



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 176 117**

② Número de solicitud: 200100590

⑤ Int. Cl.⁷: C12N 15/82

C12N 15/29

C12N 15/52

C07K 14/415

B09C 1/10

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **14.03.2001**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2002**

Fecha de concesión: **16.01.2004**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.02.2004**

⑮ Fecha de publicación del folleto de patente:
16.02.2004

⑰ Titular/es: **Consejo Superior de
Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad de Sevilla**

⑱ Inventor/es: **Domínguez Solís, José Ramón;
Gotor Martínez, Cecilia y
Romero González, Luis Carlos**

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Planta resistente a medios con metales pesados.**

㉒ Resumen:

Planta resistente a medios con metales pesados.
La presente invención se refiere a una planta con una elevada capacidad de acumular metales pesados en su parte aérea y su empleo en la recuperación de medios contaminados con metales pesados. Las plantas han sido modificadas genéticamente para ser resistentes a medios contaminados por metales pesados y para en esos medios contaminados tener la capacidad de absorber los metales pesados, acumulándolos en sus hojas, para recuperar el medio contaminado. La modificación genética se ha basado en la identificación de genes de plantas implicados en los procesos de detoxificación de metales pesados y la sobreexpresión de los mismos dando lugar a plantas transformadas susceptibles de ser utilizadas en procesos de fitorremediación.

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

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

ES 2 176 117 B1

DESCRIPCION

Planta resistente a medios con metales pesados.

Campo de la invención

El campo de la presente invención se encuentra dentro del área de la biología molecular de plantas, y en particular en la implicación de genes de plantas en los procesos de detoxificación de metales pesados, el uso de plantas transformadas sobre-expresando estos genes y métodos de fitorremediación para la recuperación de medios contaminados con distintos metales pesados haciendo uso de estas plantas transformadas.

Objeto de la invención

El objeto de la presente invención es una planta con una elevada capacidad de acumular metales pesados en su parte aérea y su empleo en la recuperación de medios contaminados con metales pesados.

Las plantas han sido modificadas genéticamente para ser resistentes a medios contaminados por metales pesados y para en esos medios contaminados tener la capacidad de absorber los metales pesados, acumulándolos en sus hojas, para recuperar el medio contaminado.

Estado de la técnica

La contaminación de la biosfera con metales pesados, se ha acelerado drásticamente desde el comienzo de la revolución industrial. Las principales fuentes de esta contaminación son la combustión de fósiles, fertilizantes, pesticidas etc. Esto ha llevado a que uno de los problemas medioambientales y de salud más significativos en los últimos años es la contaminación de suelos y aguas por residuos industriales y en particular por residuos de metales pesados (Salt *et al* 1995).

Considerando el bajo coste efectivo, el uso de plantas para la descontaminación de residuos orgánicos e inorgánicos ha impulsado el estudio de técnicas de fitorremediación (Raskin 1996; Salt *et al*, 1998). Aunque la idea de usar las plantas para la biorremediación es antigua, en la actualidad presenta importantes ventajas en la protección medioambiental.

La técnica de fitorremediación cubre diferentes aspectos del uso de las plantas como agente descontaminante como por ejemplo el uso de plantas para la degradación de compuestos orgánicos en asociación con microorganismos (fitodegradación); la absorción de contaminantes a través de las raíces (rizofiltración) y la reducción de la biodisponibilidad de los contaminantes en el medio (fitoestabilización). Sin embargo de todas las áreas que presenta esta técnica, es quizás la fitoextracción, la más extendida e importante. La fitoextracción está enfocada al uso de plantas para acumular y concentrar los contaminantes en sus partes aéreas y a la posterior eliminación de los metales pesados o agentes orgánicos tóxicos del suelo mediante la cosecha de esas plantas.

En España, casos como la rotura de la balsa de las Minas de Aznalcóllar han planteado la necesidad de disponer de metodologías baratas para la eliminación de una batería amplia de elementos inorgánicos altamente tóxicos. También, una extensa contaminación en aguas subterráneas por compuestos de arsénico, considerado como uno

de los elementos más tóxicos, ha recibido mucha atención en Bangladesh y otros lugares (Kaiser, 1998; Dhar *et al*, 1997).

Por consiguiente, utilizar un agente biológico, como sugiere la fitorremediación con el uso de plantas, ya sean naturales o modificadas genéticamente, tolerantes a uno o varios metales pesados y que son capaces de acumular esos metales en sus partes aéreas, parece ser la técnica más prometedora para la recuperación de suelos contaminados por varios metales pesados.

Una de las opciones para esta recuperación se presenta con el uso de plantas hiperacumuladoras, plantas que se encuentran en la naturaleza y que son capaces de crecer en suelos con alto contenido en metales pesados (Baker *et al* 1989). Sin embargo, estas especies naturales como ocurre con los microorganismos y las algas, presentan serias limitaciones para la recuperación de suelos contaminados con metales pesados. Ejemplos de estas limitaciones en las plantas hiperacumuladoras son que tienen una baja biomasa, crecen muy lentamente y que no existen especies adecuadas para acumular los elementos contaminantes más importantes (plomo, cadmio, arsénico, uranio, etc.).

La solución proporcionada por esta Invención al problema de la contaminación por metales pesados en suelos, se basa en los mecanismos desarrollados por los organismos, y en particular por las plantas, con el objeto de reducir la toxicidad de metales pesados y metaloides en la célula, gracias a la capacidad de reducir la concentración efectiva del mismo mediante la formación de complejos con ligandos orgánicos

Esto es posible porque casi todos los metales pesados, como ocurre por ejemplo con el cadmio, mercurio y plomo, o metaloides como el arseniato, tienen una propiedad común: son altamente reactivos con grupos sulfhidrilos (-SH) de moléculas orgánicas. En las plantas, se han identificado dos tipos de péptidos capaces de quelar metales pesados y ambos, son péptidos ricos en cisteína: metalotioneínas y fitoquelatinas.

Las metalotioneínas (MTs) son proteínas de bajo peso molecular, ricas en cisteína, capaces de enlazar metales pesados y se encuentran presentes en una gran variedad de organismos, incluyendo hongos, invertebrados, insectos, plantas y mamíferos (Riordan y Vallee, 1991). Las MTs de plantas tienen una gran afinidad por Cu y se inducen fuertemente por la presencia de este metal. Genes codificando MTs han sido aislados de una gran variedad de plantas y la expresión del gen MT2 en *Arabidopsis* ha sido correlacionada con tolerancia a cobre (Murphy y Taiz, 1995).

Las fitoquelatinas (PCs) son también péptidos ricos en cisteína que no están codificados genéticamente y se sintetizan enzimáticamente a partir de moléculas de glutatión (Steffens, 1990). Su síntesis se inicia o induce por la presencia de metales pesados, como el cadmio, con el concurso de la enzima PC sintasa que utiliza glutatión (GSH) como sustrato para formar el péptido $[\gamma\text{-Glu-Cys}]_{n=2-11}\text{-Gly}$. El aislamiento en *Arabidopsis* del mutante *cad1*, deficiente en PC sintasa, claramente demuestra la importancia de las fitoquelatinas en la tolerancia al metal (Zenk, 1996). Tanto MTs como PCs forman complejos con el

metal a través del grupo -SH de la cisteína. Otros elementos, como sulfuro inorgánico, también forman parte del complejo metal-PC, originando un complejo temario más estable.

El GSH es una molécula esencial para la célula, cuya ruta de biosíntesis está finamente regulada en las plantas (Noctor *et al*, 1998). Esta molécula se sintetiza mediante la acción sucesiva de dos enzimas: la γ -glutamilcisteinil sintetasa (γ -ECS) y la glutatión sintetasa (GS). De igual manera, el precursor cisteína también se sintetiza mediante un complejo bienzimático compuesto por las enzimas O-acetilserina(tiol)liasa (OASTL) y serina acetiltransferasa (SAT) (Barroso *et al*, 1997).

La inducción de los agentes quelantes, MTs y PCs, por la presencia de metales pesados, dispara la biosíntesis de sus moléculas precursoras. Por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana*, la presencia de Cd induce la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de cisteína y glutatión, moléculas precursoras donadoras de azufre reducido en la planta (Barroso *et al*, 1999; Xiang y Oliver, 1998). La acción concertada en la expresión de estos genes es necesaria para generar las moléculas tiólicas esenciales para la biosíntesis de MTs y PCs.

Existen en las plantas otros tipos de genes, que en casos particulares también pueden participar en procesos de biorremediación: un ejemplo es el gen que codifica liasas organometálicas, descrito en la patente americana US 5.965.796, que involucradas en procesos de reducción enzimática de iones metálicos, puede mediar en la remediación de compuestos organometálicos, como el metilmercurio, de suelos contaminados.

Explicación de la invención

Constituye un objeto de la presente invención una planta resistente a medios con metales pesados, en la que se ha introducido por manipulación genética la sobre-expresión de un gen que aumenta la capacidad de la planta para sintetizar la enzima O-acetilserina(tiol)liasa (OASTL) que cataliza la reacción de síntesis de la cisteína. En dicha planta se ha incrementado hasta 4 veces la actividad OASTL para la síntesis de cisteína y por extensión la capacidad de síntesis de péptidos ricos en cisteína. En particular, las moléculas y péptidos cuya síntesis se ha incrementado son la cisteína, el glutatión, las fitoquelatinas y las metalotioneínas.

Los metales pesados y metaloides que la planta acumula en sus tejidos se seleccionan entre Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Pd, Pt, Te, Tl, Sb, Se, Sn y Zn, sus especies iónicas correspondientes y sus mezclas, particularmente entre As, Cd, Cu, Hg, Ni, y Zn, sus especies tónicas correspondientes y sus mezclas y más particularmente entre As, Cd y Hg, sus especies iónicas correspondiente y sus mezclas.

La planta acumula los metales pesados preferentemente en sus partes aéreas, tallos y hojas, acumulando hasta un 72 % más de metales que las correspondientes plantas silvestres. Las semillas de dichas plantas son capaces de germinar en medios que contienen concentraciones tóxicas de metales pesados para las semillas de las correspondientes plantas silvestres (250 μ M de Cd, 1.3

mM de Zn, 30 μ M de Hg, 100 μ M de Cu, 250 μ M de Ni, 180 μ M de As(V), 40 μ M de As(III)). Se trata de una planta diploide, en particular perteneciente a la familia de las *Brassicaceae* o *Cruciferae*.

En el caso concreto de una planta del género *Arabidopsis*, en particular *Arabidopsis thaliana*, ecotipo columbia, el gen sobreexpresado para aumentar la resistencia y acumulación de metales pesados y metaloides, que se ha introducido por manipulación genética, es el gen *Atcys-3A*, el cual se encuentra bajo el control de una secuencia regulatoria transcripcional funcional en planta, particularmente bajo control del promotor 35 S del virus del mosaico de la coliflor.

Constituye otro objeto de la presente invención un procedimiento para obtener plantas resistentes a medios con metales pesados y acumuladoras de dichos metales pesados, que comprende los siguientes pasos:

- a- Construcción de un plásmido que contenga el gen *Atcys-3A*
- b- Introducción de dicho plásmido en la planta a modificar
- c- Identificación de las plantas modificadas mediante selección con antibiótico
- d- Sobre-expresión del gen controlada por una secuencia regulatoria transcripcional funcional en planta.

Constituye asimismo otro objeto de la presente invención un método para recuperar un suelo contaminado por metales pesados y metaloides mediante las plantas objeto de la invención que comprende las siguientes etapas:

- a) plantar entre 250.000 y 2.500-000 plantas por hectárea de suelo contaminado.
- b) cultivar las plantas durante un periodo comprendido entre 15 y 40 días.
- c) recolectar las partes aéreas, tallos y hojas de dichas plantas en las cuales se han acumulado los metales pesados y metaloides.

Descripción de las figuras

En la figura 1A se muestran las características más importantes del plásmido que fue utilizado para la transformación de las plantas de *Arabidopsis thaliana*. Para dicho proceso, se realizó una construcción, denominada pBIOAS, donde un fragmento de 1332 pb correspondiente al cDNA *Atcys-3A*, conteniendo la región codificante del gen, fue insertado en orientación sentido en el plásmido pBI121 bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y del terminador de la nopalina sintasa (NOS-ter). El plásmido también presenta un gen de resistencia al antibiótico kanamicina, que servirá para la posterior identificación de las plantas que han sido modificadas genéticamente.

La figura 1B muestra el caso particular de la identificación de una de las plantas transformadas, por medio de su resistencia al antibiótico kanamicina, pudiendo observarse con claridad que sólo aquellas plantas que hayan incorporado el plásmido dentro del genoma, son resistentes a kanamicina. La fotografía mostrada fue realizada

con un microscopio estéreo Olympus SZ4045TR, 14 días después de sembrar las semillas obtenidas de las plantas transformadas, en un medio sólido MS (Murashige and Skoog, 1962) con una concentración de 50 μ /ml de kanamicina.

La figura 2 muestra el experimento realizado para calcular la concentración tóxica para la germinación de semillas silvestres de *Arabidopsis thaliana* a distintos metales pesados, mostrando el caso particular, del cálculo de la concentración tóxica de arsenito a semillas silvestres de *Arabidopsis thaliana*. En la figura 2A se muestran fotografías, obtenidas con un microscopio estéreo Olympus SZ4045TR, de semillas silvestres de *Arabidopsis thaliana* que después de ser esterilizadas, fueron sembradas en medio sólido de MS, con concentraciones crecientes de arsenito. El compuesto añadido al medio sólido fue NaAsO₂. Las fotografías fueron tomadas, 14 días después de sembrar las semillas.

En la figura 2B se muestra una tabla con los resultados obtenidos en la cuantificación de germinación de las semillas silvestres a las concentraciones de NaAsO₂. La tolerancia, calculada como el porcentaje de supervivencia, ha sido obtenida como el resultado del cociente del número de semillas silvestres que han sido capaces de germinar, entre el número total de semillas sembradas.

La figura 3 representa los experimentos realizados, en un caso particular con el metal pesado cadmio, para averiguar la tolerancia de las semillas transformadas de la línea 10, a las concentraciones tóxicas de los distintos metales, obtenidas en los experimentos anteriores. En la figura 3A se muestran fotografías, una vez transcurridos 14 días de sembrar las semillas transformadas, de la línea 10 en un medio sólido MS que tenía una concentración de 250 μ M de CdCl₂ y la comparación con las semillas silvestres y controles de transformación en las mismas condiciones.

En la figura 3B se muestra el resultado de la tolerancia, de la línea 10 a la concentración tóxica de 30 μ M de HgCl₂, tanto en las semillas silvestres como en las transformadas, calculada como el cociente del número de semillas que son capaces de adaptarse a esa concentración tóxica de mercurio por el número total de semillas sembradas.

La figura 4 muestra el resultado del cálculo de la cantidad de metales pesados que se acumulan en las hojas de las plantas, tanto silvestres como transformadas, cuando se ponían en contacto con medios que contenían los distintos metales pesados a sus correspondientes concentraciones tóxicas, demostrándose aquí, que las plantas transformadas, además de ser resistentes a los metales pesados, son capaces de acumularlos al crecer en esos medios contaminados. La figura 4A muestra los valores absolutos de acumulación mientras que la figura 4B refleja el porcentaje de incremento de acumulación de las hojas de la línea transformada 10 con respecto a las hojas de las silvestres. Todas las medidas se realizaron mediante espectroscopia de emisión atómica.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona una planta modificada genéticamente con capacidad de absorber metales pesados, caracterizada porque es una planta adaptada y resistente a una batería de me-

tales pesados y que es capaz de acumular cantidades superiores que las plantas silvestres en las mismas condiciones.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "planta modificada genéticamente, resistente y acumuladora de metales pesados" se refiere a que la planta ha sido transformada con la finalidad de aumentar su capacidad para adaptarse a suelos contaminados en los cuales las plantas silvestres se ven muy afectadas, y que estas plantas modificadas sean capaces de absorber los metales pesados existentes en el medio contaminado, acumulándolos preferentemente en sus partes aéreas, tallos y hojas, en mayor cantidad que las plantas silvestres.

Las características tanto de tolerancia como de acumulación mostradas por las plantas transformadas, son debidas principalmente al aumento de su capacidad para sintetizar moléculas ricas en cisteína, que se encuentran involucradas en el proceso de detoxificación de las plantas a metales pesados, gracias a la modificación genética realizada en las plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana*, sobre-expresando el gen que codifica para la isoforma citosólica de la enzima O-acetilserina(tiol)liasa.

Gracias a esta modificación genética, por la que el metal pesado no afecta al crecimiento de la planta, y gracias a que la acumulación de los distintos metales pesados se produce en las partes aéreas, en mayor cantidad que las silvestres, estas plantas transformadas se convierten en unas herramientas muy útiles para su utilización en la recuperación de suelos contaminados mediante la recogida de estas plantas tolerantes y acumuladores.

En una realización particular, la planta de la invención procede de una estirpe silvestre de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo columbia, planta típicamente diploide de la familia *Brassicaceae*. Este tipo de planta fue utilizado en la invención debido principalmente a su rápido tiempo de generación, de 5 a 6 semanas bajo condiciones normales de crecimiento (Meyerovich, 1994) cualidad muy importante debido a la reducción de tiempo que se tiene que emplear para la recuperación del suelo contaminado.

El término "metales pesados" tal como se utiliza en esta descripción incluye una serie de metales y metaloides de la Tabla Periódica con propiedades metálicas y potencialmente tóxicos. En un caso particular, dentro de todos los metales pesados de carácter tóxico, se encuentran As, Cd, Cu, Hg, Ni y Zn en cualquier forma química que puedan estar presentes en un medio sólido.

El principal responsable de la tolerancia y acumulación de estos metales pesados son las fitoquelatinas, que debe de unir al menos un metal pesado, incluyendo, pero no limitando los metales nombrados anteriormente. La capacidad de estas secuencias peptídicas en unirse a metales pesados está muy extendida, como ocurre en casos particulares con el Ni (Krämer *et al*, 1996), Zn (Shen *et al*, 1997), As, que se encuentra en las plantas en forma de arsenito y arseniato (Grill, 1987; Maltani, 1996) y sobre todo el metal pesado Cd (Zenk, 1996) que está considerado como uno de los metales en los que la fitorremediación es parti-

cularmente favorable, a causa de que es fácilmente transportado y acumulado en las hojas de muchas especies de plantas (Wagner, 1993).

Para el proceso de modificación genética de las plantas con el fin de aumentar la tolerancia a medios contaminados por metales pesados y también la acumulación de dichos metales pesados mediante su absorción de los medios contaminados, se realizó una construcción, denominada pBIOAS, donde un fragmento de 1332 pb correspondiente al cDNA *Atcys-3A*, conteniendo la región codificante del gen, fue insertado en orientación sentido en el plásmido pBI121 bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y del terminador de la nopalina sintasa (NOS-ter) (Fig. 1). El plásmido también presenta un gen de resistencia al antibiótico kanamicina, que servirá para la posterior identificación de las plantas que han sido modificadas genéticamente. La sobreexpresión del gen *Atcys-3A* se obtiene por los altos niveles de transcripción que produce el promotor 35S del CaMV de forma constitutiva en todos los tejidos de la planta.

En el proceso de transformación se utilizaron plantas que habían estado creciendo durante tres semanas en cámaras de crecimiento con fotoperiodo largo (16 horas luz y 8 de oscuridad) y a unas temperaturas de 20°C y 18°C respectivamente. Estas plantas habían sido sembradas en tierra y regadas con agua. Una vez transcurridas esas tres semanas, las plantas de *Arabidopsis thaliana* fueron transformadas mediante infiltración a vacío con una solución de *Agrobacterium CV50* que llevaba el plásmido pBIOAS. Después del proceso de transformación, las plantas eran devueltas a las cámaras de crecimiento en las mismas condiciones, hasta que se secaban y daban semillas, algunas de las cuales estaban transformadas.

El proceso de selección de las semillas transformadas se realizó gracias al gen de resistencia al antibiótico kanamicina que tenía el plásmido construido pBIOAS, consistiendo este proceso, en plaquear las semillas obtenidas de las diferentes plantas que habían sido transformadas, en un medio sólido MS, que contenía una concentración de 50 µ/ml del antibiótico kanamicina. Mediante este proceso, se obtuvieron 10 líneas independientes de plantas transformadas.

Como control de que el método utilizado para la modificación genética no producía ningún cambio en el comportamiento normal de las plantas, procesos de transformación equivalentes fueron llevados a cabo con los mismos tipos de plantas, *Arabidopsis thaliana*, y en las mismas condiciones, usando el plásmido original pBI121 sin ninguna modificación. Una vez que estas plantas dieron de nuevo semillas y por el método de selección de estas semillas con el uso de la kanamicina, se obtuvieron 4 líneas independientes de estos controles de transformación que fueron usados, además de las plantas silvestres, como controles en los distintos experimentos que se llevaron a cabo con las plantas transformadas con el plásmido pBIOAS.

Una vez conseguidas líneas homocigotas, se empezó el estudio de caracterización de las plantas modificadas genéticamente. Análisis mediante Southern y Northern blot han mostrado la presencia de distintas copias del gen *Atcys-3A*

dentro del genoma de la planta y también unos niveles de transcrito superiores al de las plantas transformadas controles en algunas de las líneas. Los estudios de la cantidad de proteína, mediante análisis de Western blot, y de la actividad en estas plantas mostraron unos niveles de actividad OASTL con una elevada similitud con respecto a los niveles de transcrito obtenidos mediante Northern.

En las plantas transformadas se midió un incremento de hasta 4 veces la actividad OASTL para la síntesis de cisteína. Una concentración elevada de cisteína favorece la síntesis de péptidos ricos en este aminoácido (glutatión, fitoquelatinas y metalotioneínas).

También se midieron, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y utilizando un detector de fluorescencia, los niveles de cisteína y glutatión intracelular en hojas de las distintas líneas de las plantas transformadas en condiciones normales de crecimiento, es decir sin presencia de uno o varios metales pesados, no obteniéndose diferencias significativas con respecto a las plantas controles.

A continuación y con objeto de dilucidar la capacidad de tolerancia, de las plantas de *Arabidopsis thaliana* que han sido modificadas genéticamente, a medios contaminados con uno o varios metales pesados, calculamos en primer lugar cuál es la concentración mínima de cada uno de los metales a la cual las semillas de *Arabidopsis thaliana* sin modificar, eran incapaces de germinar. Para ello, semillas silvestres de *Arabidopsis thaliana* fueron esterilizadas siguiendo el protocolo del ejemplo 1.

Una vez esterilizadas, las semillas fueron plaqueadas en un medio sólido MS conteniendo concentraciones crecientes de cada uno de los metales del estudio. Cd, As (en sus dos estados de oxidación arsenito y arseniato), Cu, Hg, Ni y Zn. Las placas obtenidas se dejaron durante 24 horas a 4°C para inducir la germinación. Transcurridas 24 horas se trasladaron a la cámara de crecimiento. El programa de la cámara, se muestra en el ejemplo 1.

Las semillas se dejaron en la cámara de crecimiento durante 14 días en contacto con el medio sólido que tenía las distintas concentraciones de los metales.

Las cantidades tóxicas de cada uno de los metales para las semillas silvestres obtenidas fueron las siguientes:

Metal Pesado	Concentración Tóxica
Cd (II)	250 µM
Zn (II)	1.3 µM
Hg (II)	30 µM
Cu (II)	100 µM
Ni (II)	250 µM
As (V)	180 µM
As (III)	40 µM

Como caso particular de este experimento, se estudió la variación de la tolerancia de las semillas de *Arabidopsis thaliana* no modificadas genéticamente a concentraciones crecientes del

metaloide arsenito (Fig. 2). El compuesto usado para el ejemplo fue NaAsO_2 .

Una vez obtenidas las concentraciones tóxicas para las plántulas de *Arabidopsis thaliana* silvestres, se comprobó si las plantas transformadas sobreexpresando el gen *Atcys-3A*, eran resistentes a los distintos metales a las correspondientes concentraciones tóxicas, que fueron obtenidas con anterioridad.

Semillas de plantas silvestres y de las líneas transformadas fueron sembradas, después de esterilizarlas siguiendo el modelo anterior, en placas con medio sólido de MS conteniendo en cada caso la concentración tóxica de cada uno de los metales pesados de este estudio: cadmio, arsenito, arseniato, mercurio, zinc, cobre y níquel.

Después de 14 días en la cámara de crecimiento en las mismas condiciones que en el experimento del cálculo de la concentración tóxica de semillas de *Arabidopsis thaliana* sin transformar, se observó que tanto las semillas silvestres como las modificadas genéticamente conteniendo el plásmido pBI121, control del proceso de transformación, casi ninguna era capaz de germinar en el medio y las pocas que lo hacían, no desarrollaban el primer par de hojas y morían a los 5-7 días tras ser embebidas. Por otro lado, todas las líneas sobre-expresando el gen *Atcys-3A* eran capaces de germinar y crecer en los distintos medios de cultivo. Como caso particular se muestra en el ejemplo 2 el resultado obtenido con las semillas transformadas de la línea 10, que fue de todas las líneas de plantas transformadas de *Arabidopsis thaliana* la que mostró una mejor adaptación al tratamiento con los distintos metales pesados.

Una vez que se ha demostrado que las plantas modificadas genéticamente sobre-expresando el gen *Atcys-3A* son tolerantes a medios contaminados con distintos metales pesados, se analiza en las distintas líneas transformadas si se produce una acumulación de los distintos metales pesados en las partes aéreas, tallos y hojas, de la planta, cuando se ponen en contacto con los medios contaminados que contienen los distintos metales.

Para este estudio, se utilizan plantas, tanto silvestres como modificadas genéticamente, de *Arabidopsis thaliana*, crecidas en condiciones óptimas de crecimiento durante tres semanas. Pasado este tiempo, las plantas son irrigadas con medio líquido contaminado de metal a las concentraciones tóxicas, menos para el arsenito donde la concentración usada fue de $100 \mu\text{M}$.

Después de los 14 días de tratamiento con los distintos metales pesados, se procedió al cálculo de la cantidad de metal acumulada en cada caso. Las muestras fueron analizadas mediante espectroscopia de emisión atómica (ICP-AES) usando un secuenciador multi-elemento Fisons-ARL 3410.

Los resultados obtenidos en la medición del contenido de los distintos metales revelaron que todas las plantas de *Arabidopsis thaliana* que habían sido modificadas genéticamente acumulaban mayor cantidad de metal en sus hojas que las plantas silvestres en todos los casos analizados (72% más de Cd, 31% de As(V), 32% de As(III), y 11% de Hg).

Como caso particular, se muestra en el ejem-

plo 3, el procedimiento y los resultados obtenidos cuando el experimento se realizó con la línea 10 en el caso particular en el que dicha planta había estado en contacto con un medio contaminado con distintos metales pesados como Cd, As (en sus dos estados de oxidación arsenito y arseniato) y Hg. Estos metales son mostrados con mayor profundidad debido a que son los metales pesados, de los utilizados, más tóxicos y con los que más problemas existen.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados en sentido limitativo del alcance de la misma.

Ejemplo 1

Cálculo de las concentraciones tóxicas de arsenito a plantas silvestres de Arabidopsis thaliana

Como ejemplo particular del cálculo de las concentraciones tóxicas de metales pesados a plantas silvestres, se muestra el experimento que se realizó para determinar cual era la concentración mínima de arsenito que impedía la germinación de semillas silvestres de *Arabidopsis thaliana*.

Para ello, semillas silvestres de *Arabidopsis thaliana* fueron esterilizadas siguiendo el siguiente protocolo:

- 1.- Etanol 96 % durante 1-2 minutos.
- 2.- Lejía 30 % durante 5 minutos.
- 3.- Lavado de las semillas con agua estéril. 5-6 veces.

Una vez esterilizadas, las semillas son plaqueadas en un medio sólido MS conteniendo concentraciones crecientes de arsenito, exactamente 10, 20, 30 y $40 \mu\text{M}$ de NaAsO_2 . Las placas obtenidas se dejan durante 24 horas a 4°C para inducir la germinación de las semillas.

Una vez transcurridas 24 horas a 4°C , los medios sólidos con las semillas silvestres se introducen en cámaras de crecimiento. El programa de crecimiento programado en las cámaras fueron las siguientes:

Fotoperiodo: 16 horas luz/8h oscuridad
 Temperaturas: 20°C en el periodo de luz y 18°C en el periodo de oscuridad.
 Humedad: 70 %

Las semillas se dejan en la cámara de crecimiento en esas condiciones durante 14 días.

En la figura 2 se observa la variación en la tolerancia de las semillas de *Arabidopsis thaliana* no modificadas genéticamente a concentraciones crecientes del metaloide arsenito. Las fotos mostradas, fueron realizadas con un microscopio estéreo Olympus SZ4045TR.

Ejemplo 2

Estudios de tolerancia de las plantas transformadas a concentraciones tóxicas de cadmio y mercurio

En este ejemplo se muestra el estudio de tolerancia de las semillas de la línea 10, a concentraciones tóxicas del metal cadmio.

El experimento consistía en poner en contacto, semillas esterilizadas de la línea transformada número 10, con las concentraciones de este metal que inhibía la germinación de las semillas silvestres de *Arabidopsis thaliana*.

Semillas de plantas silvestres y de la línea transformada 10 fueron sembradas en placas con medio sólido MS, conteniendo la concentración

tóxica del metal pesado de este estudio.

La figura 3 muestra el resultado del experimento después de 14 días en la cámara de crecimiento en las mismas condiciones que en el experimento del ejemplo 1. Se puede observar en la figura 3A que tanto las semillas silvestres y las que procedían de los controles de transformación no eran prácticamente capaces de germinar en un medio sólido que contenía una concentración de 250 μM de CdCl_2 , y las pocas que germinaban, no desarrollaron las primeras hojas, muriendo a los pocos días. Por el contrario, tanto la germinación como el crecimiento posterior de las plántulas transformadas en esas condiciones se producía sin aparente dificultad.

La figura 3B muestra la cuantificación de la tolerancia al metal mercurio (30 μM) de las semillas transformadas de la línea 10 con respecto a las silvestres. Los resultados obtenidos son el cociente de las semillas que eran capaces de germinar por el número total de semillas sembradas en cada caso. Mirando los valores de tolerancia, puede observarse que las plantas transformadas eran 10 veces más tolerantes a este metal pesado que las silvestres.

Ejemplo 3

Recuperación de suelos de la toxicidad de los distintos metales pesados

Para el estudio de la recuperación de suelos tóxicos en distintos metales pesados, semillas, tanto silvestres como de la línea 10 de las modificadas genéticamente, de *Arabidopsis thaliana* se sembraron en vermiculita (soporte inerte). Después de 24 horas a 4°C, se introdujeron en las cámaras de crecimiento en las mismas condiciones que las descritas en el ejemplo 1, y se dejaron crecer durante tres semanas. Medio Hoagland fue utilizado para proporcionar a las plantas los nutrientes necesarios para su idóneo crecimiento. Después de estas tres semanas, las plantas se irrigaron con medio Hoagland contaminado con los distintos metales, a las concentraciones que anteriormente fueron calculadas como tóxicas para las plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana*, menos para el arsenito donde la concentración usada fue de 100 μM . En este ejemplo, mostramos los casos particulares del CdCl_2 a 250 μM , NaAsO_2 a 100 μM , NaH_2AsO_4 a 180 μM y HgCl_2 30 μM .

Después de los 14 días de tratamiento con los distintos metales pesados, se procedió al tratamiento de las muestras de hoja para el posterior análisis elemental. Para dicho análisis, hojas de las plantas en las distintas condiciones fueron recogidas y secadas a 65°C durante 5 horas. El material ya seco fue digerido por una mezcla ácida compuesta de $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ 7:1 (v/v) a 65°C hasta que el volumen de la disolución se reducía por evaporación desde 20 a 2 ml. Finalmente las muestras, fueron analizadas mediante espectroscopia de emisión atómica (ICP-AES) usando un secuenciador multi-elemento Fisons-ARL 3410.

En la figura 4 se muestran los resultados obtenidos cuando el experimento se realizó con la línea 10 de las modificadas genéticamente con los metales pesados Cd, As (en sus dos formas arsenito y arseniato) y Hg.

Como caso particular destacamos el resultado obtenido cuando el medio contaminado contenía

cadmio a la concentración de 250 μM . Puede observarse que la cantidad de metal absorbido del suelo por la planta modificada genéticamente es un 72% superior que la cantidad absorbida por las plantas silvestres (Fig. 4B). El nivel de absorción medio obtenido por esta planta fue de 670 mg de Cd/Kg de peso seco de planta, en las condiciones descritas anteriormente. Este fenómeno se produjo sin ninguna variación significativa en la velocidad de crecimiento de las plantas transformadas, lo que indica que el aumento de absorción de metales no tuvo efectos apreciables sobre las plantas.

Referencias bibliográficas

- Baker AJM, Brooks RR (1989) Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metal elements—a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1: 81-126
- Barroso C, Vega JM, Gotor C, (1995). A new member of the cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*, 363: 1-5
- Barroso C, Romero LC, Vega JM, Gotor C. (1997) Molecular characterization of the sulfur metabolism in plants. *Curr Top. Phytochem*, 1: 19-29
- Barroso C, Vega JM, Gotor C. (1998) The role of roots in cysteine biosynthesis by *Arabidopsis thaliana*. *J. Physiol Biochem*. 54: 189-194
- Bechtold N, Ellis J, Pelletier G (1993) In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life sciences*. 316: 1194-1199
- Cunnigham SD, Berti WR, Huang JW (1995) Phytoremediation of contaminated soils. *Trends Biotechnol* 13: 393-397
- Dahr RK, Biswas BK, Samanta G, Mandal BK, Chakraborti D, Roy S, Jatar A, Islam A, Ara G, Kabir S, Khan AW, Ahmed SA, Hadi SA (1997). Groundwater arsenic calamity in Bangladesh. *Curr Sci*. 73: 48-59
- Heiss S, Schafer HJ, Haag-Kerwer A, Rausch T (1999) Cloning sulfur assimilation genes of *Brassica juncea* L.: cadmium differentially affects the expression of a putative low-affinity sulfate transporter and isoforms of ATP sulfurylase and APS reductase. *Plant Mol. Bio*. 39: 847-857
- Grill E, Winnaker EL, Zenk MH (1985) Phytochelatins: The principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230: 674-676
- Grill E, Winnaker EL, Zenk MH (1987) Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *PNAS* 84: 439-443
- Grill E, Löffler S, Winnaker EL, Zenk MH (1989) Phytochelatins, the heavy -metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatinsynthase). *PNAS* 86: 6838-6842
- Kaiser J (1998) Toxicologists shed new light on old poisons. *Science* 279: 1850-1851
- Kalef E, Gitler C (1994) Purification of vicinal dithiol-containing proteins by arsenical-based affinity chromatography. *Methods Enzymol* 233: 395-403

Krämer U, Cotter-Howells, Chamock JM, Baker AJM, Smith JAC (1996) Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 379: 635-638

Maitani T, Kubota H, Sato K, Yamada T (1996) The composition of metals bound to class III metallothionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiol.* 110: 1145-1150

Meyerovich EM (1994) *Arabidopsis*. Meyerovich and Somerville eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497

Murphy AS, Taiz L (1995) Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten *Arabidopsis ecotypes*. *Plant Physiol.* 109: 945-954

Nedelkoska TV, Doran PM (1999) Hyperaccumulation of cadmium by hairy roots of *Thlaspi caerulescens*. *Biotech. Bioengineering* 67: 607-615

Newton GL, Dorian R, Fahey RC (1981) Analysis of biological thiols: derivatization with monobromobimane and separation by reverse-phase high performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 114: 383-387

Noctor G, Arisi CM, Jouanin L, Foyer CH (1998) Manipulation of glutathione and amino acid biosynthesis in the chloroplast. *Plant Physiol.* 118: 471-482

Raskin I (1996) Plant genetic engineering may help with environmental cleanup: Commentary. *PNAS* 93: 3164-3166

Rauser WE (1987) Changes in glutathione content of maize seedlings exposed to cadmium. *Plant Science* 51: 171-175

Rauser WE (1990) Phytochelatin. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 61-86

Riordan JF, Vallee BL (1991) *Methods in Enzymology*, vol 205. Academic Press, San Diego

Salt DE, Blaylock M, Kumar NPBA, Dushenkov V, Ensley BD, Chet I, Raskin I (1995) Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Review. Biotechnology* 13: 468-474

Salt DE, Smith RD, Raskin I (1998) Phytoremediation. *Annu Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 643-668

Schäfer HJ, Haag-Kerwer A, Rausch T (1998) cDNA cloning and expression analysis of genes encoding GSH synthesis in roots of heavy metal accumulator *Brassica juncea* L.: evidence for Cd-induction of a putative mitochondrial γ -glutamylcysteine synthetase isoform. *Plant Mol Biol.* 37 87-97

Shen J, Zhou J, Goldsbrough PB (1997) Characterization of phytochelatin synthase from tomato. *Physiol. Plant.* 101: 165-172

Steffens JC (1990) The heavy metal-binding peptides of plants. *Annu Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 553-575

Summers AO (1992) The hard stuff metals in bioremediation. *Current Opinion in Biotech.* 3: 271-276

Xiang C, Oliver DJ (1998) Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. 10: 1539-1550

Wagner GJ (1993) Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Adv Agron* 51: 173-212

Webb JL (1966) Arsenicals. In JL Webb, ed, *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, Vol 3. Academic Press, New York, pp 595-819

Zenk MH (1996) Heavy metal detoxification in higher plants-a review. *Gene* 179: 21-30

REIVINDICACIONES

1. Planta resistente a medios con metales pesados, manipulada genéticamente, **caracterizada** porque dicha planta presenta aumentada su capacidad de síntesis de la enzima O-acetilserina(tiol)lasi (OASTL), que cataliza la reacción de síntesis de la cisteína, mediante la sobre-expresión del gen *Atcys-3A*.

2. Planta resistente a medios con metales pesados, manipulada genéticamente, según la reivindicación 1, **caracterizada** porque en dicha planta la sobre-expresión de dicho gen se encuentra bajo el control de una secuencia regulatoria transcripcional funcional en planta, particularmente bajo control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor.

3. Planta resistente a medios con metales pesados, manipulada genéticamente, según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizada** porque dicha planta, mediante la sobre-expresión de dicho gen, presenta incrementada hasta 4 veces la síntesis de moléculas responsables de secuestrar metales pesados y metaloides.

4. Planta resistente a medios con metales pesados, manipulada genéticamente, según la reivindicación 3, **caracterizada** porque las moléculas y péptidos cuya síntesis se ha incrementado son la cisteína, el glutatión, la fitoquelatina y la metalotioneína.

5. Planta resistente a medios con metales pesados, manipulada genéticamente, según las reivindicaciones 1-4, **caracterizada** porque acumula en sus tejidos metales pesados y metaloides seleccionados entre Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Pd, Pt, Te, Tl, Sb, Se, Sn y Zn, sus especies iónicas correspondientes y sus mezclas.

6. Planta resistente a medios con metales pesados, manipulada genéticamente, según la reivindicación 5 **caracterizada** porque los metales pesados y metaloides acumulados por la planta se seleccionan particularmente entre As, Cd, Cu, Hg, Ni, y Zn, sus especies iónicas correspondientes y sus mezclas y más particularmente entre As, Cd y Hg, sus especies iónicas correspondiente y sus mezclas.

7. Planta resistente a medios con metales pesados, manipulada genéticamente, según las reivindicaciones 1-6, **caracterizada** porque la planta acumula los metales pesados y metaloides preferentemente en sus partes aéreas: tallos y hojas.

8. Planta resistente a medios con metales pesados, manipulada genéticamente, según las reivindicaciones 1-7, **caracterizada** porque acumula metales pesados y metaloides en sus tejidos aéreos hasta un 72 % más que las correspondientes plantas silvestres (sin modificación genética) de la misma especie.

9. Planta resistente a medios con metales pesados, manipulada genéticamente, según las reivindicaciones 1-8 **caracterizada** porque contiene semillas capaces de germinar en medios que contienen concentraciones tóxicas de metales pesados para las semillas de las correspondientes plantas

silvestres.

10. Planta resistente a medios con metales pesados, manipulada genéticamente, según la reivindicación 9 **caracterizada** porque dichas semillas son capaces de germinar en medios que contienen concentraciones de Cd superiores a 250 μM , concentraciones de Zn superiores a 1.3 mM, concentraciones de Hg superiores a 30 μM , concentraciones de Cu superiores a 100 μM , concentraciones de Ni superiores a 250 μM , concentraciones de As(V) superiores a 180 μM , o concentraciones de As(III) superiores a 40 μM .

11. Planta resistente a medios con metales pesados, manipulada genéticamente, según las reivindicaciones 1-10, **caracterizada** porque es una planta diploide.

12. Planta resistente a medios con metales pesados, manipulada genéticamente, según la reivindicación 11, **caracterizada** porque es una planta perteneciente a la familia de las *Brassicaceae* o *Cruciferae*.

13. Planta resistente a medios con metales pesados, manipulada genéticamente, según la reivindicación 12, **caracterizada** porque es una planta del género *Arabidopsis*.

14. Planta resistente a medios con metales pesados, manipulada genéticamente, según la reivindicación 13, **caracterizada** porque es una planta de la especie *Arabidopsis thaliana*.

15. Planta resistente a medios con metales pesados, manipulada genéticamente, según la reivindicación 14, **caracterizada** porque es una planta de la especie *Arabidopsis thaliana*, ecotipo columbia.

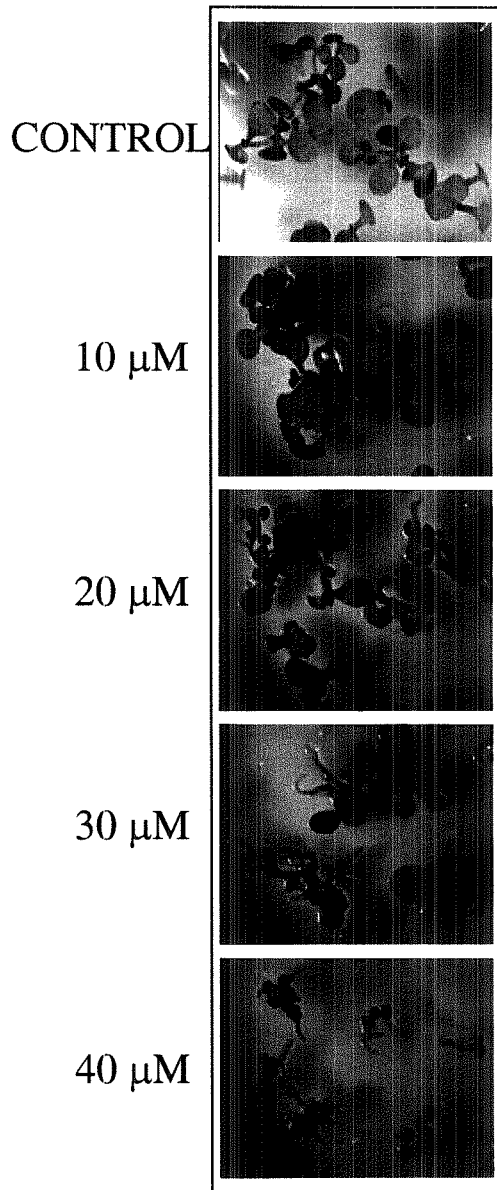
16. Procedimiento para obtener plantas resistentes a medios con metales pesados y acumuladoras de dichos metales pesados, según las reivindicaciones 1-15, que comprende los siguientes pasos:

- a- Construcción de un plásmido que contenga el gen *Atcys-3A*
- b- Introducción de dicho plásmido en la planta a modificar
- c- Identificación de las plantas modificadas mediante selección con antibiótico
- d- Sobre-expresión del gen controlada por una secuencia regulatoria transcripcional funcional en planta.

17. Utilización de una planta resistente a medios con metales pesados según las reivindicaciones 1-15 para recuperar un suelo contaminado por metales pesados y metaloides que comprende las siguientes etapas:

- a) plantar entre 250.000 y 2.500.000 plantas por hectárea de suelo contaminado.
- b) cultivar las plantas durante un periodo comprendido entre 15 y 40 días.
- c) recolectar las partes aéreas, tallos y hojas de dichas plantas en las cuales se han acumulado los metales pesados y metaloides.

A)



B)

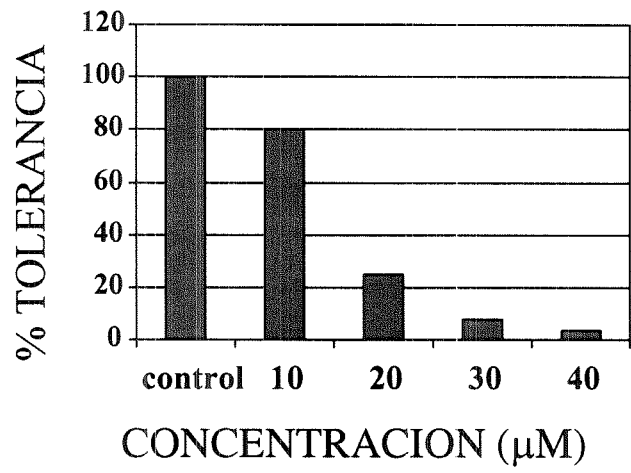


FIGURA 2

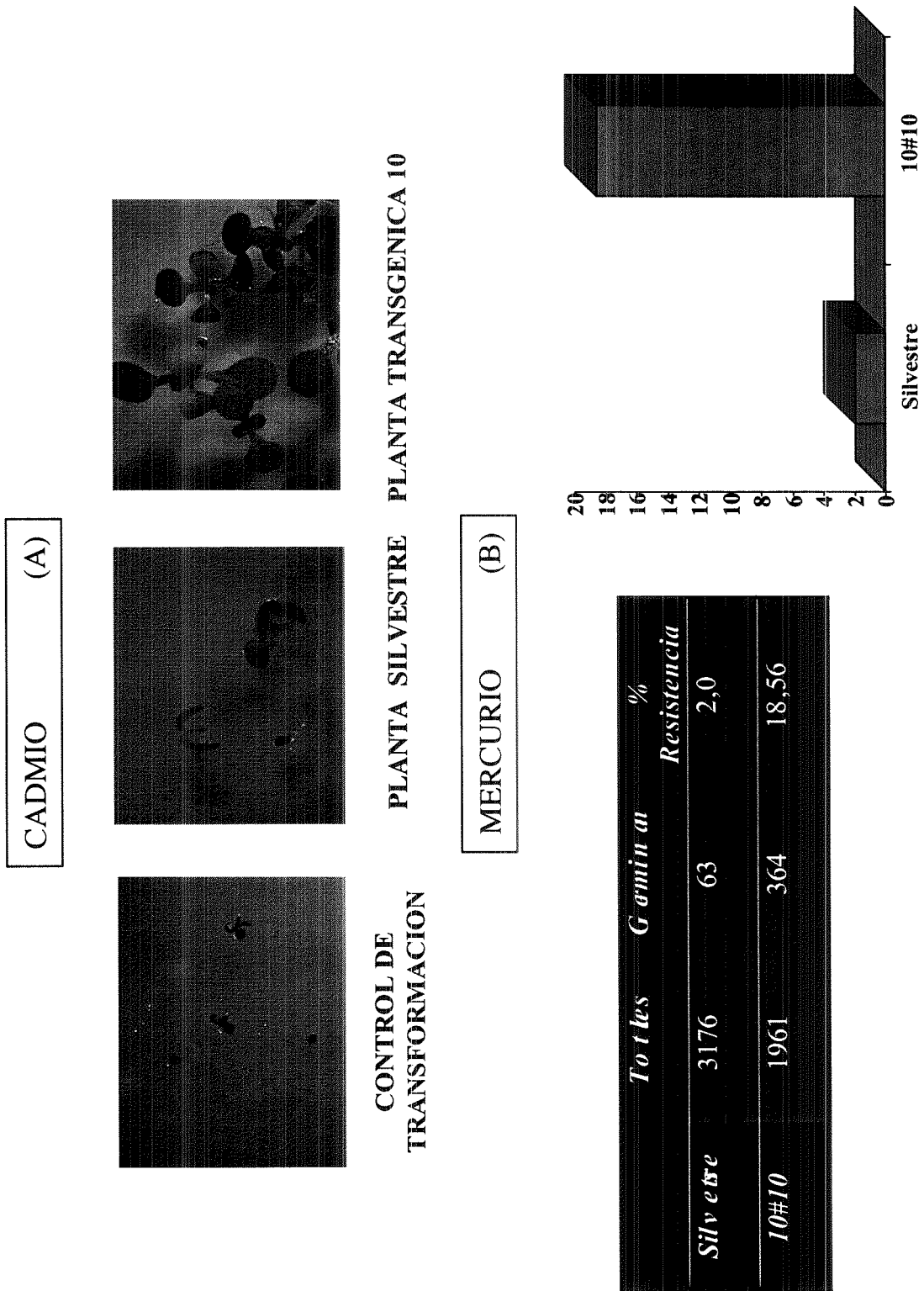


FIGURA 3

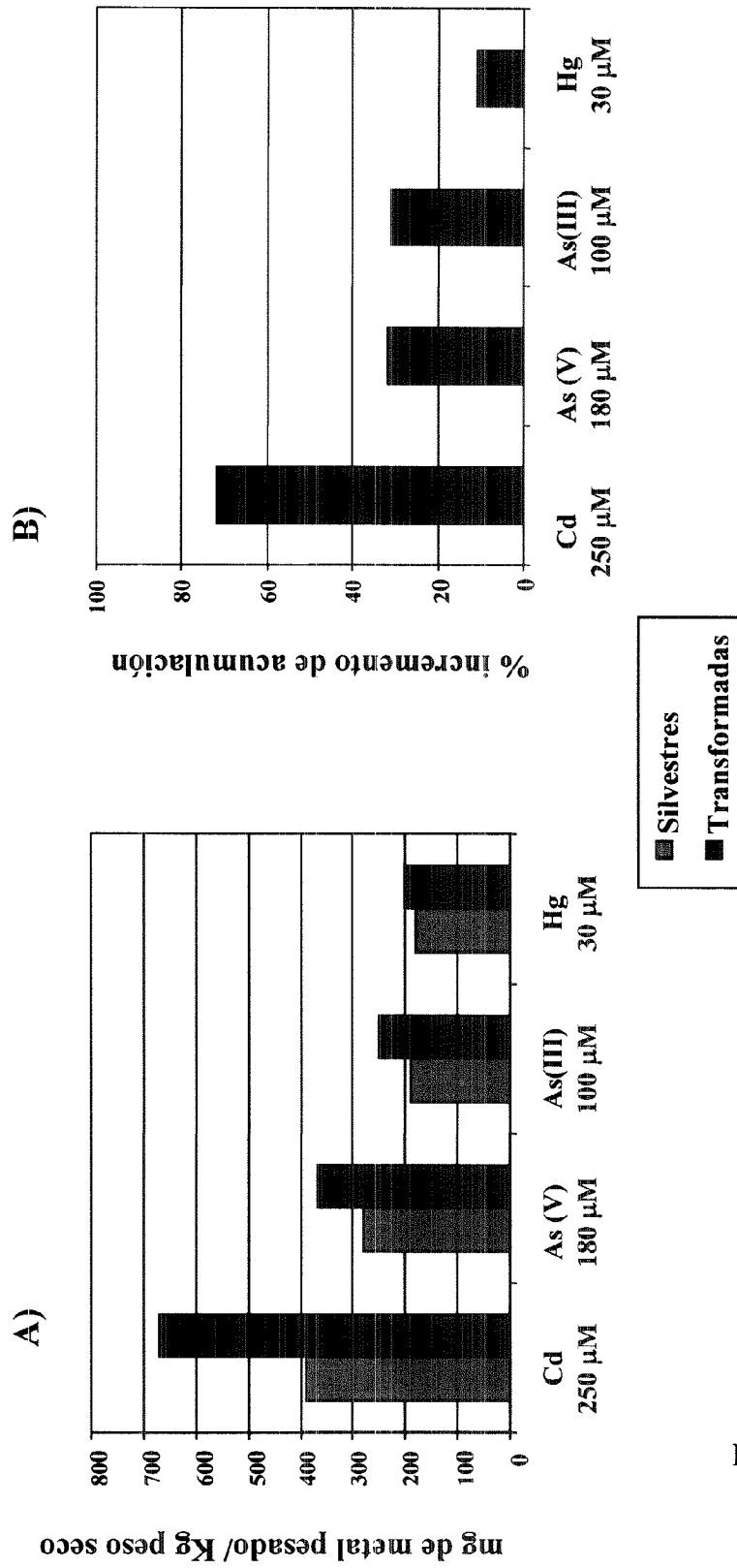


FIGURA 4



① ES 2 176 117

② N.º solicitud: 200100590

③ Fecha de presentación de la solicitud: 14.03.2001

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: C12N 15/82, 15/29, 15/52, C07K 14/415, B09C 1/10

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	BARROSO et al. Salt-specific regulation of the cytosolic O-acetylserine (thiol) lyase gene from Arabidopsis thaliana is dependent on abscid acid. Plant Molecular Biology. Julio, 1999, Vol. 40, N° 4, páginas 729-736. Figura 1; páginas 731,732,734.	1,3-15
Y	WO 0071695 A1 (THE TRUSTEE OF THE UNIVESITY OF PENNSYLVANIA) 30.11.2000, páginas 17,18,33,34; reivindicaciones 13,16.	1-17
Y	BARROSO et al. A new member of cytosolic O-acetylserine (thiol) lyase gene family in Arabidopsis thaliana. FEBS Lett., 1995, 363 (1,5), páginas 1-5. Figuras 1,3.	1-17
Y	SCHAFER et al. cDNA cloning and expression of genes encoding GSH synthesis in roots of the heavy-metal accumulator Brassicae juncea L.: evidence for Cd-induction of a putative mitochondrial alpha-glutamylcysteine synthetase isoform. Plant Molecular Biology. Mayo, 1998, Vol. 37, N° 1, páginas 87-97. Página 94, figura 7.	1-17
A	CHEN et al. Metal accumulating mutants from Arabidopsis thaliana. Plant Physiology. 1977, Vol. 114, N° 3 SUPPL, página 124.	1-17

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe

10.10.2002

Examinador

J. Manso Tomico

Página

1/1