



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 152 838**

⑫ Número de solicitud: 009801641

⑤① Int. Cl.⁷: A01H 1/00

A01H 5/00

C12N 15/82

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫② Fecha de presentación: **31.07.1998**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2001**

⑫④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.02.2001

⑦① Solicitante/s: **UNIVERSIDAD DE MALAGA**
Plaza de El Ejido, s/n
29071 Málaga, ES
RUTGERS UNIVERSITY

⑦② Inventor/es: **Cánovas Ramos, Francisco;**
Kirby, Edward;
Gallardo Alba, Fernando;
Fu, Jiamming;
Ruiz Cantón, Francisco y
García Gutiérrez, Angel

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Arboles transgénicos caracterizados por tener mayor crecimiento vegetativo.**

⑤⑦ Resumen:

Arboles transgénicos caracterizados por tener mayor crecimiento vegetativo.

La presente invención describe un método para la generación de árboles transgénicos, consistente en la construcción de un gen quimérico, que transferido al genoma de chopos híbridos (*Populus tremula* x *P. alba*) permite la sobreexpresión de un gen de glutamina sintetasa de pino en el citoplasma celular. Los árboles obtenidos por este método se caracterizan por tener mayor contenido en proteína y clorofila en las hojas y mayor crecimiento vegetativo, tanto en altura como en el número de hojas, que los árboles no transformados.

ES 2 152 838 A1

DESCRIPCION

Arboles transgénicos caracterizados por tener mayor crecimiento vegetativo.

Sector técnico

La presente invención tiene su aplicación dentro de la industria dedicada al empleo de árboles para la obtención de madera y biomasa para la producción de papel y combustibles, para la forestación de zonas urbanas y periurbanas y la reforestación de zonas devastadas.

Estado de la técnica.

El nitrógeno es uno de los principales factores limitantes de la productividad vegetal. Sólo algunos microorganismos pueden fijar el abundante nitrógeno molecular atmosférico; las plantas, por si mismas, son incapaces de realizar este proceso, por lo que dependen de la existencia de formas asimilables en el medio. Aunque algunas plantas pueden utilizar el dinitrógeno gracias a la simbiosis con ciertos microorganismos capaces de fijarlo, la mayoría de ellas utiliza el nitrato y el amonio del suelo. En cualquier caso, la asimilación de nitrógeno por la plantas requiere su reducción hasta amonio y su incorporación a esqueletos carbonados. La principal ruta de asimilación de amonio en plantas superiores corresponde a las reacciones catalizadas por las enzimas glutamina sintetasa y glutamato sintasa (ciclo GS/GOGAT) (Mifflin y Lea, *The Biochemistry of Plants*, vol 5, Academic Press, Londres, pp 169-202, 1987). La GS (EC 6.3.1.2) cataliza la incorporación de amonio a glutamato para formar glutamina, siendo el grupo amido de éste aminoácido transferido al 2-oxoglutarato en una segunda reacción catalizada por la GOGAT (EC 1.4.7.1 y 1.4.1.14), que conlleva la síntesis de glutamato. La importancia biológica de esta reacciones se debe a que la glutamina y el glutamato son los dadores de nitrógeno orgánico en la síntesis de los principales compuestos nitrogenados en plantas superiores: clorofilas, aminoácidos, poliaminas y ácidos nucleicos, por lo que las enzimas del ciclo GS/GOGAT tienen un papel biológico clave en los procesos de desarrollo y crecimiento de los vegetales. En plantas superiores existen dos enzimas GOGAT que difieren en la fuente de poder reductor que utilizan, ferredoxina reducida o NADH. En células fotosintéticas, la GOGAT dependiente de ferredoxina (Fd-GOGAT), de localización cloroplastídica (Botella *et al.*, *Plant Physiol.* 87:255-257, 1988), es la más relevante. La GS existe como dos formas isoenzimáticas presentes en los compartimentos citosólico y cloroplastídico que difieren en su comportamiento cromatográfico y en el tamaño de la subunidad (Forde y Cullimore, *Oxford Surveys Plant Mol. Cell Biol.* 6:247-296, 1989). Ambas isoenzimas GS son proteínas octaméricas en plantas superiores, oscilando el tamaño de subunidad de la isoenzima citosólica entre 39 y 42 kDa, mientras el tamaño de subunidad de la isoforma cloroplastídica es de 44-45 kDa. El mayor tamaño de la subunidad cloroplastídica se debe a la existencia de extensiones carboxilo y amino terminal que no se encuentran en las subunidades de la isoforma citosólica. En tejidos típicamente fotosintéticos la isoforma cloroplastídica es la más

abundante y está implicada en la incorporación de amonio procedente de la reducción del nitrato del suelo y del amonio liberado durante la fotorrespiración; mientras que en tejidos no fotosintéticos la más abundante es la isoforma citosólica, que está implicada principalmente en la asimilación de amonio de procesos catabólicos (degradación de aminoácidos) y en la síntesis de glutamina para el transporte a otras partes de la planta (Edwards *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3459-3463).

Debido a la distribución de las isoenzimas citosólica y cloroplastídica de la GS, el ciclo GS/GOGAT en células fotosintéticas es una ruta metabólica típicamente cloroplastídica y asociada al metabolismo fotosintético (Figura 1). No obstante, en las coníferas, el grupo más importante de plantas gimnospermas, no se ha descrito la presencia de la isoenzima cloroplastídica de la GS en tejidos fotosintéticos, siendo la isoforma citosólica la única GS detectada en separaciones cromatográficas de intercambio iónico, en el análisis de polipéptidos mediante western blots (Cánovas *et al.* *Planta* 185:372-378, 1991) y en la localización subcelular de la enzima mediante microscopía óptica y electrónica de transmisión (García-Gutiérrez *et al.* *Plant J.* en prensa). Estos resultados son congruentes con el análisis de genotecas de cDNA de *Pinus sylvestris*, en el que únicamente se han aislado secuencias correspondientes a los productos de expresión de genes que codifican la isoforma citosólica (Cantón *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 22:819-828, 1993). A pesar de estas diferencias en el contenido y expresión de la GS en angiospermas y coníferas, la Fd-GOGAT en coníferas está localizada en el estroma del cloroplasto como ocurre en angiospermas (García-Gutiérrez *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 27:115-128, 1995), por lo que el ciclo GS/GOGAT en estas especies presenta una compartimentación subcelular diferente al de angiospermas: la asimilación de amonio transcurre en el citosol, mientras que la síntesis de glutamato tiene lugar en el cloroplasto (Figura 2). La expresión de los genes que codifican ambas enzimas se ha descrito en plántulas de pino y se ha observado una estrecha relación con el desarrollo del cloroplasto en cotiledones, el primer órgano fotosintético del árbol (Cánovas *et al.*, *Planta* 185:372-378, 1991; García-Gutiérrez *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 27:115-128, 1995). Estos estudios han puesto de manifiesto la importancia de la asimilación de amonio y síntesis de glutamina en el citosol en el desarrollo del aparato fotosintético y en el crecimiento de las coníferas.

Explicación de la invención

La presente invención describe la generación de chopos transgénicos que expresan la glutamina sintetasa citosólica de pino. Los árboles obtenidos mediante ingeniería genética presentan un mayor capacidad de asimilación de amonio y síntesis de glutamina debido a la sobreproducción de glutamina sintetasa en el citosol en tejidos fotosintéticos, que confiere a los árboles un mayor contenido en proteína y clorofila en las hojas, y un mayor crecimiento vegetativo que los árboles controles.

La denominación de chopo corresponde a va-

rias especies del género *Populus* y a los híbridos generados a partir del cruzamiento de distintas especies del género. Estos árboles son plantas angiospermas que presentan una distribución de los polipéptidos de GS típica en este grupo de plantas: altos niveles de GS cloroplastídica (45 kDa) en las zonas de la hoja donde las células del mesófilo son las más abundantes, y niveles elevados de la isoforma citosólica (40 kDa) en el peciolo de la hoja, región en la que predominan las células asociadas a los haces vasculares (Figura 3). El aumento en los niveles de GS citosólica en las hojas de los chopos se ha conseguido mediante la transferencia de un gen quimérico que expresa la isoforma citosólica de pino bajo la dirección del promotor 35S del virus de mosaico de la coliflor (CaMV35S). El gen construido mediante técnicas de DNA recombinante contiene también una señal para la terminación de la transcripción que procede del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (NOS). La contrucción génica, CaMV35S-GS-NOS, se transfirió a la región T-DNA del vector pBIN19 (Figura 4) para la transformación de un clon de chopo híbrido (clon 7171-B4) procedente del cruce de *Populus tremula* y *P. alba* (Leple *et al.* *Plant Cell Rep.* 11: 137-141, 1992), mediante infección con *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404. La región T-DNA del vector empleado también posee un gen que confiere resistencia al antibiótico kanamicina y que permite la selección de las células recombinantes.

Se transformaron segmentos de hojas de árboles cultivados *in vitro* y se generaron callos que se seleccionaron por su capacidad de crecimiento y diferenciación en presencia de kanamicina. En las plántulas regeneradas se analizó la presencia del gen CaMV35S-GS-NOS mediante Southern blot. En todas las plantas seleccionadas se detectó la presencia de la contrucción génica (Figura 5). La expresión del gen se siguió analizando el contenido de mRNA, proteína y actividad enzimática. En los árboles transgénicos se ha detectado mediante northern blot la presencia de mensajeros de GS de pino, lo que indica que el gen introducido se expresa en los árboles seleccionados (Figura 6); además, los mensajeros son correctamente traducidos y el polipéptido de la GS pino (41 kDa) puede detectarse mediante western blot: en regiones de la hoja en la que predominan las células fotosintéticas (punta de la hoja), así como en los elementos vasculares (peciolo) (Figura 7). El análisis de la actividad enzimática GS pone de manifiesto que en los árboles transgénicos se registran niveles más elevados de GS que en los árboles controles y mayores contenidos en clorofila y proteínas que son especialmente notorios en los árboles que presentaron mayor niveles de actividad GS (Figura 8).

Los estudios de crecimiento y desarrollo indican que los árboles transgénicos presentan mayor crecimiento en altura (crecimiento neto alrededor de un 75 % mayor que los controles) y mayor número de hojas por planta (alrededor de un 40 % hojas más que los controles sin transformar; Figura 9). Algunas otras diferencias fenotípicas se han observado en ciertos clones, por ejemplo la presencia de márgenes de la hoja alterados o la disminución de pigmentación roja típica en hojas

y peciolos (probablemente como consecuencia del aumento en el contenido en clorofilas). Estos resultados indican que la sobreexpresión de un gen de GS de pino confiere a los árboles transgénicos un considerable incremento de su crecimiento vegetativo. Además, los resultados obtenidos en nuestro laboratorio confirman que la disponibilidad de nitrógeno orgánico para el metabolismo de la planta es un factor crítico para el crecimiento y desarrollo de las plantas leñosas.

Explicación de los dibujos

Figura 1. Esquema de la asimilación de amonio en una célula fotosintética en plantas angiospermas. La síntesis de glutamina y glutamato está localizada en el cloroplasto y tiene lugar mediante la acción secuencial de la isoenzima cloroplastídica de la GS (GS2) y la Fd-GOGAT.

Figura 2. Esquema de la asimilación de amonio en cotifedones de pino. En coníferas únicamente se ha detectado la isoenzima citosólica de la GS (GS1), por lo que la asimilación de amonio y síntesis de glutamato tiene lugar en dos compartimentos diferentes, citosol y cloroplasto.

Figura 3. Análisis de los polipéptidos de la glutamina sintetasa en hojas de chopo (A) y cotiledones de pino (B) mediante western blotting. Muestras conteniendo 20 mg de proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio. Las proteínas se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa y se incubaron con un antisuero generado contra la isoenzima citosólica de pino para la detección de los polipéptidos de la glutamina sintetasa. Los polipéptidos que corresponden a las isoenzimas citosólica (GS1, 40 kDa) y cloroplastídica (GS2, 45 kDa) se indican con una flecha.

Figura 4. Esquema del gen CaMV35S-GS-NOS y de la transformación de *Populus*. El gen compuesto del promotor del gen 35S del virus mosaico de la coliflor (CaMV35S), el cDNA que codifica la GS citosólica de pino (GS) y la región de terminación de la transcripción (NOS) se transfirió como fragmento de 2.1 kb con extremos HindIII a la región T-DNA del vector pBin 19, generándose el nuevo vector pBin35SGSp que se utilizó para transformación de segmentos de hoja de *Populus* (*Populus tremula* X *P. alba*, clon 7171-B4) mediante infección con *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404. B/É* corresponde a extremos romos BamHI y EcoRI ligados durante la contrucción del gen. Las flechas en el plásmido pBin35SGSp indican el sentido de la transcripción de los genes.

Figura 5. Análisis de la presencia del gen en el genoma de los árboles transformados. Se preparó DNA genómico que se digirió con HindIII y los fragmentos resultantes se separaron mediante electroforesis en gel

de agarosa y se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa para la detección del gen quimérico empleando como sonda el cDNA de la GS de pino. El control corresponde a chopos no transformados. A-D corresponde a diferentes transformantes primarios. La presencia del gen CaMV35S-GS-NOS se detectó en el genoma de los árboles transgénicos como una banda de 2.1 kb.

Figura 6. Análisis de los niveles de mRNA de la GS de pino en los chopos transgénicos. Se aisló RNA total de hojas de plantas controles y transformantes que se analizó mediante northern blot empleando como sonda el cDNA de la GS de pino marcado con ^{32}P . Los resultados muestran la presencia de mRNA de la GS citosólica de pino únicamente en los transformantes (plantas A-D).

Figura 7. Expresión de la GS citosólica de pino en hojas de los árboles transgénicos. Se prepararon extractos de proteínas de la hoja entera (panel superior), y de zonas diferenciadas enriquecidas en elementos vasculares (peciolo, panel inferior) y en células fotosintéticas (punta, panel inferior). La presencia de los polipéptidos de la GS se analizó mediante western blot como se describe en la figura 3. Como controles se emplearon extractos de pino, en el que se detectó el polipéptido de la GS citosólica (GS1, 41 kD), y de chopo sin transformar que contenía los polipéptidos de la GS cloroplástica (GS2, 45 kD) y citosólica GS1 (40 kD). En las muestras que proceden de los árboles transgénicos se detectan los polipéptidos endógenos de la GS cloroplástica (GS2, 45 kD) y citosólica (GS1, 40 kD) y el polipéptido de la GS citosólica de pino (GS1, 41 kD). Los tres polipéptidos son apreciables en el peciolo de las plantas transgénicas (peciolo de la planta A, panel inferior), mientras que en los extractos de hojas enteras y en la punta de la hoja de los transgénicos, los polipéptidos más abundantes son el cloroplastídico endógeno (GS2, 45 kD) y el de la GS citosólica de pino (GS1, 41 kD).

Figura 8. Niveles de actividad GS, contenido en proteínas solubles y clorofila total en la cuarta hoja de chopos controles y transgénicos. La actividad GS se determinó mediante el ensayo sintetasa (Cánovas *et al. Planta* 185:372-378, 1991). Las proteínas se cuantificaron de acuerdo con el procedimiento descrito por Bradford (*Anal. Biochem.* 72:248-254, 1976). El contenido en clorofila se determinó en extractos preparados en acetona al 80 % de acuerdo con Grann y Ort (*J. Biol. Chem.* 259:14003-14010, 1984).

Figura 9. Crecimiento neto y número de hojas en diferentes transformantes primarios y en chopos controles. Los datos de cada clon corresponden a medias de al menos tres indivi-

duos con el mismo genotipo. Los árboles se cultivaron en invernadero durante 8 semanas antes de la recogida de los datos. Las diferencias en crecimiento neto y número de hojas entre los clones transgénicos y controles son estadísticamente significativos ($P < 0.001$).

Modo de realización de la invención

En la presente invención se ha empleado un clon híbrido de chopo (*Populus tremula* X *P. alba* clon 7171-BA) que fue previamente seleccionado por su capacidad de crecimiento y regeneración en cultivos *in vitro* (Leple *et al. Plant Cell Rep.* 11:137-141, 1992). Las plantas se mantuvieron en cultivos *in vitro* en cámaras con un fotoperiodo de 16 h de luz y temperatura constante de 24 °C bajo una irradiancia de 30 mmol/m²s.

La construcción génica compuesta del promotor del gen 35S del virus de mosaico de la coliflor (CaMV 35S) fusionado al cDNA de la GS de pino (Cantón *et al., Plant Mol. Biol.* 22:819-828, 1993) y a la región de terminación de la transcripción del gen de la nopalina sintetasa (NOS) se realizó de la siguiente forma: El inserto de 1.4 kb con extremos EcoRI del plásmido pGS114 y que corresponde al cDNA de la GS citosólica de pino (Cantón *et al., 1993*) se purificó y los extremos se trataron con el ragmento Klenow de la DNA polimerasa I para la obtención de extremos romos. Paralelamente, el inserto de 1.0 kb con extremos BamHI que contiene el gen de la neomicina fosfo-transferasa II (NPTII) fue escindido del plásmido pCaMVNEO (Fromm *et al., Nature* 319:791-793, 1986), y el plásmido digerido se trató con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I para la generación de extremos romos. El fragmento de 1.4 kb correspondiente a la GS de pino se ligó al plásmido pCaMVNEO digerido. El nuevo plásmido formado, denominado pCaMV35SGSp contiene el gen CaMV35S-GS-NOS de 2.1 kb con extremos HindIII. La orientación del cDNA de la GS respecto al promotor CaMV se verificó mediante secuenciación de la construcción y analizando el patrón de restricción de la misma. La construcción génica se escindió del plásmido y se clonó en el sitio de restricción HindIII del vector binario desarmado pBIN19 (Bevan, M. *Nucleic Acid Res.* 12:8711-8721, 1984). El nuevo plásmido generado se denominó pBIN35SGSp y contiene el gen CaMV-GS-NOS en el sitio de clonaje múltiple situado en la región T-DNA. La orientación de la construcción respecto al gen que confiere resistencia a la kanamicina se comprobó mediante análisis de restricción. Ambos genes se transcriben en el mismo sentido (Figura 4). El vector se transfirió a la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 mediante el método de congelación-descongelación (Holsters *et al., Mol. Genet. Genet* 163:181-187, 1978).

Las bacterias transformadas se cultivaron en medio líquido 2YT (Ausubel *et al., Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, New York, 1987) conteniendo estreptomycin (200 mg/L) y kanamicina (50 mg/ml). Tras 48 horas de incubación a 28 °C y 300 rpm, la suspensión bacteriana se centrifugó y las bacterias se resuspendieron en medio líquido M1 (medio descrito

por Mursashige y Skoog (*Physiol. Plant.* 15:473-497, 1962) suplementado con vitaminas (Morel y Wetmore, *Am. J. Bot.* 38:141-143, 1951), sacarosa al 3% (p:v), y L-cisteína (1 ml/L)) y la preparación se ajustó a una densidad óptica de 0.3 unidades de absorbancia a 660 nm.

Para la transformación, los árboles se cultivaron *in vitro* en medio M1 solidificado (conteniendo 8 g/L de agar); cuando las plántulas alcanzaron una altura de 5-10 cm, se recolectaron las hojas que se preincubaron en oscuridad durante 48 horas. Las hojas se cortaron en segmentos de 1 cm² y se incubaron en la preparación de bacterias transformadas durante 2 horas a temperatura ambiente. Los segmentos de hojas se secaron sobre papel de filtro estéril para eliminar el exceso de bacterias y se procedió a una incubación de 48 h en oscuridad en medio M1 solidificado. Para la descontaminación bacteriana y selección de resistencia a antibiótico, los segmentos se transfirieron a medio M1 solidificado conteniendo timentina (200 mg/L), kanamicina (50 mg/L) y 2,4-D (1 mg/L). Tras cuatro semanas, se generaron callos que se transfirieron a nuevo medio M1 sólido con kanamicina (50 mg/L) y thidiazuron (0.1 mM) para la generación de tallos en presencia de luz. Una vez que los tallos alcanzaron 2-3 cm de altura, se separaron y cultivaron en nuevo medio (M1 con la mitad de la concentración de sales descrita por Murashige y Skoog (*Physiol. Plant.* 15:473-497, 1962) para el enraizamiento de las plántulas.

Los árboles generados tras la transformación se cultivaron sobre un sustrato artificial Metro-Mix 200 (Scotts Co., Marysville Ohio USA) y se mantuvieron en invernadero durante 3-4 meses antes de su análisis.

La presencia del gen CaMV35S-GS-NOS en el genoma de las plantas transformadas se estableció mediante Southern blot. Se aisló DNA genómico a partir de las hojas de los árboles transgénicos (Dellaporta *et al.* *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19-21, 1983) y se empleó como sonda el cDNA de la GS de pino marcado con ³²P. Para el análisis de la expresión del gen a nivel de RNA, se aisló RNA total de hojas de los transgénicos (Claros y Cánovas, sometido a publicación) que se analizaron

mediante Northern blot empleado también como sonda el cDNA de la GS de pino.

Los estudios de expresión a nivel de proteína se realizaron a partir de extractos preparados de la cuarta hoja de árboles de 3-4 meses de edad. Las hojas se extrajeron en un mortero en presencia de Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, 2-mercaptoetanol 14 mM, glicerol 10%, pH 8.0 y empleando bolitas de cristal como agente abrasivo. Los extractos se centrifugaron a 22000 g y los sobrenadantes se utilizaron para la determinación de actividad enzimática GS mediante el ensayo sintetasa (Cánovas *et al.* *Planta* 185:372-378, 1991), y para la determinación de proteínas mediante el ensayo de Bradford (*Anal. Biochem.* 72:248-254, 1976).

El análisis de la expresión del polipeptido de la GS de pino en los árboles transgénicos se realizó mediante Western blot. Las proteínas de extractos crudos se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio empleando el sistema discontinuo descrito por Laemmli (*Nature* 227:680-685, 1970). Los polipéptidos se visualizaron mediante tinción del gel con azul de Coomassie para comprobar que se cargaron cantidades idénticas de proteínas en todas las calles, o se transfirieron a filtros de nitrocelulosa para la detección específica de los polipéptidos de la GS con un antisuero generado contra la enzima de pino (Cantón *et al.* *FEBS Let.* 393:205-210, 1996). La saturación de los filtros y las subsiguientes incubaciones con el antisuero y los pasos de lavado se realizaron como se ha descrito previamente (Gallardo *et al.*, *Planta* 196:148-154, 1995). Los complejos formados se detectaron con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa con una relación molar de 3.3 (Vector Laboratories, Burlingame, California, EEUU). El tamaño de los polipéptidos se calculó empleando como patrones proteínas preteñidas de masa molecular conocida (Sigma, St Louis, Missouri, EEUU).

La determinación de clorofila se realizó en extractos de hojas preparados con acetona al 80% (Grann y Ort, *J. Biol. Chem.* 259:14003-14010, 1984).

REIVINDICACIONES

1. Método para la generación de árboles transgénicos **caracterizados** por tener mayor crecimiento vegetativo, tanto en altura como en el número de hojas, que los árboles no transformados, consistente en la construcción e introducción en el genoma del árbol de un gen quimérico que provoca la sobreexpresión de glutamina sintetasa de pino en el citoplasma celular.

2. Árboles transgénicos **caracterizados** por tener mayor crecimiento vegetativo, tanto en altura como en el número de hojas, que los árboles

no transformados, debido a la introducción en el genoma del árbol de un gen quimérico que provoca la sobreexpresión de glutamina sintetasa de pino en el citoplasma celular.

5 3. Uso de los árboles generados como se resume en la reivindicación 1 para la producción de madera, papel o biomasa para la generación de combustibles, alimentos y aislantes.

10 4. Uso de los árboles generados según la reivindicación 1 para la reforestación de zonas devastadas, la forestación de zonas urbanas y periurbanas y el ajardinamiento de espacios públicos y privados.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

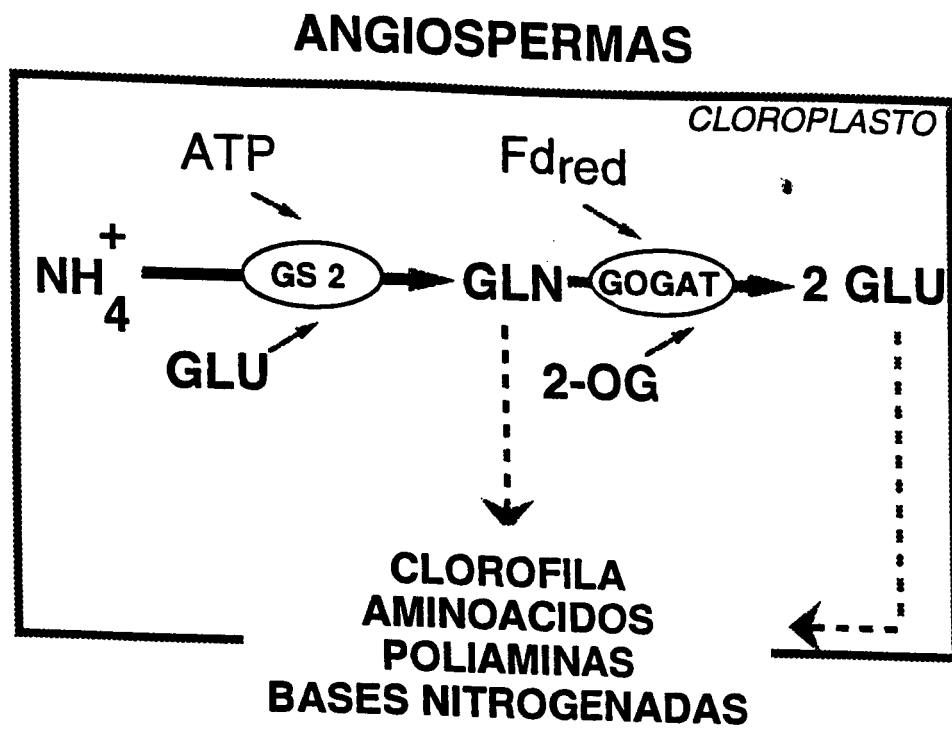


FIGURA 2

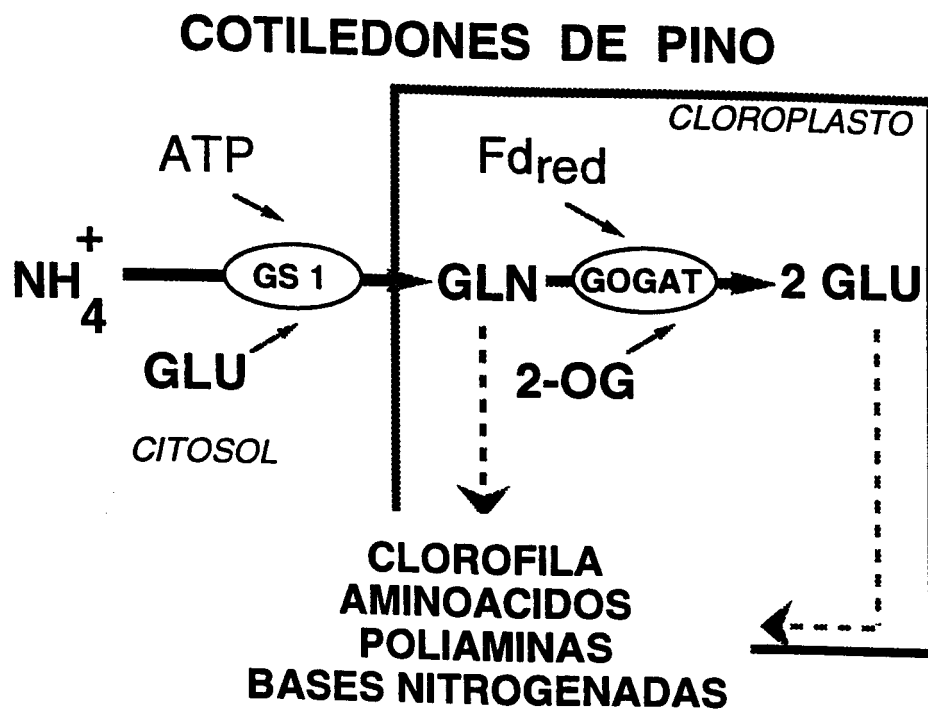


FIGURA 3

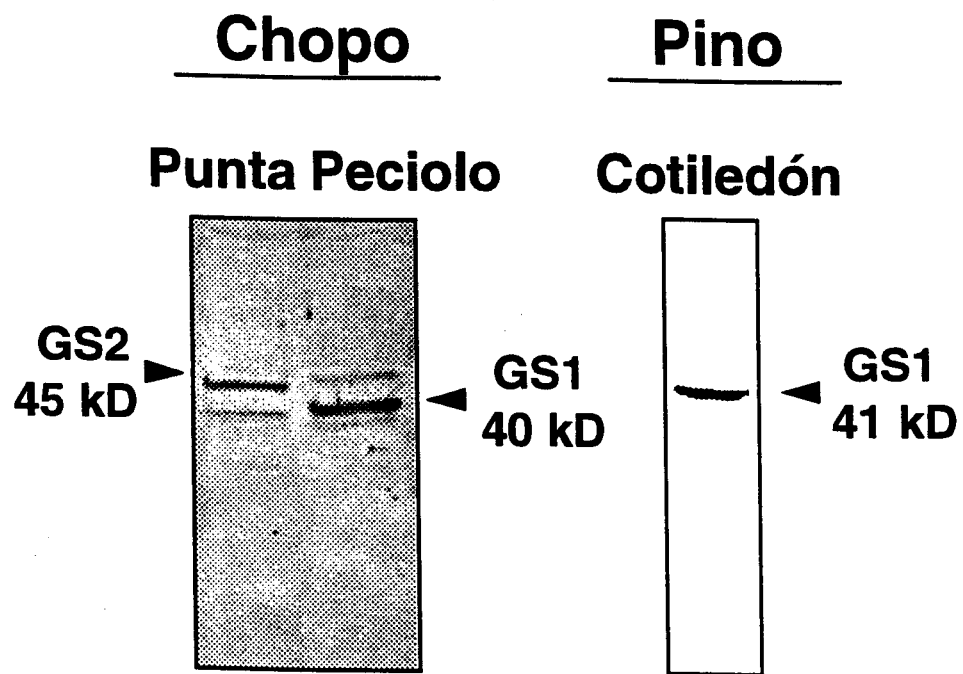


FIGURA 4

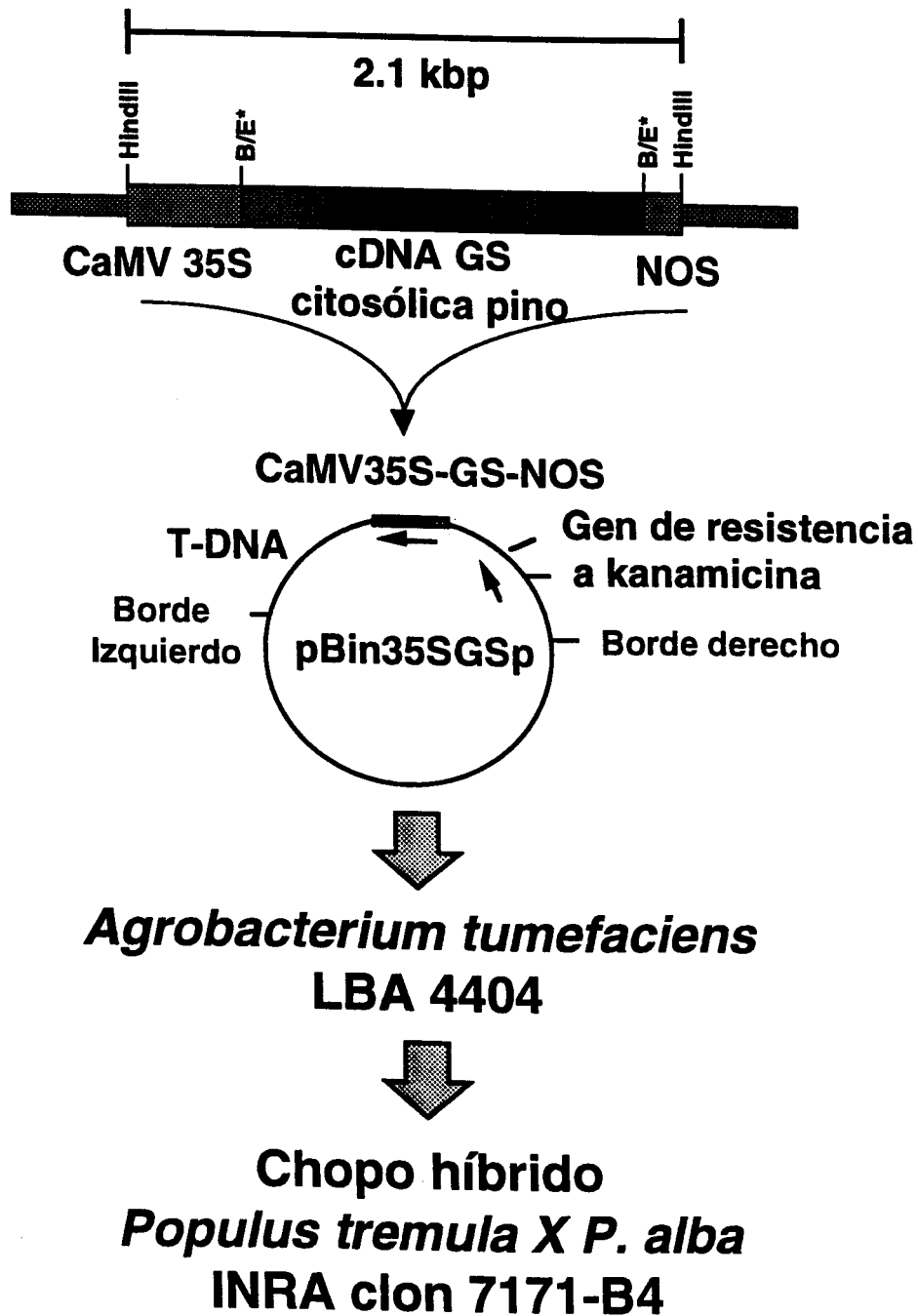


FIGURA 5

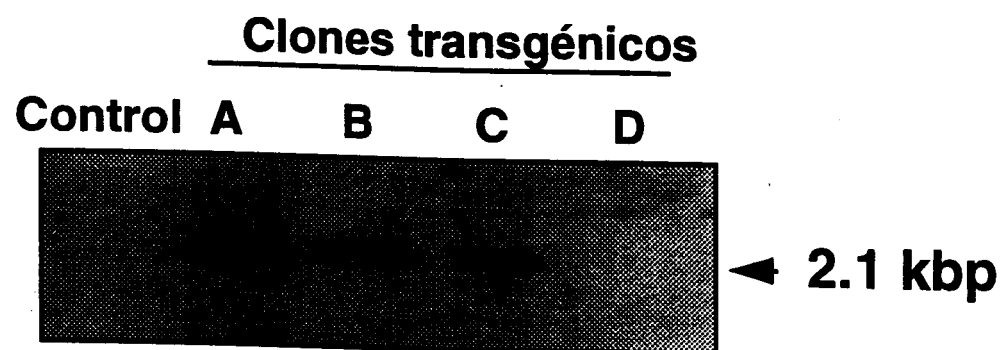


FIGURA 6

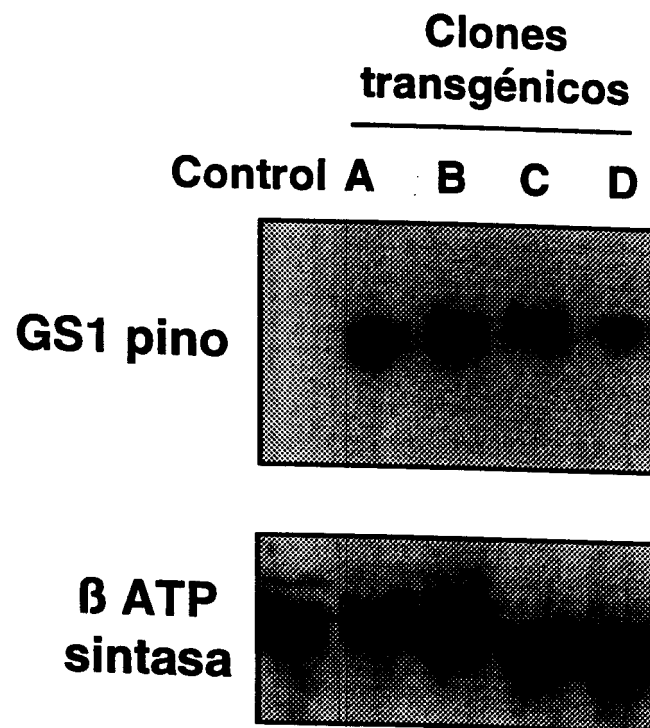


FIGURA 7

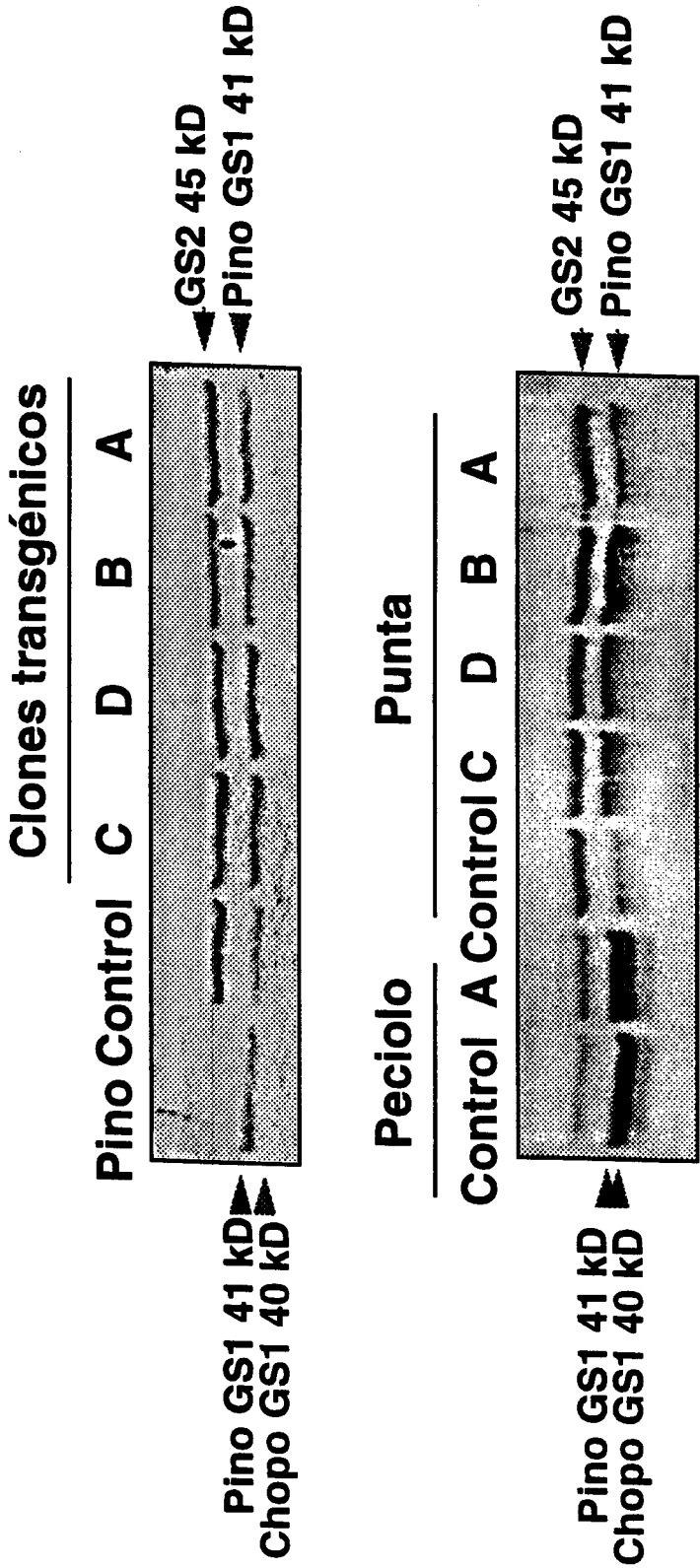


FIGURA 8

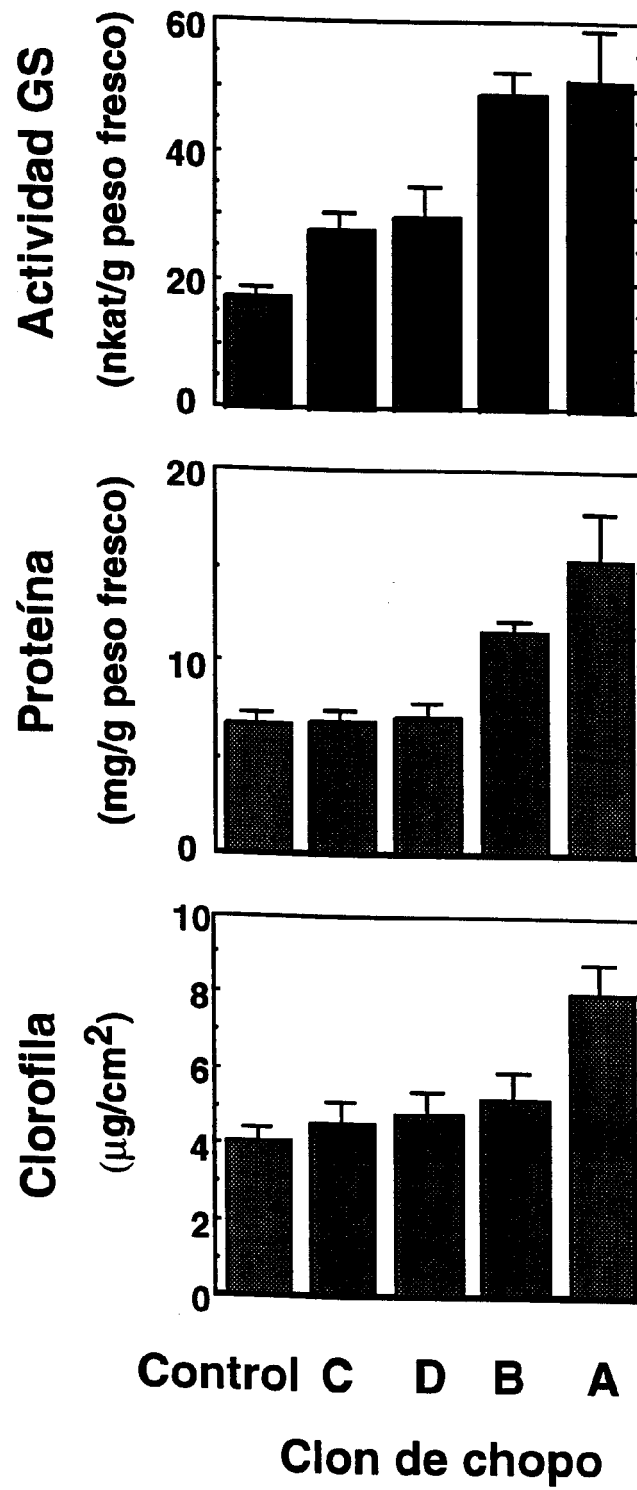
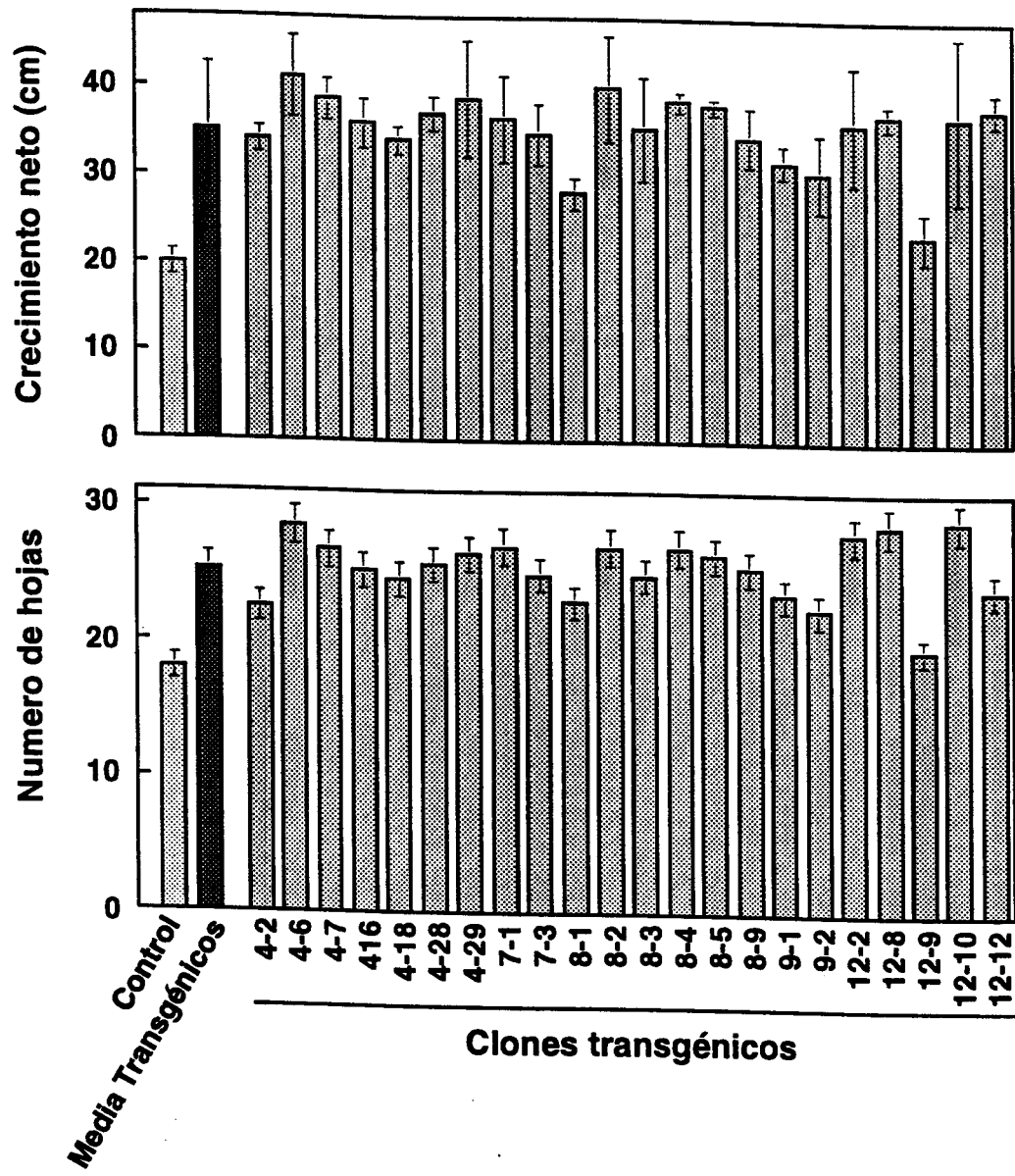


FIGURA 9





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 152 838
⑫ N.º solicitud: 009801641
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 31.07.1998
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁷: A01H 1/00, 5/00, C12N 15/82

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	WO 9509911 A1 (NEW YORK UNIVERSITY) 13.04.1995, página 9, líneas 5-30.	1,2
Y	EP 227264 A (CALGENE INC.) 01.07.1987, todo el documento.	1,2
A	EP 303780 A (HOECHST AG) 22.09.1989, todo el documento.	1,2
A	PARSONS, T.J. et al. "Transformation of poplar by Agrobacterium tumefaciens", Bio/Technology, junio 1986, Vol. 4, páginas 533-536.	1,2

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
29.12.2000

Examinador
A. Lázaro Andrés

Página
1/1