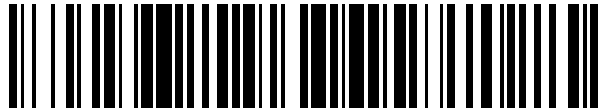


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 900**

21 Número de solicitud: 201131186

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación: **13.07.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **11.01.2012**

Fecha de la concesión: **14.11.2012**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:
02.04.2012

45 Fecha de anuncio de la concesión: **26.11.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
26.11.2012

73 Titular/es:
**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
(100.0%)
RAMIRO DE MAEZTU, 7
28040 MADRID, ES**

72 Inventor/es:
**ALLONA ALBERICH, Isabel;
MORENO CORTÉS, Alicia y
ARAGONCILLO BALLESTEROS, Cipriano**

74 Agente/Representante:
CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA AUMENTAR O DISMINUIR EL DESARROLLO DE RAMIFICACIÓN SILÉPTICA Y/O PROLÉPTICA EN UNA PLANTA LEÑOSA.**

57 Resumen:

La presente invención consiste en una aplicación biotecnológica del gen RAV1 (Related to ABI3 and Viviparous 1) y su homólogo RAV2 en relación a su capacidad, cuando se modifican sus niveles de expresión o bien la actividad de las proteínas que codifican, para incrementar o disminuir el desarrollo de ramas silépticas y/o prolépticas en especies leñosas. Mediante la modificación de la expresión de dichos genes es posible aumentar la producción de biomasa de una plantación de especies leñosas, o bien reducir el número de nudos en el tronco de especies leñosas de interés maderero.

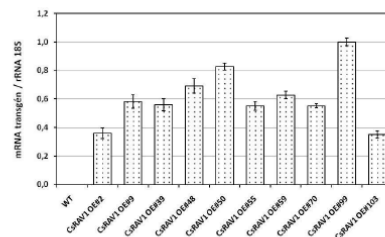


Fig. 1

ES 2 371 900 B2

PROCEDIMIENTO PARA AUMENTAR O DISMINUIR EL DESARROLLO DE RAMIFICACIÓN SILÉPTICA Y/O PROLÉPTICA EN UNA PLANTA LEÑOSA**5 SECTOR TÉCNICO**

La invención se encuadra en los sectores técnicos de la biotecnología y la explotación forestal con finalidades energéticas, químicas o madereras.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Las plantaciones en turnos cortos (*Short Rotation Forestry, SRF*) de especies forestales de crecimiento rápido bajo un sistema de manejo intensivo representan una de las fuentes de biomasa más interesantes. Las principales especies explotadas con este modelo son el chopo (*Populus spp.*), el eucalipto (*Eucalyptus spp.*) o el sauce (*Salix spp.*), con un turno de tala entre los 2 y 10 años. Por un lado, la biomasa
15 lignocelulósica es apta para producir biocarburantes en forma de combustibles líquidos o gaseosos para el transporte, y biolíquidos o combustibles líquidos destinados a usos energéticos distintos del transporte, como la producción de electricidad o calor. Por otro lado, este tipo de plantaciones forestales pueden establecerse en terrenos marginales o agrícolas excedentarios, por lo que no compiten de un modo directo con
20 el cultivo alimentario por los suelos fértiles. Sin embargo, su rendimiento con fines bioenergéticos sigue siendo objeto de mejora, ya que es todavía un factor limitante importante que las aleja de ser económica y comercialmente viables.

El rendimiento de biomasa lignocelulósica es un rasgo genético altamente complejo.
25 Constituye el resultado integrado y combinado de otros tantos rasgos complejos, cada uno de ellos controlado a su vez por varios genes. Entre estos rasgos se encuentran, por ejemplo, la altura del árbol, el diámetro del tronco, el número y área de las hojas o el número de ramas. En los últimos años, algunos equipos de investigación han abordado el problema a través de la identificación de las regiones genómicas implicadas en la regulación de estos rasgos en especies leñosas mediante el mapeo
30 de QTL (*Quantitative Trait Loci*). En este sentido, el trabajo de Rae *et al.* (Five QTL hotspots for yield in short rotation coppice bioenergy poplar: the Poplar Biomass Loci. *BMC Plant Biology* 2009, vol. 9, p. 23) realizado con una familia de 320 genotipos del híbrido *Populus trichocarpa* x *P. deltoides* cultivados en turnos cortos resulta
35 especialmente interesante. En este trabajo se identifican cinco QTLs responsables del

20% de la variación entre estos genotipos en cuanto al rendimiento de biomasa. Además se describen las correlaciones positivas existentes entre diámetro y área basales de tallos y ramas a partir del primer año y su rendimiento de biomasa en ese año y en los años siguientes hasta cinco, y entre el número de ramas silépticas que
 5 crecen en el primer año y el diámetro y área basales de tallos y ramas a partir del primer año. En la mayoría de especies leñosas en latitudes templadas, las yemas laterales no brotan durante la misma estación en que se forman. Estas yemas, las prolépticas, deben pasar el invierno para poder brotar y formar ramas en la siguiente primavera. Las yemas silépticas, en cambio, que aparecen sobre todo durante la etapa
 10 juvenil del árbol, no necesitan de los fríos invernales para su desarrollo en ramas.

Por lo tanto la ramificación siléptica no solo incrementa significativamente el crecimiento general del chopo, sobre todo durante los primeros años, sino que también se perfila como un rasgo valioso que permite predecir tempranamente el rendimiento
 15 final de biomasa de una plantación.

El gen *RAV1* (*Related to ABI3 and Viviparous 1*) pertenece a la familia de factores de transcripción RAV, caracterizada por la presencia en su estructura primaria de los dominios de unión a DNA AP2/EREBP (Apetala2/Ethylene Response Element Binding
 20 Factor) y B3 (Kagaya *et al.*, RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucleic acids research* 1999, vol. 27, p. 470-478; Yamasaki *et al.*, Solution structure of the B3 DNA binding domain of the Arabidopsis cold-responsive transcription factor RAV1. *The plant cell* 2004, vol. 16, p. 3448–3459). Según la
 25 literatura, en la planta herbácea *Arabidopsis thaliana* los genes *RAV1* (*AtRAV1*; AT1G13260) y *RAV2* (*AtRAV2/TEM2*; AT1G68840) estarían implicados en la respuesta al frío independiente de ácido abscísico (Sakuma *et al.*, DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and biophysical
 30 research communications* 2002, vol. 290, p. 998-1009) y en la respuesta a otros estímulos externos como los mecánicos (Kagaya and Hattori, Arabidopsis transcription factors, RAV1 and RAV2, are regulated by touch-related stimuli in a dose-dependent and biphasic manner. *Genes and genetic systems* 2009, vol. 84, p. 95-99). *AtRAV1* actuaría además como regulador negativo en el desarrollo de raíces laterales y hojas
 35 de la roseta así como, junto con los genes *TEMPRANILLO1* (*TEM1*; AT1G25560) y

AtRAV2/TEM2, en el tiempo de floración (Hu *et al.*, Arabidopsis RAV1 is down-regulated by brassinosteroid and may act as a negative regulator during plant development. *Cell research* 2004, vol. 61, p. 3947-3947; Castillejo and Pelaz, The balance between CONSTANS and TEMPRANILLO activities determines FT expression to trigger flowering. *Current biology* 2008, vol. 18, p. 1338-1343). También se ha descrito a *AtRAV1* como regulador positivo en el proceso de senescencia de las hojas (Woo *et al.*, The RAV1 transcription factor positively regulates leaf senescence in Arabidopsis. *Journal of experimental botany* 2010, vol. 61, p. 3947-3957). Por otro lado en tomate (*Solanum lycopersicum*), el gen *RAV2* modula la respuesta de defensa a la bacteria patógena *Ralstonia solanacearum* (Li *et al.*, Tomato RAV transcription factor is a pivotal modulator involved in the AP2/EREBP-mediated defense pathway. *Plant Physiology* 2011, vol. 156, p. 213-227). En estos trabajos se ha relacionado la función de los genes *AtRAV1* (Hu *et al.*, 2004), *TEM1* y *AtRAV2/TEM2* (Castillejo and Pelaz, 2008) de *A. thaliana* con el control de aspectos del crecimiento y el desarrollo distintos a la regulación de la ramificación, ya que la manipulación de su expresión en esta especie herbácea no causa un mayor número de ramas. Sin embargo, ninguna de estas publicaciones del arte relaciona el gen RAV1 con la regulación del desarrollo de la ramificación en ninguna especie leñosa.

La solicitud WO 2006/132616 A1 describe la función reguladora de los genes *RAV1* y *RAV2* en el silenciamiento génico en plantas. Esta patente tiene un interés genérico en la tecnología de la manipulación genética de plantas, pero no se relaciona su objeto de protección con los procesos del desarrollo controlados por dichos genes *RAV* ni con la productividad vegetal.

25

Por otra parte, la supresión de la expresión de los genes *RAV1* y *RAV2* debería inhibir la aparición de ramas y ocasionar un número menor de nudos en el tronco del árbol, con lo que se obtendrían maderas de alta calidad. La inhibición de ramificación siléptica y/o proléptica se revela así como una posible herramienta de gran valor comercial.

30

El problema que se plantea entonces en la técnica es conseguir de forma eficaz una modificación de la cantidad o calidad de la producción de madera de una planta leñosa, según se necesite, para incrementar el beneficio de sus productos derivados. La solución que propone la presente invención es modificar por procedimientos

35

técnicos la expresión de los genes *RAV1* y *RAV2* en dicha planta leñosa e influir así en su producción de ramificación siléptica y/o proléptica.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5 La presente invención describe una modificación genética aplicable a especies leñosas que permite modificar el desarrollo de ramas silépticas desde muy temprana edad de las plantas.

10 Consiste en una aplicación biotecnológica del gen *RAV1* (*Related to ABI3 and Viviparous 1*) y su homólogo *RAV2* en relación a su capacidad, cuando se modifican sus niveles de expresión, o bien la actividad de las proteínas codificadas por ellos, para aumentar o disminuir el grado de desarrollo de ramificación siléptica y/o proléptica en una especie leñosa.

15 Una primera realización de la invención es, por tanto, un procedimiento para aumentar o disminuir el desarrollo de ramificación siléptica y/o proléptica en una planta leñosa respecto a su variedad silvestre, que comprende modificar la expresión de los genes *RAV1* y/o *RAV2*, o de sus derivados funcionales. Esta modificación de la expresión se puede producir en la planta completa o bien específicamente en un tejido u órgano, y
20 puede ser permanente o temporal.

En el ámbito de la presente solicitud se entiende por “expresión de un gen” el producto proteico resultado del conjunto de mecanismos que efectúan la decodificación de la información contenida en dicho gen procesada mediante transcripción, traducción y
25 modificaciones postraduccionales a la forma final de la proteína.

Los inventores han observado que, al expresar la región codificante del gen *RAV1*, aislada de *Castanea sativa* Miller (*CsRAV1*) bajo el control de un promotor constitutivo en el híbrido *Populus tremula* × *P. alba* (clon INRA 717 1-B4), todos los individuos de
30 los diez eventos de transformación que han analizado desarrollan en un breve periodo de tiempo ramas silépticas a partir de las yemas laterales. Este periodo de tiempo es de aproximadamente un mes tras su trasplante a tierra desde cultivo *in vitro*. El desarrollo descrito no se produce, en cambio, en los chopos control sin transformar de tipo silvestre (*WT*, *wild-type*). De esta observación se deduce que la sobreexpresión

continuada del gen *CsRAV1* es responsable de la formación temprana de ramas silépticas en el chopo.

Por otro lado, dada la alta identidad de secuencia existente entre las proteínas RAV1 y
 5 RAV2 de *Populus trichocarpa* (91,9%) y, por lo tanto, su posible redundancia funcional, el aumento de la expresión de un gen *RAV2* podría tener un efecto similar sobre la ramificación que la sobreexpresión de *CsRAV1*.

El genoma del género *Populus* y en concreto de la especie *P. trichocarpa*, cuya
 10 secuencia se conoce y es de libre acceso a través de las bases de datos públicas NCBI o Phytozome, contiene cinco genes que codifican factores de transcripción RAV, dos de los cuales, a los que se han denominado *PtRAV1* y *PtRAV2*, son homólogos a los genes *AtRAV1*, *AtRAV2/TEM2* y *TEM1* arriba mencionados. Otras especies leñosas como *Eucalyptus grandis*, *Vitis vinifera*, *Citrus clementina*, *C. sinensis* o
 15 *Prunus persica*, cuyas secuencias genómicas están disponibles en las bases de datos públicas, también contienen genes homólogos a *PtRAV1*, *PtRAV2*, *AtRAV1*, *AtRAV2/TEM2* y *TEM1*.

Estos son ejemplos de polinucleótidos procedentes de otras especies vegetales que
 20 comparten un origen evolutivo común con *CsRAV1*, es decir, polinucleótidos homólogos a *CsRAV1* que codifican proteínas con funciones total o parcialmente iguales o equivalentes y que también podrían ser utilizados en su totalidad o en parte en el procedimiento de la invención. Así, un nuevo aspecto de la invención se refiere a las secuencias nucleotídicas de otros genes que codifican polipéptidos que, al igual
 25 que *CsRAV1*, contienen simultáneamente los dominios AP2 y B3 (Kagaya *et al.*, RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucleic acids research* 1999, vol. 27, p. 470-478). La identificación de los dominios AP2 y B3 se realizará mediante aplicaciones bioinformáticas tales como Basic Local Alignment
 30 Search Tool (BLAST; Altschul *et al.*, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Research* 1997, vol. 25, p. 3389-3402) o Conserved Domain Database (CCD; Marchler-Bauer *et al.*, CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acid Research* 2011, vol. 39, p. D225-D229).

El primer aspecto de la invención es una herramienta para incrementar la producción de biomasa de una plantación forestal modificada genéticamente de este modo, cuya aplicación biotecnológica presenta gran interés en diversos sectores industriales.

5 De forma que una realización es el procedimiento de la invención, en que dicha modificación de la expresión de *RAV1* y/o *RAV2* es una sobreexpresión. Dicha sobreexpresión comprende preferiblemente la introducción de una construcción génica en la planta. En una realización más preferible, dicha construcción génica comprende la fusión a un promotor de un gen que codifica un polipéptido que contiene
10 simultáneamente los dominios AP2 y B3, o su derivado funcional; preferiblemente dicho gen es *RAV1* y/o *RAV2* y más preferiblemente es *CsRAV1*. En otra realización preferible, el promotor utilizado es un promotor constitutivo, preferiblemente *CaMV35S*, *cauliflower mosaic virus 35S*, o su derivado funcional. En otra realización preferible, dicho promotor es un promotor inducible. Otra realización complementaria a las
15 anteriores es que dicho promotor sea un promotor específico de tejido u órgano.

Otra realización de la invención es el gen *CsRAV1* aislado de *Castanea sativa* Miller, que regula la producción siléptica y proléptica de la especie, y está identificado por la SEQ ID NO:1. Esta SEQ ID NO:1 tal cual reportada incluye una región 5' no traducida
20 previa al codon iniciador, de forma que una realización preferible es el *CsRAV1* identificado por una secuencia con al menos un 91,7% de identidad respecto a SEQ ID NO:1. Otra realización preferible es la proteína obtenida en la expresión de *CsRAV1* identificada por la SEQ ID NO: 2. El gen y la proteína resultante se pueden utilizar en su totalidad o en parte en los procedimientos de la presente invención.

25

Otra realización preferible más es un vector de expresión que comprende el gen *CsRAV1* y el promotor *CaMV35S*, o sus derivados funcionales. Otra realización muy preferible es una planta leñosa con al menos un polinucleótido codificante de *CsRAV1*, o sus análogos funcionales, integrado de forma estable en el genoma de las células.

30

Otra realización de la invención es el procedimiento de la invención en que dicha sobreexpresión se obtiene por al menos una mutación o una inserción de T-DNA en un gen que codifica un polipéptido que contiene simultáneamente los dominios AP2 y B3, preferiblemente dicho gen es *RAV1* y/o *RAV2*, o sus derivados funcionales.

35

En sentido inverso, una disminución de la expresión del gen *RAV1* en una especie leñosa en la que la ramificación siléptica fuera frecuente debe dar lugar a la reducción de la misma, o bien a la reducción de la ramificación proléptica al año siguiente.

- 5 Este segundo aspecto de la presente invención incluye no solo la reducción individual de la expresión de los genes *RAV1* o *RAV2* sino que puede incluir la reducción conjunta de la expresión de ambos genes. Es decir, reduciría la ramificación siléptica y/o proléptica en una especie leñosa gracias a la disminución de la expresión de los genes *RAV1* y/o *RAV2* por técnicas de silenciamiento génico, a través de la
10 producción endógena de anticuerpos específicos contra las proteínas *RAV1* y/o *RAV2* o bien mediante la introducción de mutaciones o inserciones de T-DNA.

Según lo anterior, otra realización es el procedimiento de la invención en que dicha modificación de la expresión de *RAV1* y/o *RAV2* es una disminución de la expresión.

15

- Preferiblemente, esta disminución de la expresión comprende silenciamiento génico, más preferiblemente por RNAs de interferencia, microRNAs o mensajeros antisentido. Otra realización más es que dicha disminución comprenda la introducción de una construcción génica a la planta, y preferiblemente que dicha construcción génica
20 comprenda la fusión a un promotor de un gen que codifica un polipéptido que contiene simultáneamente los dominios AP2 y B3, o su derivado funcional. Dicho gen es preferiblemente *RAV1* y/o *RAV2*. Una realización más preferible es que dicho promotor sea un promotor constitutivo, preferiblemente CaMV35S, *cauliflower mosaic virus 35S*, o su derivado funcional. Otra realización preferible es que dicho promotor sea
25 inducible. Otra realización complementaria a las anteriores, es que el promotor sea un promotor específico de tejido u órgano.

- Otra realización preferible de la invención es que esta disminución de la expresión comprenda la producción endógena de al menos un anticuerpo específico contra una
30 proteína que contenga simultáneamente los dominios AP2 y B3; preferiblemente dicha proteína es *RAV1* y/o *RAV2*.

Otra realización preferible es que esta disminución de la expresión comprenda al menos una mutación o una inserción de T-DNA en un gen que codifica un polipéptido

que contiene simultáneamente los dominios AP2 y B3; preferiblemente dicho gen es RAV1 y/o RAV2 o sus derivados funcionales.

5 Este segundo aspecto de la invención supone una herramienta para reducir el número de nudos en el tronco en especies leñosas de interés maderero modificadas genéticamente de este modo.

10 Las técnicas para la obtención de construcciones y plantas transgénicas, así como el manejo de las herramientas bioinformáticas de análisis a las que se hace referencia en la presente solicitud pertenecen al ámbito de la ingeniería genética, el cultivo *in vitro* y la bioinformática y son ampliamente conocidas por los expertos en la materia.

15 La modificación genética de la invención, ya sea en un sentido o en otro, es potencialmente aplicable a cualquier genotipo de una especie leñosa, por lo que permite aprovechar las características adaptativas de dicho genotipo a un determinado hábitat.

20 La presente invención tiene aplicaciones, por tanto, en diversos sectores industriales. El incremento del rendimiento de biomasa de plantaciones forestales en turnos cortos puede tener interés para la industria energética interesada en la utilización de biomasa para la producción de biocombustibles, para la industria química interesada en la elaboración de productos químicos a partir de esta biomasa, así como para las industrias selvícolas e industrias del papel.

25 De forma que una realización más de la invención es una célula de planta leñosa con la expresión de RAV1 y/o RAV2 modificada. Una realización preferible más es una planta leñosa transgénica con la expresión de RAV1 y/o RAV2 modificada. Otra realización es el producto vegetal obtenido a partir de esa planta leñosa transgénica, preferiblemente un biolíquido y más preferiblemente un biocarburante.

30

Por otra parte, la reducción de la ramificación siléptica y/o proléptica y, por lo tanto, del número de nudos en el tronco de una especie leñosa también puede tener interés para las industrias selvícolas y madereras interesadas en el aprovechamiento forestal maderable.

35

Así, otra realización muy preferible es la madera obtenida a partir de una planta leñosa transgénica con la expresión de RAV1 y/o RAV2 modificada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 **Figura 1:** Abundancia relativa del transgén *CsRAV1* en diez transformantes independientes del híbrido *Populus tremula* × *P. alba* (clon INRA 717 1-B4). Los transformantes independientes, o eventos, se designan como CsRAV1 OE (*overexpressor*) seguido del símbolo # y un número. Los valores representan el promedio de tres réplicas técnicas ±SD (desviación estándar).

10

Figura 2: Imágenes de (A) el evento CsRAV1 OE #59 de la figura 1 de *Populus tremula* × *P. alba* (clon INRA 717 1-B4), donde se aprecia el desarrollo de ramas silépticas a partir de las yemas laterales, señaladas con flechas, acompañada de una imagen general de dicho evento; y (B) un individuo *Populus tremula* × *P. alba* (clon
15 INRA 717 1-B4) de tipo silvestre en el que no se produce este desarrollo. Las plantas tienen una edad de 35 días, contados desde el trasplante a tierra a partir del cultivo *in vitro*.

Figura 3: Abundancia relativa de los genes *PtaRAV1* (barras con rayas diagonales) y
20 *PtaRAV2* (barras con rayas horizontales) en ocho transformantes independientes del híbrido *Populus tremula* × *P. alba* (clon INRA 717 1-B4). Los transformantes independientes, o eventos, se designan como PtaRAV1&2 KD (*knock-down*) seguido del símbolo # y un número. Los valores representan el promedio de tres réplicas técnicas ±SD (desviación estándar).

25

EJEMPLOS

Con la intención de mostrar la presente invención de un modo ilustrativo aunque en ningún modo limitante, se aportan los siguientes ejemplos.

30 **Ejemplo 1: Sobreexpresión de RAV1 y RAV2 en chopo**

La región codificante del gen *RAV1*, aislada a partir de tallos de *Castanea sativa* Miller (*CsRAV1*) se clonó en el vector binario pGWB2 (Nakagawa *et al.*, Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusión genes for plant transformation. *Journal of bioscience and bioengineering* 2007, vol.
35 104, p. 34-41) portador del promotor constitutivo CaMV35S (*cauliflower mosaic virus*

35S). Esta construcción se utilizó para transformar vía infección con *Agrobacterium tumefaciens* (cepa GV3101/pMP90), explantos obtenidos de plántulas jóvenes de 4 semanas cultivadas *in vitro* del híbrido *Populus tremula* × *P. alba* (clon INRA 717 1-B4). En todos los pasos de cultivo *in vitro* los medios se prepararon con 1X Murashige & Skoog 1B (Duchefa), 2% sacarosa (Merck), 0,7 o 0,8% agar (explantos y callos o brotes y plántulas, respectivamente; BD Bacto), y se ajustaron a pH 5,8 con 0,1 N de hidróxido de sodio. Tras dos días de cultivo en un medio suplementado con 0,01 mg/L tidiazurón (Sigma-Aldrich) y 1 mg/L ácido 2,4-diclorofenoxiacético (Sigma-Aldrich) para inducir la desdiferenciación celular en estos explantos, se infectaron sumergiéndolos durante 15 minutos en un cultivo 2YT (16 g/L triptona BD Bacto, 10 g/L extracto de levadura BD Bacto, 5 g/L cloruro de sodio Merck) de *A. tumefaciens* con una densidad óptica de 0,05 ($\lambda=660$). Los explantos así infectados siguieron cultivándose en el mismo medio durante dos días más. A continuación, se transfirieron a un medio suplementado con 0,02 mg/L tidiazurón, 1 mg/L ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 50 mg/L kanamicina sulfato (Roche), 20 mg/L higromicina B (Duchefa) y 250 mg/L cefotaxima (Duchefa), y se cultivaron hasta obtener callos de un tamaño de 0,5 cm³. Estos callos se transfirieron entonces a un medio suplementado con 0,004 mg/L tidiazurón, 0,05 mg/L ácido naftalenacético (Sigma-Aldrich), 50 mg/L kanamicina sulfato, 20 mg/L higromicina B y 250 mg/L cefotaxima para que sus células reiniciaran la diferenciación y se desarrollaran en brotes. Por último, cuando estos brotes alcanzaron una altura de 1 cm, se diseccionaron y se enraizaron en un medio suplementado con 0,5 mg/L ácido indolacético (Sigma-Aldrich), 50 mg/L kanamicina sulfato, 20 mg/L higromicina B y 125 mg/L cefotaxima para generar plántulas de chopo completas. Una vez analizadas, se seleccionaron las plántulas que expresaban el transgén (Figura 1), se trasplantaron a tierra y se cultivaron en invernadero en condiciones de día largo, 16 horas de luz por 8 horas oscuridad, a una temperatura de 20±2°C. En estas condiciones y en el periodo de entre 30 y 40 días, cuando las plantas alcanzaron una altura de entre 30 y 40 cm, empezaron a desarrollar ramificación siléptica. No lo hicieron en cambio, las plantas control no transgénicas (Figura 2).

Ejemplo 2: Análisis por qRT-PCR de la expresión del transgén

Antes de transferirlas a tierra, las plántulas del Ejemplo 1 se analizaron mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) para detectar y cuantificar la expresión del transgén integrado en su genoma nuclear y descartar aquellos eventos en los que el

transgén no se expresara. Los métodos empleados para la extracción de RNA total, para la síntesis de cDNA, así como la composición y las condiciones en que se realizaron las reacciones de qRT-PCR se detallan en Ibañez *et al.*, Overall alteration of circadian clock gene expression in the chestnut cold response. *PLoS ONE* 2008, vol. 3, e3567 (doi: [10.1371/journal.pone.0003567](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003567)). El RNA usado para llevar a cabo dicho análisis se obtuvo de hojas de plantas jóvenes de 2 meses cultivadas *in vitro*. Los cebadores usados para detectar la expresión de *CsRAV1* fueron los identificados por las SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4. El análisis de la abundancia relativa del transgén *CsRAV1* en individuos de tipo silvestre representa el control negativo. Se utilizó como referencia el RNA ribosómico 18S usando los cebadores identificados por las SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6 descritos en Böhlenius *et al.* (*CO/FT* regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. *Science* 2006, vol. 312, p. 1040-1043).

15 **Ejemplo 3: Disminución de la expresión de *RAV1* y/o *RAV2* en chopo**

Con el objeto de disminuir la expresión de los genes *RAV1* y *RAV2*, se generó una construcción RNA de interferencia en horquilla (*hpiRNA*) a partir de la secuencia de *RAV1* de *Populus alba* -homólogo al gen *CsRAV1*- en el vector binario pHELLSGATE12 (Helliwell and Waterhouse, Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. *Methods* 2003, vol. 30, p. 289-295), portador del promotor constitutivo CaMV35S. Concretamente, para realizar esta construcción se utilizó la región comprendida entre los dominios de unión a DNA AP2/EREBP y B3 del gen *RAV1* de *P. alba*, cuya secuencia se especifica en la SEQ ID NO:7. Dado el elevado grado de homología global existente entre las secuencias de DNA codificantes de los genes *RAV1* (NCBI Reference Sequence XM_002315922.1) y *RAV2* (XM_002311402.1) de *P. trichocarpa* (91,1%), la construcción se diseñó para silenciar la expresión conjunta de los genes endógenos *RAV1* y *RAV2* y evitar así un posible efecto parcial sobre la inhibición en el desarrollo de ramas. Esta construcción se utilizó para transformar vía infección con *Agrobacterium tumefaciens* (cepa GV3101/pMP90), explantos obtenidos de plántulas jóvenes de 4 semanas cultivadas *in vitro* del híbrido *Populus tremula* × *P. alba* (clon INRA 717 1-B4). En todos los pasos de cultivo *in vitro* los medios se prepararon con 1X Murashige & Skoog 1B (Duchefa), 2% sacarosa (Merck), 0,7 ó 0,8% agar (explantos y callos o brotes y plántulas, respectivamente; BD Bacto), y se ajustaron a pH 5,8 con 0,1 N de hidróxido de sodio. Tras dos días de cultivo en un medio suplementado con 0,01 mg/L tiazurón (Sigma-Aldrich) y 1 mg/L

ácido 2,4-diclorofenoxiacético (Sigma-Aldrich) para inducir la desdiferenciación celular en estos explantos, se infectaron sumergiéndolos durante 15 minutos en un cultivo 2YT (16 g/L triptona BD Bacto, 10 g/L extracto de levadura BD Bacto, 5 g/L cloruro de sodio Merck) de *A. tumefaciens* con una densidad óptica de 0,05 ($\lambda=660$). Los explantos así infectados siguieron cultivándose en el mismo medio durante dos días más. A continuación, se transfirieron a un medio suplementado con 0,02 mg/L tidiazurón, 1 mg/L ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 50 mg/L kanamicina sulfato (Roche), 20 mg/L higromicina B (Duchefa) y 250 mg/L cefotaxima (Duchefa), y se cultivaron hasta obtener callos de un tamaño de 0,5 cm³. Estos callos se transfirieron entonces a un medio suplementado con 0,004 mg/L tidiazurón, 0,05 mg/L ácido naftalenacético (Sigma-Aldrich), 50 mg/L kanamicina sulfato, 20 mg/L higromicina B y 250 mg/L cefotaxima para que sus células reiniciaran la diferenciación y se desarrollaran en brotes. Por último, cuando estos brotes alcanzaron una altura de 1 cm, se diseccionaron y se enraizaron en un medio suplementado con 0,5 mg/L ácido indolacético (Sigma-Aldrich), 50 mg/L kanamicina sulfato, 20 mg/L higromicina B y 125 mg/L cefotaxima para generar plántulas de chopo completas. Una vez analizadas, se seleccionaron las plántulas en las que la expresión de los genes endógenos *PtaRAV1* y *PtaRAV2* se hubiera visto disminuida respecto a la expresión de dichos genes en las plántulas de tipo silvestre (Figura 3). Estas plántulas se trasplantaron a tierra y se cultivaron en invernadero en condiciones de día largo, 16 horas de luz por 8 horas oscuridad, y a una temperatura de 20±2°C. Los resultados de la ramificación proléptica están por obtener tras el invierno 2011-2012. La hipótesis lógica es que estas plantas deben desarrollar un número menor de ramas y, por tanto, el número de nudos en la madera obtenida a partir de sus tallos será también menor incrementando así el valor comercial de la madera.

Ejemplo 4: Análisis por qRT-PCR de la expresión de *PtaRAV1* y *PtaRAV2*

Antes de transferirlas a tierra, las plántulas que se obtuvieron en el Ejemplo 3 se analizaron mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) para cuantificar la expresión de los genes endógenos *PtaRAV1* y *PtaRAV2* y seleccionar aquellas en las que la expresión de los mismos se hubiera visto disminuida respecto a su expresión en plántulas silvestres. Los métodos empleados para la extracción de RNA total, para la síntesis de cDNA, así como la composición y las condiciones en que se realizaron las reacciones de qRT-PCR se detallan en Ibáñez *et al.*, Overall alteration of circadian clock gene expression in the chestnut cold response. *PLoS ONE* 2008, vol. 3, e3567

(doi: [10.1371/journal.pone.0003567](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003567)). El RNA usado para llevar a cabo dicho análisis se obtuvo de hojas de plantas jóvenes de 2 meses cultivadas *in vitro*, sometidas a una temperatura de 4°C durante 3 horas. Los cebadores usados para detectar la expresión de *PtaRAV1* fueron los identificados con las SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:9; para
5 *PtaRAV2* los cebadores fueron los identificados con la SEQ ID NO:10 y la SEQ ID NO:11. El análisis de la abundancia relativa de los genes *PtaRAV1* y *PtaRAV2* en individuos de tipo silvestre representa el control positivo y el calibrador. Como referencia se utilizó el RNA ribosómico 18S, usando los cebadores identificados por
10 las SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6 descritos en Böhlenius *et al.* (CO/FT regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. *Science* 2006, vol. 312, p. 1040-1043).

REIVINDICACIONES

1. El gen CsRAV1 aislado de *Castanea sativa Miller* identificado por la SEQ ID NO:1, capaz de aumentar o disminuir el desarrollo de ramificación siléptica y/o proléptica en una planta leñosa respecto a la variedad silvestre de dicha planta.
5
2. El CsRAV1 aislado de *Castanea sativa Miller* según la reivindicación 1, identificado por una secuencia con al menos un 91,7% de identidad respecto a SEQ ID NO:1.
3. La proteína obtenida en la expresión de CsRAV1 identificada por la SEQ ID NO: 2.
4. Vector de expresión que comprende el gen CsRAV1 y el promotor CaMV35S, o sus derivados funcionales.
10
5. Planta leñosa con al menos un polinucleótido codificante de CsRAV1, o sus análogos funcionales, integrado de forma estable en el genoma de las células.
6. Célula de planta leñosa con la expresión de RAV1 y/o RAV2 modificada.
7. Planta leñosa transgénica con la expresión de RAV1 y/o RAV2 modificada.
15

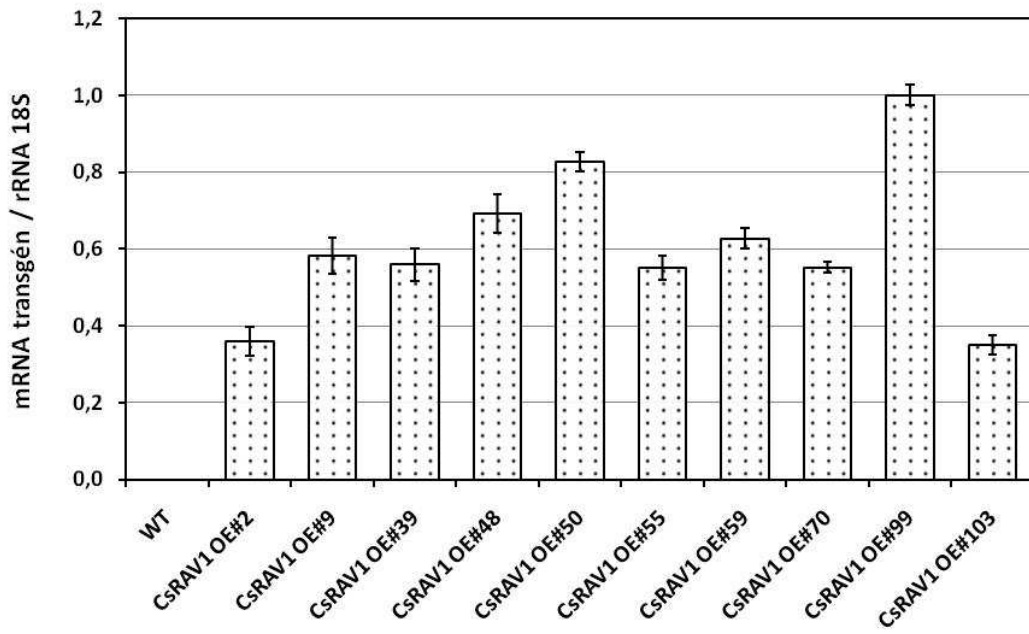


Fig. 1

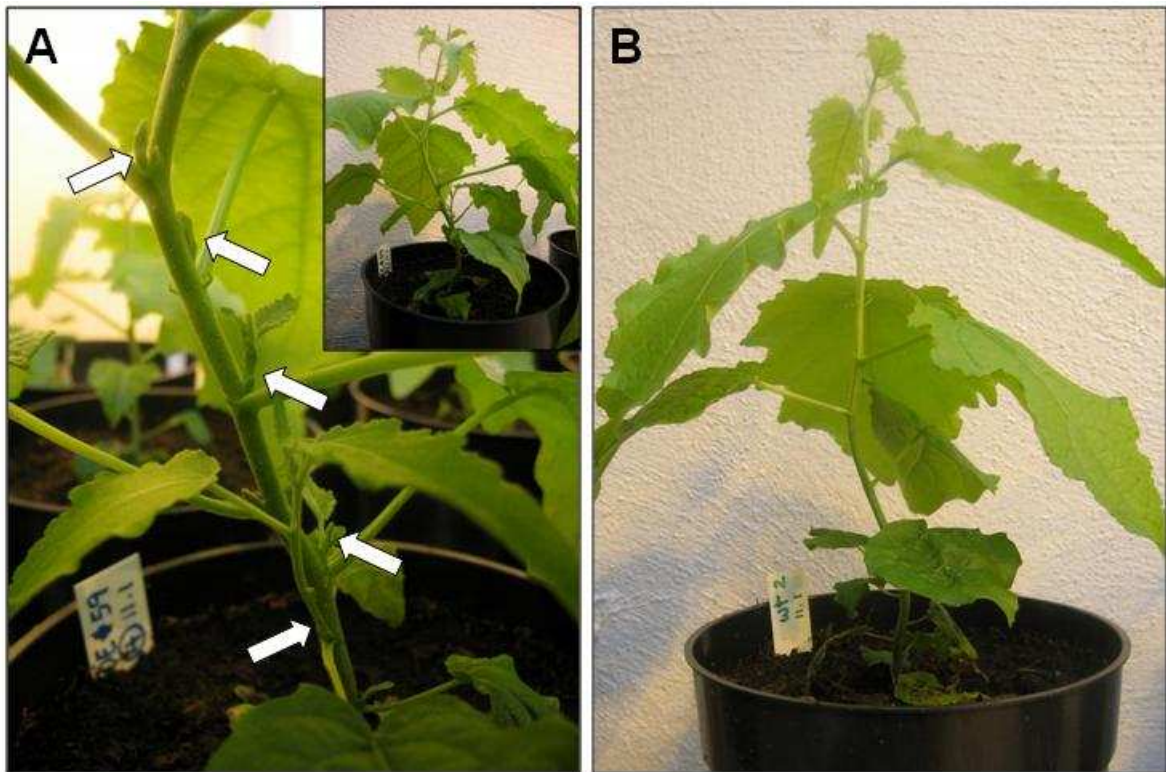


Fig. 2

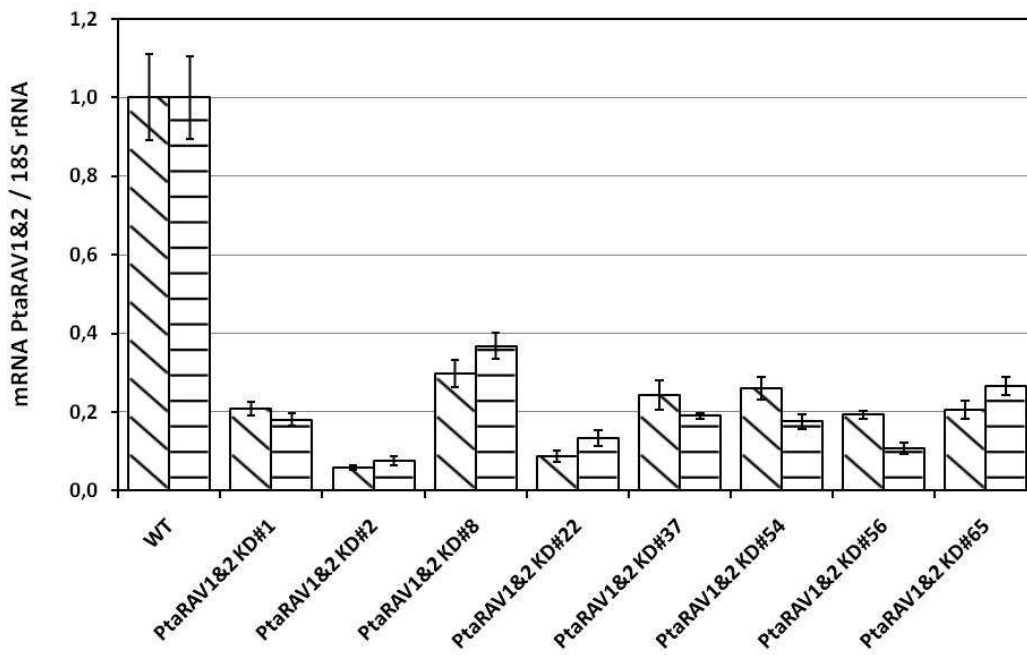


Fig. 3



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201131186

②② Fecha de presentación de la solicitud: 13.07.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	KIM S. Y. et al., "Identification of a CaRAV1 possessing an AP2/ERF and B3 DNA-binding domain RT from pepper leaves infected with Xanthomonas axonopodis pv. glycines 8ra by RT differential display" Biochim. Biophys. Acta (2005), 1729(3):141-146. Todo el documento.	1-41
X	SOHN K.H. et al., "Expression and functional roles of the pepper pathogen-induced RT transcription factor RAV1 in bacterial disease resistance, and drought and RT salt stress tolerance" Plant Mol. Biol. (2006), 61(6):897-915. Todo el documento.	1-41
X	WO 2005001050 A2 (ARBORGEN LLC) 06.01.2005, todo el documento.	1-41
X	WO 2006132616 A1 (UNIV SOUTH CAROLINA) 14.12.2006, todo el documento.	1-41
X	WO 0190343 A2 (COLD SPRING HARBOR LAB) 29.11.2001, todo el documento.	1-41

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
02.12.2011

Examinador
M. Hernández Cuellar

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N15/82 (2006.01)

C12N15/29 (2006.01)

C07K14/415 (2006.01)

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

C12N, C07K

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

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 02.12.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-37	SI
	Reivindicaciones 38-41	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-41	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	KIM S. Y. et al., "Identification of a CaRAV1 possessing an AP2/ERF and B3 DNA-binding domain RT from pepper leaves infected with <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines 8ra</i> by RT differential display" <i>Biochim. Biophys. Acta</i> (2005), 1729(3):141-146. Todo el documento.	
D02	SOHN K.H. et al., "Expression and functional roles of the pepper pathogen-induced RT transcription factor RAV1 in bacterial disease resistance, and drought and RT salt stress tolerance" <i>Plant Mol. Biol.</i> (2006), 61(6):897-915. Todo el documento.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención consiste en un procedimiento para aumentar o disminuir el desarrollo de la ramificación siléptica y/o proléptica en una planta leñosa que consiste en el control de la expresión del gen RAV1 (Related to ABI3 and Viviparous 1) y su homólogo RAV2 o bien la actividad de las proteínas que codifican, para incrementar o disminuir el desarrollo de ramas silépticas y/o prolépticas en especies leñosas. Mediante la modificación de la expresión de dichos genes es posible aumentar la producción de biomasa de una plantación de especies leñosas, o bien reducir el número de nudos en el tronco de especies leñosas de interés maderero. Otros aspectos de la invención comprenden el gen CsRAV1 aislado de *Castanea sativa* Miller y la proteína que codifica.

1.- NOVEDAD

Las reivindicaciones 1-37 no se encuentran anticipadas en el estado de la técnica y en consecuencia, en opinión de esta Oficina, se consideran nuevas en tanto que cumplen con el requisito de novedad recogido en el Art. 6.1 LP.

Las reivindicaciones 30-41 son reivindicaciones de producto del tipo "product by process". El procedimiento mediante el cual se obtienen estos productos no incorpora ninguna característica técnica nueva a los mismos y por tanto, estos son indistinguibles (es decir, iguales) a cualquiera de los biolíquidos, biocarburantes o maderas producidos a partir de plantas leñosas encontrados en la naturaleza. En este sentido, en opinión de esta Oficina, las reivindicaciones 30-41 no cumplen el requisito de novedad establecido en el Art. 6.1 LP.

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA

Tal y como se encuentran redactadas las reivindicaciones de procedimiento de la presente solicitud, el problema técnico planteado en las mismas se identifica como la modificación de la expresión de los genes RAV1 y su homólogo RAV2. En el caso de que esta modificación se trate de una sobreexpresión de los genes, la solución técnica aportada por la invención consiste en la fusión de dichos genes a promotores o bien la introducción de mutaciones. En el caso de que la modificación se trate de la disminución de la expresión, la solución aportada por la invención consiste en la fusión de dichos genes a promotores, silenciamiento génico con RNAs de interferencia, microRNAs o mensajeros antisentido y producción endógena de anticuerpos contra las proteínas codificadas por dichos genes. El conjunto de las soluciones aportadas en la invención se encuadra dentro de las técnicas rutinarias habitualmente usadas en el campo de la biotecnología vegetal. En este sentido resulta obvio que experto en la materia afrontaría el problema técnico recurriendo a tales soluciones con unas expectativas razonables de éxito. En consecuencia, en opinión de esta Oficina, las reivindicaciones de procedimiento 1-14 y 20-35 no cumplen el requisito de actividad inventiva establecido en el Art. 8.1 LP.

Los documentos D01 y D02 se consideran relevantes en cuanto a la actividad inventiva de la reivindicación 15 referente al gen CsRAV1 aislado de *Castanea sativa* Miller identificado con la secuencia SEQ ID NO: 1. El documento D01 describe el aislamiento del gen CaRAV1 de *Capsicum annuum* cv. Bukang así como su expresión en pimiento picante Early Calwonder-30R. Por su parte el documento D02 se refiere a la expresión de CaRAV1 en protoplastos de *Arabidopsis* y en la epidermis del pimiento. La secuencias de CaRAV1 asociadas a estos documentos recuperadas en la base de datos EMPL presentan casi un 65% de identidad con SEQ ID NO: 1. En la figura 1 de ambos documentos se proporcionan alineaciones de las secuencias derivadas de aminoácidos y se indica el alto grado de identidad que existe entre los genes RAV de diferentes especies, especialmente en las zonas correspondientes al dominio de unión a DNA AP2/ERF del extremo N-terminal y al dominio B3 del extremo C-terminal. A la vista de la información técnica proporcionada en estos documentos en este sentido, el aislamiento de un gen homólogo a los genes RAV descritos en estos documentos, así como el desarrollo del vector y plantas derivadas del mismo resultaría obvio para un experto en la materia. En consecuencia, en opinión de esta Oficina, las reivindicaciones 15-19 relativas al gen, la proteína, vector de expresión y planta no cumplen con el requisito de actividad inventiva recogido en el Art. 8.1 LP.