de yodo del aceite así obtenido. El biodiesel de acuerdo con la invención, por lo tanto, puede tener una composición de 100% de aceite de tabaco. El biodiesel se obtiene a partir del aceite de tabaco de acuerdo con los procedimientos normales de transesterificación con metanol, conocido para la persona experta en la materia.

En una realización de la invención el biodiesel estará totalmente compuesto de aceite de tabaco con un título de yodo inferior a 120, o incluso igual o inferior a 100, o incluso igual o inferior a 80, dicho aceite se transesterifica con metanol de acuerdo con los métodos conocidos por el experto.

Objeto de la invención es también el uso de las plantas y/o las semillas de la invención para la preparación de combustibles sólidos para plantas de carbón o biomasa granulados. En este caso, la biomasa resultante del cultivo puede ser utilizada, dicha biomasa con un poder calorífico superior a 4.200 Kcal/kg.

Objeto de la invención son también los combustibles obtenibles como se indicó anteriormente, es decir, los combustibles que comprenden la torta de aceite obtenida de prensar las semillas del tabaco.

Como alternativa, las plantas y/o las semillas de la invención, pueden ser utilizadas para la preparación de los complementos alimenticios para la alimentación animal. La torta de aceite resultante del prensado de las semillas de tabaco de acuerdo con la invención, tiene un contenido de aceite de aproximadamente 6% a aproximadamente 12% y un contenido de proteínas de alrededor del 35% del peso de la torta de aceite y un alto contenido en ácidos grasos de omega 6 (ácido linoleico) que la hace ideal para dicho ámbito de aplicación. En los ensayos realizados en la cría de lechones, la sustitución de la harina proteína de de soya,

por la torta de aceite de tabaco en porcentajes variables de 3% a 7% en las dietas isoproteicas, no mostró diferencias significativas en el desarrollo de los animales.

En una realización más de la invención, las plantas y/o las semillas de la invención pueden ser utilizadas para la preparación de lubricantes no contaminantes. A modo de ejemplo, el aceite obtenido con el método de la invención, de las plantas de producción de la semilla de la invención que no tiene otras modificaciones además de las mutaciones para la aparición de los caracteres básicos (es decir, la alta producción de semillas) ya muestran un punto de inflamación 236° C y un punto de fusión de -18° C, características que lo hacen adecuado para su uso, incluso como tal, como lubricante no contaminante, por ejemplo, para cadenas de sierra o motores en general.

En otra realización, las plantas y/o semillas de la presente invención, pueden ser utilizadas para la preparación de los alimentos o complementos alimenticios para uso humano.

En este caso, el aceite obtenido por el proceso de la invención, se perfeccionará para eliminar ceras, gomas, carbohidratos complejos, fosfolípidos y su desacidificación. Una vez refinado puede ser utilizado como tal o como complemento dietético para uso humano. La ventaja de dicho uso está dada por la riqueza de dicho aceite en ácidos grasos poliinsaturados (C18: 2, PUF A), que son esenciales para los seres humanos y que son necesarios por razones de salud (omega 6).

Es evidente que todas las realizaciones que prevé el uso de aceite de semillas de tabaco, de preferencia obtenidos por prensado o de torta de aceite resultantes del prensado de semillas, se puede realizar también en plantas de tabaco no mutagenizadas. La ventaja indiscutible de las plantas de la invención está, obviamente, dada por la alta producción de semillas y el resultante rendimiento superior del producto obtenido de las plantas de la invención y de sus semillas en comparación con el rendimiento obtenido de plantas silvestres y de semillas de tabaco plantado en un zona de cultivo similar y con métodos de cultivo similares.

El uso de aceite de tabaco para la elaboración de lubricantes, de complementos dietéticos humanos o animales no ha sido divulgada en la materia. Obviamente, también todas las realizaciones en las que un aceite con un título de yodo igual o inferior a 120 extraído por prensado y no más tratado nunca han sido descritas.

Las plantas de la invención, también muestran una biomasa residual (hojas, tallos, cápsulas e inflorescencias de recubrimiento) que, después de la cosecha de semillas, pueden alcanzar valores de entre 100 y 300 quintales por hectárea o más, el uso de las plantas de la invención como una fuente de biomasa, para los procesos de gasificación, combustión, pirólisis, digestión anaerobia, digestión aeróbica, fermentación o explosión de vapor que se describen en la técnica, a fin de incrementar el rendimiento económico del cultivo, es por lo tanto, un objeto de la invención.

Objeto de la invención son: un aceite de semillas de tabaco obtenido de las semillas de las plantas de la invención con el método de extracción de la invención, un biodiesel obtenido por dicho aceite mediante transesterificación, los combustibles que comprende dicho aceite, complementos alimenticios para los seres humanos que se derivan de dicho aceite aún más refinado, lubricantes que comprende dicho aceite, aceite de semillas de tabaco obtenido de las semillas de las plantas de la invención por el método de extracción de la invención que se caracteriza porque tiene un título de yodo igual o inferior a 120, sin necesidad de mezclarlo con otros aceites para reducir dicho título, el biodiesel que comprende dicho aceite con un título de yodo igual o inferior a 120.

EJEMPLOS:

EJEMPLO 1

Mutagénesis química

La semilla de la variedad seleccionada para la inducción de mutaciones mediante mutagénesis química, se ha colocado en un matraz aforado de 100 ml en la cantidad de 20 gr por experimento, que corresponde a alrededor de 200.000 semillas. 50 ml de agua desionizada se han añadido al matraz y las semillas han sido rehidratadas durante 14 horas a 25 ° C. El agua que se ha sustituido con una solución acuosa al 0,5% de EMS. Las semillas se han juntado con un imán durante un tiempo variable de 0,5 a 5 horas, dependiendo de la variedad, que en los ensayos preliminares mostraron una mayor frecuencia de mutación de los caracteres morfológicos como la altura de la planta, las dimensiones de las semillas, forma de hojas, cantidad de cápsulas, la producción de semillas por planta, etc

Una vez finalizado el período de tratamiento, la solución mutagénica ha sido eliminada vertiendo las semillas en un colador fino y enjuagándolas durante varios minutos con agua corriente. Después, las semillas se han enjuagado 6 veces en un frasco, añadiendo 50 ml de agua y agitándolas durante 10 minutos en cada lavado.

Las semillas que han sido secadas en papel filtro y se han enviado a una empresa especializada para la granulación.

Las semillas granuladas tenían un diámetro final de 1,2 mm y se han utilizado para la siembra directa en campo (M_1) en una densidad de 100.000 plantas por hectárea. La generación M_1 se ha permitido florecer, y ha sido examinada por la posible presencia de mutaciones dominantes y, una vez que las semillas están maduras, una cápsula de cada planta ha sido cosechada a mano a fin de obtener la semilla de masas que se ha utilizado para el campo abierto de siembra del año siguiente y para el cribado fenotípico de la generación de M_2 . Cada mutante de interés ha sido singularmente recolectado y controlado en las siguientes generaciones.

EJEMPLO 2

variantes de inducción somaclonal

La semilla de la variedad seleccionada para la inducción de variantes somatoclonal ha sido esterilizada por inmersión durante 5 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 20% seguido de una inmersión durante 1 minuto en etanol al 70%, seguido por 5 lavados en agua estéril. La semilla se han permitido germinar en envases de plástico rectangular de 10 cm de ancho y de 12 cm de altura que contienen medio MS agarizado. De las plantas completamente desarrolladas, las piezas de 0,5 cm por cada lado de la hoja han sido cortadas y colocadas en discos de Petri con MS1 (MS + 1 mg/l 2,4-D) medio con el fin de inducir la formación del callo. También F_1 individuales procedentes de cruces interespecíficos han sido utilizados. El callo de recogida de discos de hoja se ha colocado en medio MS1 líquido en matraces de 250 ml que contienen 50 ml de medio y agrupado a 80 rpm en un plato giratorio mantenido a 28° C con un fotoperíodo de 16 horas.

El callo se ha mantenido en cultivo líquido por varias generaciones renovando el cultivo cada 20 días e inoculando un nuevo frasco de medio líquido de 50 ml con 2,5 ml del cultivo anterior. En cada generación de una parte de los callos fueron distribuidos en placas de Petri que contienen medio MS2 agarizado (MS + 1 mg/ l ANA + 1,5 mg/ l Kinetina) con el fin de inducir la formación de brotes que, una vez alcanzado los 2 cm de longitud fueron trasladados en medio MS3 (MS + 1 mg/l de IBA) a raíz y para la siguiente transmisión en maceta en un invernadero. Las variantes obtenidas se analizaron en las generaciones R_1 y R_2 , las dimensiones de las hojas, la forma de las hojas, las dimensiones de las cápsulas, el número de semillas por cápsula, el contenido de aceite de las semillas, etc.

EJEMPLO 3

Cruzamiento y duplicaciones cromosómicas

Muchas especies de *Nicotiana* son sexualmente compatibles con *Nicotiana tabacum* y, aunque el producto de cruce es estéril, es posible retrocruzamiento usando las plantas de los padres como los polinizadores o inducir la formación de anfidiplóides. En esta especie, la labor se ve facilitada por el hecho de que es posible obtener población de híbridos intergenéricos F_1 de muchos miles de personas, lo que permite llevar a cabo el programa de mejora sobre la base de anfidiplóides. Los cruces se han llevado a cabo tanto mediante *Nicotiana* spp. padres que tienen el mismo número de cromosomas (por ejemplo, *N. paniculata* x *solanifolia* N., *N. tabacum* x *N. rustica*) o un número de cromosomas distinto (p. ej. *N. tabacum* x *paniculata* N., *N. tabacum* x *N. longiflora*). Las F_1 individuales, obtenidas por una combinación de cruzamiento han sido cultivadas en invernadero, a fin de comprobar sus características fenotípicas y cruzarlas con las plantas de ambos padres, así como en germinación in vitro y micro multiplicación. El material de micro multiplicación se ha utilizado para llevar a cabo experimentos duplicación de un cromosoma de un tratamiento con colchicina en la fase de reproducción de brotes o más tarde después del trasplante en maceta y antes de la floración. Los brotes de las semillas germinadas se han reducido en la base y trasladado en medio MS con 2 mg/litro de benzilaminopurina (BAP). Después de cerca de 4-5 - semanas los brotes laterales formados fueron eliminados y mantenido en el mismo medio. Con el fin de obtener plantas enteras se realizó la transferencia en medio MS sin hormonas con el fin de inducir la formación de raíces. Después de pocos días de la transferencia de los brotes cortados en el medio de enraizamiento, una gota de un 0,5% de solución de colchicina se colocó en el mismo. Una vez que las plantas de raíz, fueron trasladados en macetas en un invernadero y se les permite florecer a fin de comprobar su fertilidad y su capacidad de formación de las semillas vitales. En algunos casos, a fin de permitir la hibridación entre especies diferentes, ha sido necesario duplicar los aploides y realizar la hibridación en autotetraploides.

Los materiales obtenidos por las generaciones retrocruzamiento o por la *propagación in vitro*, seguida de la duplicación de un cromosoma se examinaban para ver sus características fenotípicas y, opcionalmente, utilizados en los programas de mejoramiento genético.

El control de número de cromosomas en las líneas de anfidiplóides estabilizadas se ha llevado a cabo utilizando el ápice radicular.

EJEMPLO 4

Transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Día 1: una pequeña cantidad de *Agrobacterium tumefaciens* de la cepa EHA 105 que contiene el plásmido de interés, recogidas en un cultivo en la placa de Petri con un mango estéril, se ha inoculado en 2 ml de medio LB estéril. Posteriormente, una hoja de una planta sana que presenta alteración alguna y que muestra, por otra parte, las condiciones de turgencia ideal, se ha recogido. La hoja ha sido brevemente enjuagada en agua bidestilada para eliminar las impurezas superficiales, y se sumergió en un 20% de hipoclorito de sodio 0,1% SDS solución durante 8 minutos y se deja secar en un flujo de gabinete estéril y todas las operaciones sucesivas se han llevado a cabo en condiciones estériles. En particular, las hojas se sumergen en etanol al 95% y juntado con el fin de mojar completamente ambos lados durante unos 30 a 40 seg. La hoja se ha dejado secar por completo.

Con un punzón esterilizado de discos de etanol de la superficie de todas las hojas se han obtenido y se han eliminado en los platos que contengan antibióticos-MS10 libre, en detalle, no más de 30 discos por placa han sido colocados. Posteriormente, 2 ml de LB más *Agrobacterium* (recién inoculadas) se han vertido en el plato y la suspensión bacteriana se

ha distribuido de manera uniforme con un suave movimiento de rotación con el fin de obtener una distribución homogénea de bacterias en los discos. El LB en exceso ha sido cuidadosamente aspiración con una pipeta. Un control negativo en el que nada o LB sólo se ha añadido ha llevado a cabo.

Las placas han sido incubados por lo tanto, durante 24-48 horas a 28 ° C, con una iluminación constante y el crecimiento bacteriano ha sido señalado por la aparición de un halo opaco fina difuso en toda la placa.

Día 2: los discos de hoja han sido cuidadosamente trasladado en un plato que contenía MS10 + cefotaxime 500 mg / l, y se incuba durante 6 días a 28 ° C, en la iluminación constante. Este paso determina la inactivación de *Agrobacterium*.

Día 8: los discos de hoja que han sido cuidadosamente transferida a MS10 + cefotaxima 500 mg / l, y Kanamicina 200 mg / l, y se incuba durante 14 días a 28 ° C, en la iluminación constante. Este paso determina la selección de las plantas transformadas desde el gen de resistencia kanamicina es llevado por el plásmido insertado en *Agrobacterium*.

Día 22: los discos de hoja que han crecido en el tiempo, formando un callo, han sido cuidadosamente transferida a MS10 + cephotaxime 500 mg / l, kanamycine 200 mg / l carbenicilina y 500 mg / l, y se incuba durante 6 días. Este paso se determina la eliminación de la agrobacterias que sobrevivieron posiblemente a los tratamientos anteriores a los antibióticos.

Día 28: los discos de hoja, una vez más han sido transferidas a MS10 + cefotaxima 500 mg / l, y kanamicina 200 mg / l, y se incuba a la aparición de brotes. Una vez que los brotes presentaron al menos dos hojas, que han sido separadas de la masa de callo y enraizamiento transferido a medio MSO + cefotaxima 500 mg / l, y kanamicina 200 mg / l.

Una vez que aparecieron las raíces, las plantas pequeñas se han extraído de la placa, liberada de los residuos de agar-agar, se enjuaga suavemente con agua corriente y se plantaron en pequeñas macetas de plástico en el suelo y la arena (2:1). El suelo ha sido previamente saturado con agua, posteriormente, las ollas se han cubierto con tapas de plástico transparente con el fin de mantener condiciones de alta humedad y se han colocado en una cámara de cultivo a 25 ° C con un período de iluminación diaria de 16 horas. El transgén se proyectó en todas las plantas recogiendo una parte de hojas (250 mg), extrayendo ADN y la realización de un análisis de PCR en primera y que, en las plantas positivo, un análisis Sureño a fin de verificar el número de copias del transgén.

EJEMPLO 5

Extracción de aceite de la semilla.

La semilla de tabaco producida por determinadas variedades seleccionadas se ha utilizado para la producción de aceite. En un caso, la semilla analizada tiene un contenido de humedad de 7,01% y un contenido de materias grasas (extracción con hexano) del 39,4%. La extracción de aceite se ha llevado a cabo como una extracción en frío, utilizando el modelo de prensa de tornillo Komet (IBG, Alemania), cargado de forma manual con las semillas del tabaco. En el estado estacionario, la prensa ha alcanzado y mantenido a una temperatura de 60 ° C. Después de presionar el aceite se filtró en papel y muestra características de alta claridad. El rendimiento del aceite extraído ha demostrado ser el 81,1% del aceite total contenido en la semilla. La torta de aceite residual tenía un contenido de aceite de 0,74% y un contenido de proteína de 34,5%.

EJEMPLO 6

Pruebas de combustión

El aceite extraído en frío y filtrado con filtros de papel como en el ejemplo 5, se transesterifica con alcohol metílico en presencia de NaOH. El aceite se calentó hasta 55 ° C y la solución metanol-NaOH añadida y mezclada durante 90 minutos. Al final de este paso, después de enfriar, la mezcla se le ha permitido estratificar dividiendo así la capa inferior de glicerol de la de éster. El éster se lavó dos veces con agua y en el primer lavado se agrega ácido fosfórico (2,5 ml / l) al agua. Al final del proceso el aceite se calentó al vacío a 90 ° C con el fin de eliminar todos los residuos de agua y el éster obtenido se denomina con la abreviatura TOE (éster de aceite de tabaco). Los ensayos se han llevado a cabo con un motor diesel de inyección indirecta (detalles: 4 cilindros, bomba de inyección rotativa, relación de compresión 21.5:1, potencia máxima de 55 kW a 4500 rpm). Antes de las pruebas de combustión, se verificaron los parámetros analíticos, tales como la viscosidad a 50 ° C (21,63 mm² / s), punto de fusión (-18 ° C), valor calorífico superior (9.670 kcal / kg), la masa de volumen a 15 ° C (925,0 kg de / m³), azufre (<0,01% m / m), cenizas (0,005% m / m). Durante la prueba, se usó un analizador de gases y un dinamómetro hidráulico. El éster de aceite se usó mezclado en un 20% con el diesel con las siguientes características principales en comparación con TEO (indicado entre paréntesis): la densidad de 840,8 (886,6), la viscosidad a 40 ° C 2,9 (3,3), el contenido de azufre (mg / kg) 6750 (6). Los resultados de las pruebas no señalaron variaciones detectables en el rendimiento del motor usando los dos productos y mostró una combustión más completa que dio lugar a una mayor eficiencia térmica cuando el diesel se añadió con TEO.

El CO producido es menor en la mezcla, en comparación con el diesel único y también el contenido de azufre es inferior, lo que determina una disminución en la emisión de SO₂ (hasta el 40%).

EJEMPLO 7

Pruebas de alimentación animal

La torta de aceite obtenida del prensado de las semillas de tabaco ha sido analizada con el fin de evaluar su idoneidad para el uso como complemento dietario de proteínas en la alimentación animal. Los datos analíticos de la torta de aceite resultante del punto de prensado a un contenido de materias grasas de los 10,74%, un contenido de proteína de 34,5% y una humedad y sustancias volátiles del 5,97%. El total de los aminoácidos después de la hidrólisis de la muestra es: ácido aspártico 2,40%, 1,06% treonina, serina 1,17%, 5,53% de ácido glutámico, prolina 0,83%, 1,29% de glicina, alanina 1,18%, 1,27% de la valina, metionina 0,45%, isoleucina 1,13%, leucina 1,84% tirosina, 0,97% fenilalanina 1,43%, histidina 0,72% lisina, 0,72% arginina, 3,36%. Del contenido total de sustancias grasas, el 76,59% se compone de ácido linoleico que se atribuye a la clase de Omega 6, que son de particular relevancia para la dieta de los animales.

El ensayo de alimentación se ha realizado en los lechones con un peso inicial de alrededor de 8 kg, divididos en dos grupos, cada uno de 20 individuos, un grupo de control alimentado con un alimento con un complemento de la proteína de soja (C), el segundo con la misma cantidad de proteínas con respecto a la primera, en la que la soja fue sustituida parcialmente con 3% de la torta de aceite de tabaco (T). Los animales tratados con la torta de aceite no presentaron ningún problema en principio y continua para toda la duración de la prueba de la ingesta de dicho alimento. La prueba fue un seguimiento constante y los lechones no mostraron problemas gastrointestinales. Los animales mostraron un crecimiento de un peso diario diferente (237 gr/cabeza/día, con tortas de aceite de tabaco, 170 gr/cabeza/día, con la torta de aceite de soja), y una final, después de 27 días, con un peso de 15,2 kg para T y 12,8 para la categoría C.

REIVINDICACIONES

CLAIMS

1. A mutagenised tobacco plant characterised in that it produces a seed quantity of at least 20 quintals per hectare.

2. The plant according to claim 1, wherein said seed quantity is of about 50 quintals per hectare, or of about 70 quintals per hectare, or of about 90 quintals per hectare.

3. The plant according to anyone of claims 1 or 2, characterised in that it is further modified in the fatty acid metabolism by genetic transformation and by the fact that it produces a seed containing an oil having a iodine title lower or equal to 120.

4. The plant according to anyone of claims from 1 to 3, characterised in that it is further modified in the fatty acid metabolism by genetic transformation and by the fact that it produces a seed containing an oil percentage comprised between about 40% to about 60% of the seed.

5. The plant according to claims 3 or 4, modified by transformation with one or more expression vectors comprising a seed specific expression cassette comprising, ordered from 5' to 3' a DNA sequence coding for a promoter of a plant gene specific for the expression in seed storage organs; a DNA sequence coding for the signal sequence of a plant protein capable of directing said protein to the endoplasmic reticulum (ER); a DNA sequence coding for a signal sequence capable of directing the protein to the plastid or a DNA sequence coding for a signal sequence able to anchor the protein to the ER; a DNA sequence coding for a protein selected from the group comprising the genes acetyl-CoA carboxylase (ACCase), diacyl-glycerol acyltransferase (DGAT), lysophosphatidate acyl transferase (LPAT), phosphatidate phosphohydrolase (PAPase) acyl protein carrier (ACP), malonyl-CoA:ACP transacylase, ketoacyl-ACP synthase (KAS), ketoacyl-ACP reductase, 3-hydroxyacyl-ACP dehydrase, enoyl-ACP reductase, stearoyl-ACP desaturase, acyl-ACP thioesterase, glycerol-3-phosphateacyltransferase, 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, cytidine-5-diphosphate-diacylglycerol synthase, phosphatidyl glycerophosphate synthase, phosphatidyl glycerol-3-phosphate phosphatase, FAD1-8 desaturase, phosphatidic acid phosphatase, monogalactosyl diacyl glycerol synthase, digalactosyl diacyl glycerol synthase, sulpholipid biosynthesis protein, long chain acyl-coA synthase, glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT), diacylglycerol cholinephospho transferase, phosphatidylinositol synthase, acil-CoA diacylglycerol acyltransferase, acyl-ACP desaturase, lineoyl desaturase, sphingolipid desaturase, oleate 12-desaturase, fatty

acid acetylase, fatty acid epoxidase, diacylglycerol kinase, cholinephosphate
cytidyl transferase, choline kinase, phospholipase, phosphatidylserine decarboxylase,
phosphatidylinositol kinase, ketoacyl-CoA synthase, CER transcription factor, oleosin,
3-ketoacyl-CoA thiolase, acyl-CoA dehydrogenase, enoyl-CoA hydratase, acyl-CoA
5 oxidase, and a polyadenylation signal.

6. The plant according to anyone of the preceding claims characterised in
that it is further modified by genetic transformation for insects, herbicides and fungi
resistance..

7. The use of the plant according to anyone of claims from 1 to 6, for the
10 production of seeds for the manufacturing of tobacco oil, fuel oils, biodiesel, animal
dietary supplements, solid fuels, human dietary supplements, lubricants.

8. The use of the plant according to anyone of claims from 1 to 6, for the
production of biomass for biochemical conversion or for thermochemical conversion
by direct combustion, carbonisation, pyrolysis, gasification, anaerobic digestion,
15 aerobic digestion, alcoholic fermentation or steam explosion procedures.

9. A method for the production of the plants according to anyone of
claims from 1 to 4, comprising the following steps:

a) subjecting to mutagenesis seeds produced by initial crossings between
individuals of the same species belonging to wild type or to selected varieties;

20 b) allowing said seeds to germinate and selecting the plants of the M2-
M4 generations according to the following parameters:

i) presence of one or more phenotypic manifest characteristics selected from:
plant height 80-120 cm, leaves with a thin lamina and upright bearing, compact
inflorescence, flowers number higher than 100, capsules number higher than 100,
25 number of seeds per capsule higher than 5,000, lignified and robust stalk, deep roots;

ii) stability of the selected character in the generations following M2;

iii) verification of the hereditariness of the selected character;

c) allowing to germinate the seeds selected at step b) and regenerating the
plants starting from the leaf mesophyll callus induced *in vitro* at the presence of
phytohormones and selecting the plants maintaining the characters selected at step b)
30 in the R0-R2 generations;

d) seeding in open field the plants selected at step c) and further selecting
plants producing at least 20 quintals of seed per hectare.

10. The method according to claim 9 wherein step a) is substituted by step

35 a') producing mutagenised seeds by carrying out interspecific crossings in
the *Nicotiana* genus, followed by backcrossing of the F1 individuals or by
amphidiploids induction by treating the vegetative apex of the plants produced by

said crossings with colchicine.

11. Method according to claims 9 or 10 further comprising the following steps:

e) transforming the plants obtained at step d) with vectors comprising expression cassettes expressing in plant genes for insects, herbicides and/or fungal diseases resistance and selecting the thus transformed plants in the T0-T4 generations for insects, herbicides and/or fungal diseases resistance and/or;

f) transforming the plants obtained at step d) with one or more vectors comprising expression cassettes expressing in seed genes of the fatty acids metabolism followed by selection of the transformed plants in the T0-T4 generations for characteristics such as total oil content of the seeds and fatty acid composition of the same;

g) crossing the plants obtained at steps e) and/or f) and selecting the resulting progeny for one or more of the characteristics selected in the group: high seed production ability in a quantity higher than 40 quintals per hectare, seed oil content higher than the 42%, iodine title in the oil obtained from the seeds of said progeny lower than 120, fatty acids composition of the oil contained in said progeny seeds variable with respect to the wild type plant, insect resistance, herbicides resistance, fungi resistance.

12. The seed of the plants according to anyone of claims from 1 to 6.

13. The use of the seed according to claim 12 for the manufacturing of tobacco oil, fuel oils, biodiesel, animal dietary food supplements, solid fuels, dietary food supplements for humans.

14. A method for the extraction of oil from tobacco seeds wherein the oil yield is between the 70 and the 95% of the oil contained in said seeds comprising the following steps:

a) mechanically extracting said oil by pressing with helical press and obtaining oil and a residual oilcake;

b) filtering said oil extracted in step a) with paper or cloth filters.

15. The method according to claim 14 further comprising step

c) chemically extracting by the use of solvents the residual oil contained in the oilcake obtained in step a).

16. The method according to claims 14 or 15 wherein said oil is extracted from seeds according to claim 12.

17. The method according to claims 15 or 16 further comprising step

d) refining the oil obtained in steps a) or b), and c).

18. Tobacco's seed oil obtainable with the extraction method according to

claims 15 or 16 characterised in that it has a iodine title lower than or equal to 120.

19. Biodiesel comprising oil of tobacco seeds according to claim 12, transesterified with methanol.

20 Food supplement for human use characterised in that it comprises tobacco's seeds oil obtainable with the process according to claim 17.

21. Feed supplement for animal use comprising the oilcake obtainable in step a) of claims 14 or 16 when depending from claim 14.

22. Solid fuel comprising the oilcake obtainable in step a) of claims 14 or 16 when depending from claim 14.

23. Industrial lubricant comprising the tobacco's seed oil obtainable from anyone of the claims from 14 to 16.

REIVINDICACIONES EN ESPAÑOL

REIVINDICACIONES

1. Una planta de tabaco mutagenizada que se caracteriza porque produce una cantidad de semillas de al menos 20 quintales por hectárea.
2. La planta, según la reivindicación 1, donde la cantidad de semillas es de alrededor de 50 quintales por hectárea, o de alrededor de 70 quintales por hectárea, o de alrededor de 90 quintales por hectárea.
3. La planta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizada porque se modifica también en el metabolismo de ácidos grasos mediante la transformación genética y por el hecho de que produce una semilla que contiene un aceite que tiene un título de yodo inferior o igual a 120.
4. La planta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque se modifica también en el metabolismo de ácidos grasos mediante la transformación genética y por el hecho de que produce una semilla que contiene un porcentaje de aceite comprendido entre alrededor del 40% al 60% de la semilla.
5. La planta según las reivindicaciones 3 o 4, modificada por la transformación de uno o varios vectores de expresión que comprenden un casete de semillas específicas de expresión que comprende, ordenados a partir de 5' a 3' una secuencia de codificación de ADN para un promotor de un gen vegetal específico para la expresión en los órganos de almacenamiento de semillas; una secuencia de codificación de ADN para una secuencia de señales de una proteína vegetal capaz de dirigir dicha proteína al retículo endoplasmático (RE); una secuencia de codificación de ADN para una secuencia de señales capaz de dirigir la proteína al plastidio o una secuencia de codificación de ADN para una secuencia de señales capaz de anclar la proteína a la RE; una secuencia de codificación de ADN para una proteína seleccionada del grupo formado por los genes acetil-CoA carboxilasa (ACCase), diacil-glicerol aciltransferasa (DGAT), lisofosfatidato acil transferasa (LPAT), fosfatidato fosfohidrolasa (PAPase), proteína transportadora de acilo (ACP), malonil-CoA:ACP transacilasa, cetoacil-ACP sintasa (KAS), cetoacil-ACP reductasa, 3-hidroxiacil ACP dehidrasa, enoil-ACP reductasa, Estearoil-ACP desaturasa, acil-ACP tioesterasa, glicerol-3-fosfateaciltransferasa, 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa, citidina-5-difosfato diacilglicerol sintasa, glicerofosfato fosfatidil sintasa, fosfatidil glicerol-3-fosfato fosfatasa, FAD1-8 desaturasa, fosfatasa del ácido fosfatídico, monogalactosilo diacilo glicerol sintasa, digalactosil diacilo glicerol sintasa, proteína de biosíntesis sulfolípidas, sintasa de acilo-CoA de cadena larga, glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT), diacilglicerol colinafosfotransferasa, fosfatidilinositol sintasa, acil-CoA diacilglicerol acil transferasa, acil-ACP desaturasa, desaturasa lineoyl, desaturasa esfingolípidos, oleato 12-desaturasa, acetilenasa de ácidos grasos, epoxigenasa de ácidos grasos, diacilglicerol quinasa, colinafosfato transferasa citidil, colina quinasa, fosfolipasa, fosfatidilserina decarboxilasa, quinasa fosfatidilinositol, cetoacil-CoA sintasa, factor de transcripción CER, oleosina, 3-cetoacil-CoA tiolasa, acil-CoA dehidrogenasa, enoil-CoA hidratasa, acil-CoA oxidasa, y una señal de poliadenilación.
6. La planta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada porque se modifica también por la transformación genética para la resistencia a los insectos, herbicidas y hongos.
7. El uso de la planta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la producción de semillas para la fabricación de aceite de tabaco, aceite combustible, biodiesel, los suplementos dietéticos animales, combustibles sólidos, suplementos dietéticos humanos, lubricantes.

8. El uso de la planta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la producción de biomasa para la conversión bioquímica o para la conversión termoquímica a través de la combustión directa, carbonización, pirólisis, gasificación, digestión anaeróbica, digestión aeróbica, fermentación alcohólica o la procedimientos de explosión de vapor.

9. Un método para la producción de las plantas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende los siguientes pasos:

a) someter las semillas a mutagénesis producidas por los cruces iniciales entre los individuos de la misma especie pertenecientes al tipo silvestre o a las variedades seleccionadas;

b) permitir que dicho semillas germinen y la seleccionar las plantas de las generaciones M2-M4 de acuerdo con los siguientes parámetros:

i) la presencia de una o más características fenotípicas manifestadas de: altura de planta 80-120 cm, hojas con una lámina delgada y en posición vertical, inflorescencia compacta, cantidad de flores superior a 100, cantidad de cápsulas superior a 100, cantidad de semillas por cápsula superior a 5.000, lignificados y tallo robusto, raíces profundas;

ii) estabilidad del carácter seleccionado en las generaciones siguientes a M2;

iii) verificación de la hereditariadad del carácter seleccionado;

c) permitir germinar las semillas seleccionadas en el paso b), y la regeneración de las plantas a partir de la hoja de mesófilo callo inducida *in vitro* ante la presencia de fitohormonas y la selección de las plantas que mantienen los caracteres seleccionados en el paso b) en las generaciones R0-R2;

d) sembrar en ampo abierto las plantas seleccionadas en el paso c), y seleccionar también plantas que producen al menos 20 quintales de semilla por hectárea.

10. El método según la reivindicación 9 donde el paso a) se sustituye por el paso

a') produciendo semillas mutagenizadas mediante la realización de cruces interespecíficos dentro del género *Nicotiana*, seguido del cruce de los individuos F1 o por inducción de anfidiploide a través del tratamiento del ápice vegetativo de las plantas producido por dichos cruces con colchicina.

11. Método según las reivindicaciones 9 o 10 que comprende también los siguientes pasos:

e) la transformación de las plantas obtenidas en el paso d) con vectores que incluyen casetes de expresión que expresan los genes de la planta para resistencia a enfermedades de insectos, herbicidas y / o hongos y la selección de las plantas sí transformadas en las generaciones T0- T4 para resistencia a enfermedades de insectos, herbicidas y / o hongos y / o;

f) la transformación de las plantas obtenidas en el paso d) con uno o varios vectores que comprenden casetes de expresión que expresan en los genes de semillas del metabolismo de ácidos grasos seguido de la selección de plantas transformadas en las generaciones T0-T4 para características tales como el contenido total de aceite de las semillas y la composición de ácidos grasos de las mismas;

g) cruce de las plantas obtenidas en las etapas e) y / o f), y la selección de la progenie resultante para una o más de las características seleccionadas en el grupo: alta capacidad de producción de semillas en una cantidad superior a 40 quintales por hectárea, contenido de aceite de semillas mayor al 42 %, el título de yodo en el aceite obtenido de las semillas de

dicha progenie inferior a 120, composición de ácidos grasos del aceite contenido en dichas semillas variable con respecto a la planta de tipo silvestre, la resistencia a insectos, resistencia a los herbicidas, la resistencia a los hongos.

12. Las semillas de las plantas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

13. El uso de la semilla, según la reivindicación 12 para la fabricación de aceite de tabaco, aceite combustible, biodiesel, suplementos dietéticos animales, combustibles sólidos, suplementos dietéticos humanos.

14. Un método para la extracción de aceite de las semillas de tabaco en el que el rendimiento de aceite se encuentra entre el 70 y el 95% del aceite contenido en dichas semillas, que comprende los siguientes pasos:

a) la extracción de dicho aceite mecánicamente presionando con la prensa helicoidal y la obtención de aceite y una torta de aceite residual;

b) la filtración de dicho aceite extraído en el paso a) con filtros de papel o tela.

15. El método según la reivindicación 14 que también comprende el paso

c) la extracción química por el uso de solventes, del aceite residual contenido en la torta de aceite obtenida en el paso a).

16. El método según las reivindicaciones 14 o 15 en el que dicho aceite se extrae de semillas, según la reivindicación 12.

17. El método según las reivindicaciones 15 o 16 que comprende también las etapas

d) refinado del aceite obtenido en las etapas a) o b), y c).

18. Aceite de semilla de tabaco que se pueden obtener con el método de extracción de acuerdo con las reivindicaciones 15 o 16 caracterizado porque tiene un título de yodo inferior o igual a 120.

19. Biodiesel que comprende el aceite de semillas de tabaco, según la reivindicación 12, transesterificado con metanol.

20. Suplemento alimenticio para uso humano que se caracteriza porque comprende aceite de semillas de tabaco que se pueden obtener con el proceso, según la reivindicación 17.

21. Suplemento alimenticio para uso animal que comprende la torta obtenible en el paso a) de las reivindicaciones 14 o 16 cuando dependen de la reivindicación 14.

22. Combustible sólido, que comprende la torta obtenible en el paso a) de las reivindicaciones 14 o 16 cuando dependen de la reivindicación 14.

23. Lubricante industrial que comprende el aceite de semillas de tabaco obtenibles a partir de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16.

DIBUJOS

1/2



Fig. 1

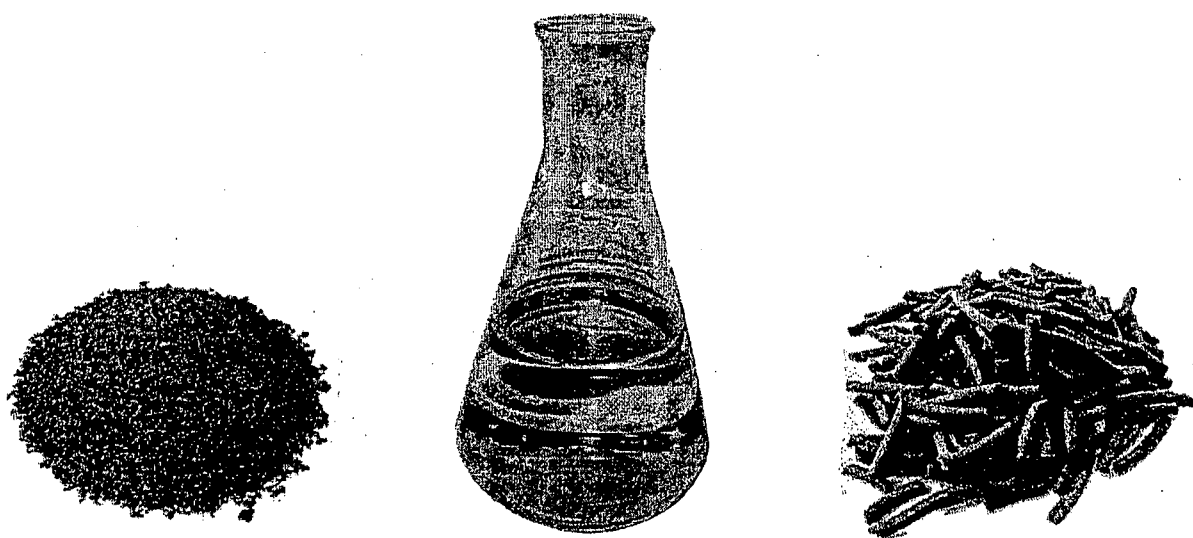


Fig.2

RESÚMEN EN INGLÉS

MUTAGENIZED TOBACCO PLANT AS SEED CULTURE FOR THE
PRODUCTION OF OIL FOR ENERGETIC, INDUSTRIAL AND ALIMENTARY
USES

ABSTRACT

5 The present invention relates to the development of tobacco plants, modified
through mutagenesis techniques, interspecific hybridisation followed by poliploidisation
and recombinant DNA technologies, characterised by the fact of being capable of
producing a very high amount of seeds and their use for the production of oil for
energetic and industrial scopes, such as combustion oil, biodiesel and lubricating oil, and
10 for animal and human alimentation.

RESÚMEN EN ESPAÑOL

PLANTA DE TABACO MUTAGENIZADA COMO CULTIVO DE SEMILLAS PARA
LA PRODUCCIÓN DE ACEITE PARA USOS ENERGÉTICOS, INDUSTRIALES Y
ALIMENTICIOS

RESUMEN

La presente invención se refiere al desarrollo de plantas de tabaco, modificadas mediante técnicas de mutagénesis, la hibridación interespecífica seguida de poliploidización y tecnologías del ADN recombinante, que se caracteriza por el hecho de ser capaz de producir una cantidad muy alta de semillas y su utilización para la producción de aceite para los ámbitos energético e industrial, tal como el aceite de combustión, biodiesel y aceite lubricante, y para la alimentación animal y humana.

BUSQUEDA INTERNACIONAL

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2007/053412

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/82 A01H1/06		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N A01H		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, WPI Data, SCISEARCH, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6 730 832 B1 (DOMINGUEZ LUIS MAYAN [US] ET AL) 4 May 2004 (2004-05-04) column 4, line 34 - column 5, line 40 column 11, line 61 - column 12, line 50	1-17
Y	KODYM ANDREA ET AL: "Physical and chemical mutagenesis." METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (CLIFTON, N.J.) 2003, vol. 236, 2003, pages 189-204, XP009097626 ISSN: 1064-3745 page 189, paragraph 1 - page 190, paragraph 3 ----- -/-	1-17
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 March 2008		Date of mailing of the international search report 04/04/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Burkhardt, Peter

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2007/053412

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MADOKA YUKA ET AL: "Chloroplast transformation with modified accD operon increases acetyl-CoA carboxylase and causes extension of leaf longevity and increase in seed yield in tobacco." PLANT AND CELL PHYSIOLOGY, vol. 43, no. 12, December 2002 (2002-12), pages 1518-1525, XP009097628 ISSN: 0032-0781 the whole document	1-17
X	USTA N: "Use of tobacco seed oil methyl ester in a turbocharged indirect injection diesel engine" BIOMASS AND BIOENERGY, PERGAMON, OXFORD, GB, vol. 28, no. 1, January 2005 (2005-01), pages 77-86, XP004630417 ISSN: 0961-9534 cited in the application page 79, column 1, paragraph 4 - page 80, column 1, paragraph 1 page 84, column 1, paragraph 3 - column 2, paragraph 2; tables 4,5	18,19
X	VELJKOVIC, V. B. (REPRINT) ET AL: "Biodiesel production from tobacco (Nicotiana tabacum L.) seed oil with a high content of free fatty acids" FUEL, (DEC 2006) VOL. 85, NO. 17-18, PP. 2671-2675. ISSN: 0016-2361. PB - ELSEVIER SCI LTD, THE BOULEVARD, LANGFORD LANE, KIDLINGTON, OXFORD OX5 1GB, OXON, ENGLAND., 26 May 2006 (2006-05-26), XP000558676 page 2672, column 1, paragraph 1 - column 2, paragraph 1; table 1	18,19
X	PATEL, J. A. ET AL: "Production potential and quality aspects of tobacco seed oil" TOBACCO RESEARCH, 24(1), 44-49 CODEN: TRESDX; ISSN: 0379-055X, 1998, XP001538094 cited in the application page 45, column 2, paragraph 1 - page 48, column 2, paragraph 1; tables	20-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2007/053412

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Rule 39.1(ii) PCT – Essentially biological process for the production of plants
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search reportcovers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference BW477R/RVP	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/IB2007/053412	International filing date (day/month/year) 27/08/2007	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 14/03/2007
Applicant PLANTECHNO S.R.L.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6b/s(a)).

c. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No III)

4. With regard to the title,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2007/053412

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/82 A01H1/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, WPI Data, SCISEARCH, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6 730 832 B1 (DOMINGUEZ LUIS MAYAN [US] ET AL) 4 May 2004 (2004-05-04) column 4, line 34 - column 5, line 40 column 11, line 61 - column 12, line 50	1-17
Y	KODYM ANDREA ET AL: "Physical and chemical mutagenesis." METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (CLIFTON, N.J.) 2003, vol. 236, 2003, pages 189-204, XP009097626 ISSN: 1064-3745 page 189, paragraph 1 - page 190, paragraph 3 ----- -/--	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 March 2008

Date of mailing of the international search report

04/04/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Burkhardt, Peter

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2007/053412

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MADOKA YUKA ET AL: "Chloroplast transformation with modified accD operon increases acetyl-CoA carboxylase and causes extension of leaf longevity and increase in seed yield in tobacco." PLANT AND CELL PHYSIOLOGY, vol. 43, no. 12, December 2002 (2002-12), pages 1518-1525, XP009097628 ISSN: 0032-0781 the whole document	1-17
X	USTA N: "Use of tobacco seed oil methyl ester in a turbocharged indirect injection diesel engine" BIOMASS AND BIOENERGY, PERGAMON, OXFORD, GB, vol. 28, no. 1, January 2005 (2005-01), pages 77-86, XP004630417 ISSN: 0961-9534 cited in the application page 79, column 1, paragraph 4 - page 80, column 1, paragraph 1 page 84, column 1, paragraph 3 - column 2, paragraph 2; tables 4,5	18,19
X	VELJKOVIC, V. B. (REPRINT) ET AL: "Biodiesel production from tobacco (Nicotiana tabacum L.) seed oil with a high content of free fatty acids" FUEL, (DEC 2006) VOL. 85, NO. 17-18, PP. 2671-2675. ISSN: 0016-2361. PB - ELSEVIER SCI LTD, THE BOULEVARD, LANGFORD LANE, KIDLINGTON, OXFORD OX5 1GB, OXON, ENGLAND., 26 May 2006 (2006-05-26), XP000558676 page 2672, column 1, paragraph 1 - column 2, paragraph 1; table 1	18,19
X	PATEL, J. A. ET AL: "Production potential and quality aspects of tobacco seed oil" TOBACCO RESEARCH , 24(1), 44-49 CODEN: TRESDX; ISSN: 0379-055X, 1998, XP001538094 cited in the application page 45, column 2, paragraph 1 - page 48, column 2, paragraph 1; tables	20-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2007/053412

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Rule 39.1(ii) PCT - Essentially biological process for the production of plants
Trattam con colchicina!
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search reportcovers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

OPINIÓN ESCRITA SOBRE LA BÚSQUEDA INTERNACIONAL

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**International application No.
PCT/IB2007/053412**Box No. I Basis of the opinion**

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed.
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☐ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/B2007/053412

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

- ☐ the entire international application
- ☒ claims Nos. 10

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 10 relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 10
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:
 - ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
 - ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
 - ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b).
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☒ See Supplemental Box for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**International application No.
PCT/IB2007/053412

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1 - 17</u>
	No: Claims	<u>18 - 23</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1 - 23</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1 - 23</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/IB2007/053412

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. Present claim 10 is directed to a method for the production of plants comprising the following steps:
 - a) producing mutagenised seeds by carrying out interspecific crossings in the *Nicotiana* genus, followed by backcrossing of the F1 individuals
 - b) allowing said seeds to germinate and selecting the plants of the M2-M4 generations according to the following parameters:
[...]
 - c) allowing to germinate the seeds selected at step b) and regenerating the plants starting from the leaf mesophyll callus induced *in vitro* at the presence of phytohormones and selecting the plants maintaining the characters selected at step b) in the RO-R2 generations;
 - d) seeding in open field the plants selected at step c) and further selecting plants producing at least 20 quintals of seed per hectare.
2. Present claim 10 thus consists entirely of essential biological processes for the production of plants. The ISA is thus neither required to search claim 10 (Rule 39 PCT) nor to provide a written opinion on said claim (Rule 67 PCT).

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Article 33(2)(3) PCT (Novelty and inventive step)

1.1 The following documents (D) are referred to; the numbering is following the order of the International Search Report:

- D1 US 6,730,832 (Dominguez *et al.*)
D2 Kodym and Afza, 2003. Meth. Mol. Biol. 236:189-204

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/IB2007/053412

- D3 Madoka *et al.*, 2002. Plant Cell Physiol. 43:1518-1525
D4 Usta, 2005. Biomass Bioenergy 28:77-86
D5 Veljkovic *et al.*, 2006. Fuel 85:2671-2575
D6 Patel *et al.*, 1998. Tob. Res. 24:44-49

1.2 Present claim 19 is directed to tobacco seed oil. Documents D4 - D6 disclose oil from tobacco seeds. Documents D4 and D5 also disclose biodiesel comprising tobacco seed oil transesterified with methanol. Documents D4 - D6 thus anticipate the subject-matter of present claim 18. The same holds true for dependent claim 19.

1.3 Present claims 20 - 23 are directed to food and feed supplements and fuels and industrial lubricants comprising tobacco seed oil. Document D6 discloses the use of tobacco seed oil as food and feed supplement and its use as industrial additive. D6 thus anticipates the subject-matter of present claims 20 - 23.

1.4 Present claim 14 is directed to a method for the extraction of oil from tobacco seeds comprising mechanically extracting said oil by pressing with a helical press and obtaining oil and a residual oilcake and filtering said oil with paper or cloth filters.

1.5 The use of helical presses for extracting seed oil is state of the art for all kind of oil seeds. It is also used for very small seeds like poppy. A man skilled in the art would simply apply these methods to tobacco seeds and arrive at the method of claim 14 without any inventive effort. Claim 14 does not meet the requirements of Article 33(3) PCT. The same holds true for dependent claims 15 - 17.

1.6 Present claim 9 is directed to a method for the production of plants by mutagenising tobacco seeds and selecting the germinated plants for a desired property, i.e. producing at least 20 quintals of seed per hectare.

1.7 Mutational breeding is a standard instrument of modern plant breeders (e.g. D2 page 189, last paragraph). Treatment of seeds with mutagenising agents or irradiation is common practice to develop new traits. EMS mutagenesis of tobacco seeds to develop desired phenotypes was frequently used in the prior art (e.g. D1, column 4, line 34 - column 5, line 40 and column 11, line 61 - column 12, line 50).

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/IB2007/053412

1.8 It does therefore not involve an inventive concept to apply this method to tobacco seeds in order to obtain plants that yield at least 20 quintals of seeds per hectare. Claim 9 does not meet the requirements of Article 33(3) PCT. The same holds true for dependent claims 10 - 13.

1.9 A similar objection applies to the products of said method. The tobacco plants of claim 1 are not considered to involve an inventive step. Claim 1 does not meet the requirements of Article 33(3) PCT. The same holds true for dependent claims 2 - 8.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

1. Present claim 1 does not meet the requirements of Article 6 PCT in that the matter for which protection is sought is not defined. The claim attempts to define the subject-matter in terms of the result to be achieved "A mutagenised tobacco plant *characterised in that it produces a seed quantity of at least 20 quintals per hectare*".
2. Such a definition is only allowable under the conditions elaborated in the PCT Guidelines C-5, 5.35. In this instance, however, such a formulation is not allowable because it appears possible to define the subject-matter in more concrete terms, viz. in terms of how the effect is to be achieved. Moreover an undue burden is placed on others when trying to reduce the claimed invention to practice (Article 5 PCT).
3. The application as filed does not provide credible evidence that the subject-matter of claim 1 could be obtained without undue experimentation. The prior art (e.g. D4, paragraph bridging pages 80 and 81) reports seed yields between 600 and 1200 kg per hectare. The application does not provide any evidence that methods of the invention could produce plants that yield more than 2000 kg seeds per hectare (Article 5 PCT).
4. The unit "quintal" employed throughout the claims and in the description is not additionally expressed in terms of the units stipulated by Rule 10.1(a) PCT.

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/IB2007/053412

5. The scope of claim 18 insofar directed to an "*iodine tite* lower or equal to 120" is considered totally unclear (Article 6 PCT). Moreover, an undue burden is placed on others trying to establish the scope of protection (Article 5 PCT).
6. The technical term "iodine tite" employed in claim 18 is not generally accepted in the art, contrary to the requirements of Rule 10.1(e) PCT.

**REQUISITOS MÍNIMOS PARA ADMISIÓN A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de 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 ☒

COMPLETA ☒

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de 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 ☐

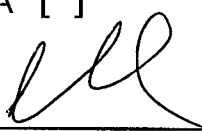
INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐


Firma Responsable

Fecha_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-111673- -00000-0000

Fecha: 2009-10-08 15:25:05
Tra. 11 PATENTE/II
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 NUECREACIONE
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 92

Irrera 13 No. 27-00 Piso 5,7y10'

Conmutador: 3 82 0840

Fax: 3505220

E-mail: info@sic.gov.co

www.sic.gov.co

Bogotá D.C. - Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
URIBE RESTREPO JUAN CARLOS

REFERENCIA	Radicación No.	9 111673
	Solicitud internacional	PCT/IB2007/053412
	Fecha inicio fase nacional	14/10/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	11604

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

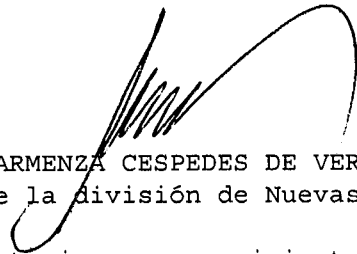
En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 9 111673



ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 16 OCT. 2009
adpall