

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 018 632**

21 Número de solicitud: 202330933

51 Int. Cl.:

C12N 15/82

(2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

14.11.2023

43 Fecha de publicación de la solicitud:

16.05.2025

71 Solicitantes:

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (ESTUDI GENERAL)
(100.00%)

Avda. Blasco Ibáñez, 13
46010 Valencia (Valencia) ES

72 Inventor/es:

ROS PALAU, Roque Luis;
MUÑOZ BERTOMEU, Jesús;
CASATEJADA ANCHEL, Rubén;
TORRES MONCHO, Alejandro;
ROSA TÉLLEZ, Sara Virginia y
ALCÁNTARA ENGUÍDANOS, Andrea

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico

54 Título: **Planta enriquecida en aminoácidos, proteínas y almidón**

57 Resumen:

Planta enriquecida en aminoácidos, proteínas y almidón.

Planta o célula vegetal genéticamente modificada para sobre-expresar un gen que codifica para la proteína D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (PGDH1), en la que la secuencia aminoacídica de dicha proteína PGDH1 tiene una identidad de al menos 65% respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1 y en la que dicha planta no es de la especie *Arabidopsis thaliana*. Constructo o vector de expresión recombinante y procedimiento que comprende transformar plantas silvestres o células vegetales con el vector de expresión recombinante. Usos de la planta, célula vegetal, constructo, o vector para la producción de proteínas, aminoácidos y/o almidón.

ES 3 018 632 A1

DESCRIPCIÓN

PLANTA ENRIQUECIDA EN AMINOÁCIDOS, PROTEÍNAS Y ALMIDÓN

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se relaciona de forma general con el campo de las plantas genéticamente modificadas. En particular, la presente invención se relaciona con plantas genéticamente modificadas para sobre-expresar un gen que codifica para la proteína D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (PGDH1). Dichas plantas presentan un mayor contenido de aminoácidos, proteínas y almidón respecto a plantas sin transformar.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los alimentos de origen vegetal son considerados como saludables y pueden ayudar a prevenir enfermedades, pero carecen de contenido proteico suficiente para mantener una dieta equilibrada en humanos. Las plantas de cultivo y especialmente los cereales son pobres en proteínas. En el grano de maíz, por ejemplo, el contenido en proteínas es solo del 10%. Este bajo contenido proteico se ve agravado por el cambio climático ya que se ha observado que un aumento de la concentración de CO₂ incrementa el contenido en carbohidratos en detrimento del contenido proteico de los vegetales (Mizokami et al. (2019); Myers et al. (2019)). Esta carencia de contenido proteico también aparece en especies ganaderas, donde los alimentos de origen vegetal suministrados se enriquecen mediante la adición de aminoácidos, lo que encarece los gastos en nutrición del ganado por parte de los ganaderos.

Además, los alimentos de origen vegetal tienen ventajas frente a los de origen animal. El consumo excesivo de productos de origen animal, especialmente carnes rojas y carnes procesadas, fuente tradicional de incorporación de proteínas a la dieta humana, puede tener efectos negativos sobre la salud, por aumentar el riesgo de padecer enfermedades como diabetes, cardiopatías, accidentes cerebrovasculares y cáncer.

Por otra parte, la producción de proteínas de origen animal es mucho más cara que la producción de proteínas de origen vegetal y tiene un coste medioambiental mucho mayor. También es una de las principales causas de la degradación del suelo y de los recursos hídricos.

El aumento del valor nutricional de las plantas mediante el incremento de su contenido proteico o de carbohidratos es objeto de gran interés, concretamente para la industria agroalimentaria. Hay una intensa labor de investigación en la búsqueda de fuentes alternativas de proteínas. Los productos vegetales con alto contenido proteico o en carbohidratos pueden ser la base para desarrollar nuevos alimentos con valor nutricional añadido que puedan ser enriquecidos en uno u otro metabolito según las necesidades.

El desarrollo de plantas con mayor eficiencia en la biosíntesis de proteínas es muy necesario puesto que puede incrementar la producción de proteínas a bajo coste económico y medioambiental a partir de cereales y otros cultivos de plantas pobres en proteínas, además de contribuir a la mejora de la salud reduciendo la necesidad de un consumo excesivo de productos de origen animal. También puede ayudar a mejorar la nutrición de poblaciones vulnerables con poco acceso a productos de origen animal y con problemas de malnutrición (grupos en los que su alimentación se basa únicamente en cereales).

Los humanos y otros animales monogástricos no pueden sintetizar los denominados aminoácidos esenciales, que deben ser suministrados por la dieta. De entre ellos los más limitantes en las plantas y especialmente en los cereales con respecto a las necesidades nutricionales de humanos y animales son lisina, metionina, treonina y triptófano, lo que repercute negativamente en la calidad nutricional de las plantas. El desarrollo de plantas con mayor contenido en algunos de estos aminoácidos, como lisina, metionina y treonina es muy necesario.

Las plantas genéticamente modificadas que han sido desarrolladas hasta la fecha no han conseguido resultados suficientemente satisfactorios. En algunos casos, las plantas genéticamente modificadas presentaban alteraciones no deseables en su desarrollo.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

A efectos de la presente invención, "ADN complementario (ADNc)" se refiere a una molécula de ADN de doble cadena, en la que una de sus hebras constituye una secuencia totalmente complementaria al ARN mensajero a partir del cual se ha sintetizado. Se utiliza en transformación de plantas, debido a que, dada la naturaleza de su síntesis, carece de intrones.

A efectos de la presente invención, “planta con metabolismo C₃” se refiere a una planta cuya vía metabólica para la fijación del carbono durante la fotosíntesis es una vía de 3 carbonos. En la vía de 3 carbonos, el CO₂ se fija directamente en el ciclo de Calvin, sin que se produzcan fijaciones previas. El primer producto estable en el que queda fijado el carbono en el ciclo de Calvin es el 3-fosfoglicerato, un compuesto de 3 carbonos, lo que explica la denominación de metabolismo C₃.

A efectos de la presente invención, “planta con metabolismo C₄” se refiere a una planta cuya vía metabólica para la fijación del carbono durante la fotosíntesis es una vía de 4 carbonos o vía de Hatch-Slack. En la vía de 4 carbonos, previa a la carboxilación de la ribulosa-1,5-bisfosfato catalizada por la enzima Rubisco, que produce 3-fosfoglicerato de tres átomos de carbono, se produce una primera carboxilación del ácido fosfoenolpirúvico (PEP) que origina como producto estable primario un ácido dicarboxílico de cuatro átomos de carbono (ácido málico o ácido aspártico). Este tipo de plantas evita al máximo la pérdida de CO₂ en la fotorrespiración.

El problema existente en el estado de la técnica consiste en proporcionar una planta genéticamente modificada con una eficiencia mejorada en la biosíntesis de aminoácidos, proteínas y almidón.

Adicionalmente, de forma particular, el problema existente en el estado de la técnica consiste en proporcionar una planta genéticamente modificada con una eficiencia mejorada en la biosíntesis de aminoácidos, proteínas y almidón en condiciones de elevado CO₂ ambiental.

La presente invención soluciona ambos problemas técnicos por medio de una planta genéticamente modificada para sobre-expresar un gen que codifica para una proteína D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (PGDH1; EC 1.1.1.95), una proteína de la ruta fosforilativa de la biosíntesis de serina.

En la ruta fosforilativa de la biosíntesis de serina participan tres enzimas que catalizan la conversión del D-3-fosfoglicerato en serina: D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (PGDH1; EC 1.1.1.95), fosfoserina aminotransferasa (PSAT; EC 2.6.1.52) y fosfoserina fosfatasa (PSP; EC 3.1.3.3). En *Arabidopsis thaliana* hay tres isoformas de la proteína PGDH: isoforma PGDH1, codificada por el gen *PGDH1* (también denominado *EDA9*), isoforma PGDH2,

codificada por el gen *PGDH2* (también denominado *PGDH*) e isoforma PGDH3, codificada por el gen *PGDH3* (también denominado *3-PGDH*). Las tres isoformas presentan un porcentaje de identidad a nivel aminoacídico superior al 74%.

- 5 La presente invención proporciona una planta, no constitutiva de Variedad Vegetal, o una célula vegetal genéticamente modificada, para sobre-expresar un gen que codifica para la proteína D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (PGDH1), en la que la secuencia aminoacídica de dicha proteína PGDH1 tiene una identidad de al menos 65% respecto a la secuencia de la proteína PGDH1 de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 1) y en la que dicha planta no es
10 de la especie *Arabidopsis thaliana*.

La sobre-expresión del gen que codifica para la proteína D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (PGDH1) conduce a un aumento significativo del contenido en aminoácidos, proteínas y almidón en las plantas así modificadas. La proteína PGDH1 es una proteína de la ruta
15 fosforilativa de biosíntesis de serina, que es una ruta general en todas las plantas. Por tanto, la presente invención proporciona una solución para incrementar el contenido de aminoácidos, proteínas y almidón en numerosas especies de interés agronómico, incluidos los cereales. La presente invención es especialmente relevante en las nuevas condiciones de cambio climático donde se esperan altos niveles de CO₂ ambiental. De hecho, una
20 ventaja muy destacable de la presente invención es que consigue aumentar la producción de proteínas y almidón en condiciones de crecimiento de las plantas en las que existan elevadas concentraciones de CO₂. El aumento en la producción de proteínas obtenido es un resultado inesperado puesto que un aumento en la concentración de CO₂ incrementa el contenido en almidón en las plantas a la par que reduce su contenido proteico. En dichas
25 condiciones de elevado CO₂, la presente invención también consigue aumentar significativamente la mayoría de los aminoácidos esenciales (leucina, isoleucina, fenilalanina, valina, treonina, lisina y metionina) en las plantas. Este aumento en la producción de aminoácidos esenciales es un resultado inesperado en vista de que, como se ha indicado anteriormente, un aumento en la concentración de CO₂ reduce el contenido
30 proteico de las plantas (Myers et al. (2019)).

Los resultados obtenidos por los inventores demuestran que la presente invención dirige el metabolismo vegetal hacia un mayor contenido de algunos aminoácidos esenciales y a su vez aumenta la producción generalizada de proteínas y carbohidratos, y no solo a una
35 mayor producción de una proteína o de un aminoácido específico. En principio pues, la

presente invención comprende cualquier planta ya que, la ruta fosforilativa de biosíntesis de serina, en la que está implicada PGDH1, es una ruta general a todas ellas.

Otra ventaja de la presente invención es que, en contraste con otras estrategias del estado de la técnica, no hay reducción del crecimiento de la planta de la invención.

De todo lo anterior se deriva que la presente invención evita el efecto del cambio climático sobre la calidad nutricional de los cultivos y aumenta la producción de proteínas con bajo coste económico y medioambiental. Por otro lado, la presente invención permite reducir el consumo de proteínas de origen animal en humanos y en especies ganaderas.

La **Tabla 1** muestra información sobre las secuencias SEQ ID NO: 1-9.

Tabla 1

Secuencia	Número de secuencia
Secuencia aminoacídica de la proteína PGDH1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	SEQ ID NO: 1
Secuencia aminoacídica del dominio catalítico de la proteína PGDH1 de <i>Arabidopsis thaliana</i> que corresponde a los aminoácidos 61 a 348 de dicha proteína	SEQ ID NO: 2
Secuencia aminoacídica que corresponde a los aminoácidos 127 a 140 de la proteína PGDH1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	SEQ ID NO: 3
Secuencia aminoacídica que corresponde a los aminoácidos 147 a 158 de la proteína PGDH1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	SEQ ID NO: 4
Secuencia aminoacídica que corresponde a los aminoácidos 192 a 204 de la proteína PGDH1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	SEQ ID NO: 5
Secuencia aminoacídica que corresponde a los aminoácidos 423 a 433 de la proteína PGDH1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	SEQ ID NO: 6
Secuencia aminoacídica que corresponde a los aminoácidos 532 a 544 de la proteína PGDH1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	SEQ ID NO: 7
Secuencia nucleotídica del ADN complementario del gen <i>PGDH1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	SEQ ID NO: 8
Secuencia nucleotídica del gen <i>PGDH1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	SEQ ID NO: 9

La secuencia nucleotídica del ADN complementario (ADNc) del gen *PGDH1* de *Arabidopsis thaliana* es la secuencia SEQ ID NO: 8. El número de referencia la secuencia nucleotídica del gen *PGDH1* de *Arabidopsis thaliana* en la base de datos "The Arabidopsis Information Resource", que es la base de datos de referencia para *Arabidopsis thaliana*, es AT4G34200.

- 5 La secuencia SEQ ID NO: 8 corresponde a dicha secuencia con número de referencia AT4G34200 en "The Arabidopsis Information Resource".

La secuencia nucleotídica del gen *PGDH1* de *Arabidopsis thaliana* codifica para la proteína PGDH1, cuya secuencia aminoacídica es la secuencia SEQ ID NO: 1. El número de referencia de la secuencia aminoacídica de la proteína PGDH1 de *Arabidopsis thaliana* en "National Center for Biotechnology Information" es NP_195146.1. La secuencia SEQ ID NO: 1 corresponde a dicha secuencia con número de referencia NP_195146.1 en "National Center for Biotechnology Information".

- 15 El dominio catalítico, responsable de la actividad catalítica D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa de la proteína PGDH1 de *Arabidopsis thaliana*, corresponde a los aminoácidos 61 a 348 de dicha proteína. La secuencia aminoacídica de dicho dominio catalítico está representada por la secuencia SEQ ID NO: 2.

- 20 En una realización preferente de la planta o de la célula vegetal de la invención, la secuencia aminoacídica de la proteína PGDH1 tiene una identidad respecto a la secuencia de la proteína PGDH1 de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 1) de al menos 66%, de al menos 67%, de al menos 68%, de al menos 69%, de al menos 70%, de al menos 71%, de al menos 72%, de al menos 73%, de al menos 74%, de al menos 75%, de al menos 76%, de al menos 77%, de al menos 78%, de al menos 79%, de al menos 80%, de al menos 81%, de al menos 82%, de al menos 83%, de al menos 84%, de al menos 85%, de al menos 86%, de al menos 87%, de al menos 88%, de al menos 89%, de al menos 90%, de al menos 91%, de al menos 92%, de al menos 93%, de al menos 94%, de al menos 95%, de al menos 96%, de al menos 97%, de al menos 98% o de al menos 99%.

- 30 En otra realización preferente de la planta o de la célula vegetal de la invención, la secuencia aminoacídica del dominio catalítico de dicha proteína PGDH1 tiene una identidad de al menos 75% respecto a la secuencia SEQ ID NO: 2.

Preferentemente, la secuencia aminoacídica del dominio catalítico de la proteína PGDH1 tiene una identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 2 de al menos 76%, de al menos 77%, de al menos 78%, de al menos 79%, de al menos 80%, de al menos 81%, de al menos 82%, de al menos 83%, de al menos 84%, de al menos 85%, de al menos 86%, de al menos 87%, de al menos 88%, de al menos 89%, de al menos 90%, de al menos 91%, de al menos 92%, de al menos 93%, de al menos 94%, de al menos 95%, de al menos 96%, de al menos 97%, de al menos 98% o de al menos 99%.

El dominio catalítico de la proteína PGDH1 de *Arabidopsis thaliana* está identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2 que, a su vez, corresponde a los aminoácidos 61 a 348 de la secuencia SEQ ID NO: 1.

Los inventores han realizado un análisis de las secuencias de la proteína PGDH1 en las plantas *Arabidopsis thaliana*, tomate (*Solanum lycopersicum*), maíz (*Zea mays*) y otras especies de interés agronómico. Los resultados se muestran en la **Tabla 2**. En todos los casos estudiados de distintas especies vegetales se ha encontrado una identidad de secuencia superior al 65%.

Tabla 2

Nombre científico	Porcentaje de identidad	Longitud	Número de referencia (NCBI)
<i>Brassica rapa</i>	92,87%	596	XP_009115555.2
<i>Brassica napus</i>	93,17%	602	XP_013675915.2
<i>Hordeum vulgare</i> subsp. vulgare	83,43%	617	XP_044968223.1
<i>Oryza sativa</i> Japonica Group	82,50%	613	XP_015635449.1
<i>Hordeum vulgare</i> subsp. vulgare	77,31%	672	XP_044957600.1
<i>Solanum lycopersicum</i>	79,63%	595	XP_004248761.1
<i>Triticum aestivum</i>	82,87%	617	XP_044459395.1
<i>Zea mays</i>	82,14%	618	PWZ37369.1

Los inventores también han analizado un análisis de las secuencias del dominio catalítico de la proteína PGDH1 en las plantas *Arabidopsis thaliana*, tomate (*Solanum lycopersicum*), maíz (*Zea mays*) y otras especies de interés agronómico. Los resultados se muestran en la **Tabla 3**. En todos los casos estudiados de distintas especies vegetales se ha encontrado una identidad de secuencia superior al 75%.

Tabla 3

Nombre científico	Porcentaje de identidad	Longitud	Número de referencia (NCBI)
<i>Brassica napus</i>	79,86%	621	XP_013687658.1
<i>Brassica oleracea</i>	94,10%	602	VDD00124.1
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>	79,86%	621	XP_013604677.1
<i>Brassica rapa</i>	96,18%	596	XP_009115555.2
<i>Brassica rapa</i>	79,51%	621	XP_009110390.1
<i>Hordeum vulgare</i>	85,42%	404	KAE8798432.1
<i>Oryza sativa</i> Japonica Group	84,03%	613	XP_015635449.1
<i>Solanum lycopersicum</i>	87,50%	600	XP_004236276.1
<i>Solanum lycopersicum</i>	87,50%	595	XP_004248761.1
<i>Triticum aestivum</i>	85,07%	618	XP_044326513.1
<i>Triticum aestivum</i>	84,72%	617	XP_044459395.1
<i>Zea mays</i>	83,33%	618	PWZ37369.1
<i>Zea mays</i>	82,64%	612	ACG25573.1

Adicionalmente, los inventores han realizado un alineamiento de secuencias de las proteínas PGDH1, PGDH2 y PGDH3 de *Arabidopsis thaliana*, PGDH de tomate y PGDH de maíz, que se muestran en la **Figura 1**.

El análisis realizado permitió determinar que varios aminoácidos del dominio catalítico de la proteína PGDH1 están conservados en *Arabidopsis thaliana*, tomate y maíz. Dichos aminoácidos son los siguientes:

- 10 - leucina en la posición 65;
- leucina en la posición 78;
- arginina en la posición 108;
- serina en la posición 109;
- treonina en la posición 111;
- 15 - alanina en la posición 142;
- alanina en la posición 143;
- alanina en la posición 162;
- ácido glutámico en la posición 163;
- arginina en la posición 291;
- 20 - glicina en la posición 292;
- leucina en la posición 300;
- ácido aspártico en la posición 315;
- valina en la posición 316;

- fenilalanina en la posición 317;
- ácido glutámico en la posición 320;
- prolina en la posición 321;
- prolina en la posición 338;
- 5 - histidina en la posición 339;
- glicina en la posición 341;
- serina en la posición 343;
- treonina en la posición 344;
- ácido glutámico en la posición 346;
- 10 - alanina en la posición 347; y
- glutamina en la posición 348.

Las posiciones indicadas en el párrafo anterior hacen referencia a la posición en la secuencia aminoacídica de la proteína PGDH1 de *Arabidopsis thaliana*.

15

Por tanto, en otra realización preferente de la planta o de la célula vegetal de la invención, en el dominio catalítico de dicha proteína PGDH1 al menos uno de los aminoácidos es:

- leucina en la posición 65;
- leucina en la posición 78;
- 20 - arginina en la posición 108;
- serina en la posición 109;
- treonina en la posición 111;
- alanina en la posición 142;
- alanina en la posición 143;
- 25 - alanina en la posición 162;
- ácido glutámico en la posición 163;
- arginina en la posición 291;
- glicina en la posición 292;
- leucina en la posición 300;
- 30 - ácido aspártico en la posición 315;
- valina en la posición 316;
- fenilalanina en la posición 317;
- ácido glutámico en la posición 320;
- prolina en la posición 321;
- 35 - prolina en la posición 338;

- histidina en la posición 339;
- glicina en la posición 341;
- serina en la posición 343;
- treonina en la posición 344;
- 5 - ácido glutámico en la posición 346;
- alanina en la posición 347; y
- glutamina en la posición 348.

10 En otra realización preferente de la planta o de la célula vegetal de la invención, la secuencia aminoacídica de dicha proteína PGDH1 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7, que corresponden a secuencias de la proteína PGDH1 conservadas en *Arabidopsis thaliana*, tomate y maíz.

15 En una realización más preferente de la planta o de la célula vegetal de la invención, la secuencia aminoacídica de dicha proteína PGDH1 es la secuencia SEQ ID NO: 1.

20 En una realización preferente, la planta o la célula vegetal de la invención presenta un contenido superior en aminoácidos y/o en proteínas y/o en almidón respecto a una planta o a una célula vegetal sin transformar.

25 En una realización más preferente, la planta o la célula vegetal de la invención presenta un contenido al menos 5% superior en aminoácidos y/o al menos 5% superior en proteínas y/o al menos 5% superior en almidón respecto a una planta o a una célula vegetal sin transformar.

30 En una realización aún más preferente, la planta de la invención o la célula vegetal presenta un contenido al menos 5% superior en aminoácidos y/o al menos 5% superior en proteínas y/o al menos 5% superior en almidón respecto a una planta o a una célula vegetal sin transformar, en condiciones de cultivo en las que la concentración de CO₂ es de al menos 800 ppm. Actualmente los valores de CO₂ en la atmósfera son sensiblemente inferiores a 800 ppm. Sin embargo, en varios escenarios futuros, los valores de CO₂ en la atmósfera podrían superar los 800 ppm.

En otra realización preferente, la planta o la célula vegetal de la invención es de una especie de interés agronómico.

5 En una realización más preferente, la planta o la célula vegetal de la invención es de una especie con metabolismo C₃. Preferentemente, la especie con metabolismo C₃ se selecciona de entre tomate y brócoli.

10 En una realización más preferente, la planta o la célula vegetal es de una especie con metabolismo C₄. Preferentemente, la especie con metabolismo C₄ es maíz.

En otra realización preferente de la planta o de la célula vegetal de la invención, la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la proteína PGDH1 tiene una identidad de al menos 65% respecto a la secuencia SEQ ID NO: 8 o respecto a la secuencia SEQ ID NO: 9.

15 Preferentemente, la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la proteína PGDH1 tiene una identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 8 o respecto a la secuencia SEQ ID NO: 9 de al menos 66%, de al menos 67%, de al menos 68%, de al menos 69%, de al menos 70%, de al menos 71%, de al menos 72%, de al menos 73%, de al menos 74%, de al menos 75%, de al menos 76%, de al menos 77%, de al menos 78%, de al menos 79%, de al menos 80%, de al menos 81%, de al menos 82%, de al menos 83%, de al menos 84%, de al menos 85%, de al menos 86%, de al menos 87%, de al menos 88%, de al menos 89%, de al menos 90%, de al menos 91%, de al menos 92%, de al menos 93%, de al menos 94%, de al menos 95%, de al menos 96%, de al menos 97%, de al menos 98% o de al menos 99%.

25 En una realización más preferente de la planta o de la célula vegetal de la invención, la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la proteína PGDH1 es la secuencia SEQ ID NO: 8 o la secuencia SEQ ID NO: 9.

30 En otra realización preferente de la planta o de la célula vegetal de la invención, el gen que codifica para la proteína PGDH1 está operativamente ligado a un promotor constitutivo. Preferentemente, el promotor se selecciona de entre el promotor constitutivo del gen que codifica para la ubiquitina del maíz y el promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor 35S.

35

En otra realización preferente, la planta de la invención no sufre alteración en su crecimiento como planta, en relación al crecimiento, en idénticas condiciones de cultivo, de una planta sin transformar, de la misma especie.

- 5 En otra realización preferente, la planta de la invención no presenta un aumento en el tamaño de las raíces en relación con el tamaño de las raíces de una planta sin transformar.

En otra realización preferente, la planta de la invención no presenta un aumento en el tamaño de la parte aérea en relación con el tamaño de la parte aérea de una planta sin
10 transformar.

La presente invención también proporciona un constructo de expresión recombinante que comprende un gen que codifica para la proteína D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (PGDH1), en el que la secuencia aminoacídica de dicha proteína PGDH1 tiene una
15 identidad de al menos 65% respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1 y en el que el gen que codifica para la proteína PGDH1 está operativamente ligado a un promotor constitutivo.

En una realización preferente del constructo de expresión recombinante de la invención, el promotor constitutivo se selecciona de entre el promotor constitutivo del gen que codifica
20 para la ubiquitina del maíz y el promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor 35S.

En otra realización preferente del constructo de expresión recombinante de la invención, la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la proteína PGDH1 tiene una identidad de al menos 65% respecto a la secuencia SEQ ID NO: 8 o respecto a la secuencia SEQ ID NO:
25 9.

Preferentemente, la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la proteína PGDH1 tiene una identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 8 o respecto a la secuencia SEQ ID NO: 9 de al menos 66%, de al menos 67%, de al menos 68%, de al menos 69%, de al
30 menos 70%, de al menos 71%, de al menos 72%, de al menos 73%, de al menos 74%, de al menos 75%, de al menos 76%, de al menos 77%, de al menos 78%, de al menos 79%, de al menos 80%, de al menos 81%, de al menos 82%, de al menos 83%, de al menos 84%, de al menos 85%, de al menos 86%, de al menos 87%, de al menos 88%, de al menos 89%, de al menos 90%, de al menos 91%, de al menos 92%, de al menos 93%, de al menos 94%, de al
35 menos 95%, de al menos 96%, de al menos 97%, de al menos 98% o de al menos 99%.

En una realización más preferente del constructo de expresión recombinante de la invención, la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la proteína PGDH1 es la secuencia SEQ ID NO: 8 o la secuencia SEQ ID NO: 9.

5

La presente invención también proporciona un vector de expresión recombinante que comprende el constructo de expresión recombinante de la invención.

En una realización preferente del vector de expresión recombinante de la invención, la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la proteína PGDH1 tiene una identidad de al menos 65% respecto a la secuencia SEQ ID NO: 8 o respecto a la secuencia SEQ ID NO: 9.

Preferentemente, la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la proteína PGDH1 tiene una identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 8 o respecto a la secuencia SEQ ID NO: 9 de al menos 66%, de al menos 67%, de al menos 68%, de al menos 69%, de al menos 70%, de al menos 71%, de al menos 72%, de al menos 73%, de al menos 74%, de al menos 75%, de al menos 76%, de al menos 77%, de al menos 78%, de al menos 79%, de al menos 80%, de al menos 81%, de al menos 82%, de al menos 83%, de al menos 84%, de al menos 85%, de al menos 86%, de al menos 87%, de al menos 88%, de al menos 89%, de al menos 90%, de al menos 91%, de al menos 92%, de al menos 93%, de al menos 94%, de al menos 95%, de al menos 96%, de al menos 97%, de al menos 98% o de al menos 99%.

En una realización más preferente del vector de expresión recombinante de la invención, la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la proteína PGDH1 es la secuencia SEQ ID NO: 8 o la secuencia SEQ ID NO: 9.

La presente invención adicionalmente proporciona un procedimiento no esencialmente biológico para obtener una planta genéticamente modificada o una célula vegetal genéticamente modificada que comprende transformar las plantas silvestres o las células vegetales correspondientes con un vector de expresión que comprende un gen que codifica para la proteína D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (PGDH1), en el que la secuencia aminoacídica de dicha proteína PGDH1 tiene una identidad de al menos 65% respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1 y en el que dicha planta o célula vegetal no es de la especie *Arabidopsis thaliana*.

Preferentemente, la secuencia aminoacídica de dicha proteína PGDH1 tiene una identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1 de al menos 66%, de al menos 67%, de al menos 68%, de al menos 69%, de al menos 70%, de al menos 71%, de al menos 72%, de al menos 73%, de al menos 74%, de al menos 75%, de al menos 76%, de al menos 77%, de al menos 78%, de al menos 79%, de al menos 80%, de al menos 81%, de al menos 82%, de al menos 83%, de al menos 84%, de al menos 85%, de al menos 86%, de al menos 87%, de al menos 88%, de al menos 89%, de al menos 90%, de al menos 91%, de al menos 92%, de al menos 93%, de al menos 94%, de al menos 95%, de al menos 96%, de al menos 97%, de al menos 98% o de al menos 99%.

La presente invención también proporciona un procedimiento no esencialmente biológico para obtener una planta genéticamente modificada o una célula vegetal genéticamente modificada que comprende realizar edición génica de las plantas silvestres o las células vegetales correspondientes para que sobre-expresen el gen que codifica para la proteína D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (PGDH1). Preferentemente, la edición génica es una tecnología basada en CRISPR-cas9.

En una realización preferente del procedimiento de la invención, la secuencia aminoacídica del dominio catalítico de dicha proteína PGDH1 tiene una identidad de al menos 75% respecto a la secuencia SEQ ID NO: 2. Preferentemente, dicha identidad de secuencia es de al menos 76%, de al menos 77%, de al menos 78%, de al menos 79%, de al menos 80%, de al menos 81%, de al menos 82%, de al menos 83%, de al menos 84%, de al menos 85%, de al menos 86%, de al menos 87%, de al menos 88%, de al menos 89%, de al menos 90%, de al menos 91%, de al menos 92%, de al menos 93%, de al menos 94%, de al menos 95%, de al menos 96%, de al menos 97%, de al menos 98% o de al menos 99%.

En otra realización preferente del procedimiento de la invención, en el dominio catalítico de dicha proteína PGDH1 al menos uno de los aminoácidos es:

- leucina en la posición 65;
- leucina en la posición 78;
- arginina en la posición 108;
- serina en la posición 109;
- treonina en la posición 111;
- alanina en la posición 142;

- alanina en la posición 143;
- alanina en la posición 162;
- ácido glutámico en la posición 163;
- arginina en la posición 291;
- 5 - glicina en la posición 292;
- leucina en la posición 300;
- ácido aspártico en la posición 315;
- valina en la posición 316;
- fenilalanina en la posición 317;
- 10 - ácido glutámico en la posición 320;
- prolina en la posición 321;
- prolina en la posición 338;
- histidina en la posición 339;
- glicina en la posición 341;
- 15 - serina en la posición 343;
- treonina en la posición 344;
- ácido glutámico en la posición 346;
- alanina en la posición 347; y
- glutamina en la posición 348.

20

En otra realización preferente del procedimiento de la invención, la secuencia aminoacídica de dicha proteína PGDH1 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7.

- 25 En otra realización preferente del procedimiento de la invención, la secuencia aminoacídica de dicha proteína PGDH1 es la secuencia SEQ ID NO: 1.

En otra realización preferente del procedimiento de la invención, la planta o la célula vegetal es de una especie de interés agronómico.

30

En otra realización preferente del procedimiento de la invención, la planta o la célula vegetal es de una especie con metabolismo C_3 . Preferentemente, la especie con metabolismo C_3 se selecciona de entre tomate y brócoli.

En otra realización preferente del procedimiento de la invención, la planta o la célula vegetal es de una especie con metabolismo C₄. Preferentemente, la especie con metabolismo C₄ es maíz.

- 5 En otra realización preferente del procedimiento de la invención, la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la proteína PGDH1 tiene una identidad de al menos 65% respecto a la secuencia SEQ ID NO: 8 o respecto a la secuencia SEQ ID NO: 9.

Preferentemente, la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la proteína PGDH1
10 tiene una identidad de al menos 65% respecto a la secuencia SEQ ID NO: 8 o respecto a la secuencia SEQ ID NO: 9 de al menos 66%, de al menos 67%, de al menos 68%, de al menos 69%, de al menos 70%, de al menos 71%, de al menos 72%, de al menos 73%, de al menos 74%, de al menos 75%, de al menos 76%, de al menos 77%, de al menos 78%, de al menos 79%, de al menos 80%, de al menos 81%, de al menos 82%, de al menos 83%, de al
15 menos 84%, de al menos 85%, de al menos 86%, de al menos 87%, de al menos 88%, de al menos 89%, de al menos 90%, de al menos 91%, de al menos 92%, de al menos 93%, de al menos 94%, de al menos 95%, de al menos 96%, de al menos 97%, de al menos 98% o de al menos 99%.

- 20 En una realización más preferente del procedimiento de la invención, la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la proteína PGDH1 es la secuencia SEQ ID NO: 8 o la secuencia SEQ ID NO: 9.

La presente invención también proporciona el uso de la planta de la invención, de la célula
25 vegetal de la invención, del constructo de expresión recombinante de la invención, o del vector de expresión recombinante de la invención, para la producción de proteínas, aminoácidos y/o almidón.

- En una realización preferente del uso de la invención, la célula vegetal o la planta se cultiva
30 en condiciones en las que la concentración de CO₂ es de al menos 800 ppm.

En relación con los porcentajes de identidad de secuencia de la presente invención, el experto puede determinar si una secuencia tiene al menos un porcentaje de identidad determinado respecto a una secuencia de la presente invención, utilizando programas
35 informáticos de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica.

Por ejemplo, en la presente memoria se entiende que una secuencia problema tiene al menos un 65% de identidad respecto a una secuencia de referencia de la invención cuando la secuencia puede incluir hasta 35 residuos diferentes por cada 100 residuos de la secuencia de referencia, bien sea por eliminación, inserción o sustitución. Esto se extiende, de forma análoga, al resto de porcentajes de identidad que se describen en la presente memoria.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, el término “comprende”, “que comprende” y sus variantes no son de naturaleza limitativa y, por lo tanto, no pretenden excluir otras características técnicas. El término “comprende”, “que comprende” y sus variantes, a lo largo de la descripción y las reivindicaciones, incluye, específicamente, el término “consiste en”, “que consiste en” y sus variantes.

Como se usa en esta descripción y en las reivindicaciones, las formas singulares “el”, “la” incluyen referencias a las formas plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados a lo largo de la descripción y reivindicaciones, tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en el campo de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Alineamiento de secuencias de las proteínas PGDH1, PGDH2 y PGDH3 de *Arabidopsis thaliana*, PGDH de tomate y PGDH de maíz. Se han remarcado en gris claro los dominios conservados en las especies de plantas estudiadas, y en gris oscuro los dominios conservados incluso en mamíferos (en rata y en humano; las secuencias de la proteína PGDH de estas dos especies de mamífero no se muestran en la figura).

Figura 2. Caracterización fenotípica de las líneas triple sobre-expresoras (TriOex) y sobre-expresoras del gen *PGDH1* (Oex PGDH1) en condiciones de CO₂ ambiental (400 ppm) (A y B) y de alto CO₂ (2500 ppm) (C y D) de plántulas de *Arabidopsis thaliana* de 14 días crecidas *in vitro*. Para ambas condiciones se midió el peso fresco de la parte aérea (A y C) y la longitud de la raíz primaria (B y D). Los valores representan la media $\pm$ SE ($n \geq 100$). (*)

indica diferencias significativas respecto al control de plantas silvestres (WT; T-test, $P < 0,05$).

Figura 3. Análisis del contenido de almidón (A y B) y proteínas (C y D) en condiciones de CO₂ ambiental (400 ppm; barras blancas) y alto CO₂ (2500 ppm; barras grises) en la parte aérea (A y C) y en las raíces (B y D) para plantas de *Arabidopsis thaliana* TriOex y Oex PGDH1 de 14 días crecidas *in vitro*. Los valores representan la media $\pm$ SE ($n = 12$ réplicas biológicas). (*) representa diferencias significativas respecto al control de plantas silvestres (WT; T-test, $P < 0,05$).

Figura 4. Análisis del contenido de almidón (A, B y C) y proteínas (D, E y F) en condiciones de CO₂ ambiental en hojas (A y D), tallos (B y E) y en el grano (C y F) de plantas de maíz ZmOex PGDH1 bien en líneas individuales (ZmOex PGDH1-22 y ZmOex PGDH1-27 y ZmOex PGDH1-31) o en el conjunto de todas las líneas (ZmOex PGDH1). El material procede de plantas cultivadas en invernadero durante 20 días (hojas y tallos) o al final de ciclo biológico en el caso del grano. Los valores representan la media $\pm$ SE ($n \geq 12$ réplicas biológicas). (*) representa diferencias significativas respecto al control de plantas silvestres (WT; T-test, $P < 0,05$).

Figura 5. Expresión relativa del gen *PGDH1* de *Arabidopsis thaliana* en distintos órganos de tres líneas transgénicas de maíz (ZmOex PGDH1-22 y ZmOex PGDH1-27 y ZmOex PGDH1-31). Las barras representan la media $\pm$ SE ($n \geq 6$ réplicas biológicas). (*) representa diferencias significativas respecto al control de plantas silvestres (WT; T-test, $P < 0,05$).

Figura 6. Peso relativo de la parte aérea de plantas de 22 días de edad de tres líneas transgénicas de maíz sobre-expresoras del gen *PGDH1* comparadas con el control silvestre (WT). Los datos son o bien de líneas transgénicas individuales (ZmOex PGDH1-22 y ZmOex PGDH1-27 y ZmOex PGDH1-31) o del conjunto de todas las líneas (ZmOex PGDH1). Las barras representan la media $\pm$ SE ($n \geq 15$ réplicas biológicas). (*) representa diferencias significativas respecto al control de plantas silvestres (WT; T-test, $P < 0,05$).

DESCRIPCIÓN DE MODOS DE REALIZACIÓN

Ejemplo 1. Materiales y métodos

Material vegetal y condiciones de crecimiento

5 Como material vegetal de partida se utilizaron plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia. Estas semillas silvestres se utilizaron como fondo genético para la obtención de líneas sobre-expresoras. Las semillas a esterilizar se colocaron en un tubo de 1,5 mL y se realizaron dos lavados sucesivos de 15 minutos cada uno, en agitación continua, con 1 mL de una solución de etanol 70% y SDS al 0,05% (Dodecil Sulfato Sódico, SIGMA, Ref. 1667289). Una vez realizados estos dos lavados, la solución final se eliminó y se sustituyó por 1 mL de una solución de etanol 70%, manteniendo de nuevo a las semillas en agitación durante 5 minutos. Una vez transcurridos estos 5 minutos, las semillas se depositaron y se dejaron secar en papel de filtro estéril dentro de una cabina de flujo laminar horizontal en condiciones de esterilidad. Una vez secas se procedió a sembrar las semillas en el medio de cultivo adecuado o se guardaron a 4°C hasta su uso en un tubo estéril de 1,5 mL. Para el cultivo *in vitro* de *Arabidopsis thaliana* se utilizaron placas redondas o cuadradas de 12 cm de lado, que contenían un medio de cultivo compuesto por 0,9 g/L de un preparado de Duchefa Biochemie (Ref. P03769-05), 0,9 g/L de MES (ácido 2-N-morfolinoetanosulfónico, SIGMA, Ref. 32K5465), 8 g/L de agar (Pronadisa, Ref. SB090321), y el pH ajustado a 5,7 [ajustado con Tris (tris(hidroximetil) aminometano; Sigma, Ref. T6066) o KOH]. Este medio fue designado como MS1/5. Una vez realizada la siembra en condiciones de esterilidad, las placas se sellaron con cinta porosa Micropore Hypoallergenic (3M Micropore TM, Ref. 1530-0 para las placas redondas y Ref. 1530-1 para las placas cuadradas), que permite el intercambio de gases, pero mantiene la humedad en el interior de las placas.

Antes de ser transferidas a cámaras de crecimiento (Sanyo-MLR-351H o Ibercex H-900) para la germinación, las semillas sembradas en las placas se estratificaron 3-4 días a 4°C con objeto de favorecer y sincronizar la germinación. El cultivo permaneció los días adecuados para cada experimento a una temperatura de 22-25°C, humedad relativa 40-60%, un fotoperiodo de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad) y una intensidad de luz de 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Cuando fue necesario el cultivo *in vitro* en condiciones de alto CO₂, las plantas se crecieron a una concentración de CO₂ de 2000 o 2500 ppm en las mismas condiciones de luz y humedad.

También se han utilizado plantas de interés agronómico y con metabolismo fotosintético C₄. Concretamente se han utilizado plantas de maíz (*Zea mays*) variedad B104 para generar líneas transgénicas. Esta variedad fue suministrada por el servicio de transformación de plantas de la Universidad del Estado de Iowa ("Iowa State University") donde se obtuvo la primera generación de plantas transgénicas de maíz. A partir de este material de partida, se obtuvieron al menos tres generaciones más hasta conseguir líneas transgénicas con una única inserción en homocigosis como se indica posteriormente.

- 5 10 Las semillas de maíz se separaron de la mazorca de forma manual, se limpiaron y se procedió a realizar una esterilizaron superficial (para eliminar posibles esporas y hongos) mediante 2 lavados sucesivos de 5 minutos en soluciones alcohólicas. En primer lugar, las semillas se introdujeron en matraces de 250 mL y se esterilizaron en agitación suave en un primer lavado con etanol al 70% con SDS al 0,05% durante 5 minutos. Una vez
15 transcurridos los 5 minutos esta solución se eliminó y se realizó un segundo lavado con etanol 70% durante otros 5 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, las semillas se depositaron y se dejaron secar en papel de filtro dentro de una cabina de flujo laminar. Una vez secas las semillas se guardaron a 4°C hasta su uso en bolsas de papel.
- 20 Para obtener material de hojas, tallos y raíces de maíz se sembraron sus semillas en macetas de poliestireno que contenían perlita expandida con un tamaño de partícula de entre 1-5 mm (Projar), se pusieron en bandejas y se regaron con solución nutritiva. Tras una semana las semillas habían germinado y las plántulas tenían unas 2 o 3 hojas. El material de hojas, tallos y raíces se recogió a las dos semanas. Para recoger el grano se necesitó
25 que las plantas completaran su ciclo biológico. Para ello, plántulas de dos semanas se trasplantaron a macetas de 35 litros de capacidad con una composición de sustrato Kekkila y perlita en una proporción 3:1 (v/v) respectivamente.

- 30 Las macetas se regaron entre 1 y 2 veces por semana con solución nutritiva en función de las necesidades hídricas. Tras unos meses las plantas desarrollaron las inflorescencias masculinas (de las cuales recogimos el polen) y femeninas (que se autopolinizaron) para poder obtener el grano. Cuando de la axila de alguna hoja aparecía una pequeña mazorca sin abrir (inflorescencia femenina) esta se cubría rápidamente con una bolsa de papel para evitar cruzamientos no deseados. Dado que en algunos casos existe un leve desfase
35 temporal entre el desarrollo de la flor masculina, que se desarrolla antes, y la flor femenina,

se recogió el polen de cada planta de manera individual y se guardó a 4°C hasta su uso. En el momento en el que la flor femenina se desarrolló y aparecieron los estigmas filamentosos, se procedió a polinizar cada flor con el polen de la misma planta dejándolo caer sobre los estigmas. Las autopolinizaciones de las plantas se prolongaron durante el periodo en que la inflorescencia masculina generaba polen o mientras los estigmas estaban receptivos.

Las condiciones de crecimiento en el invernadero fueron de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad), con una intensidad de luz aproximada de $130 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 50-70% de humedad relativa y una temperatura alrededor de 28°C durante el día y alrededor de 25°C durante la noche. La luz natural fue suplementada con luz artificial (lámparas de vapor de sodio y lámparas de vapor de mercurio) cuando fue necesario.

Clonación y transformación de plantas

El ADNc de *PGDH1* se introdujo en el plásmido de expresión en plantas pMDC83, utilizando la tecnología de Gateway®, la cual está basada en los sitios de recombinación att, usando la enzima recombinasa del kit de INVITROGEN Gateway® LR Clonase® II enzyme mix (Ref. 11791-100). El plásmido pMDC83 permite la expresión en plantas de *PGDH1* bajo el control del promotor fuerte del virus del mosaico de la coliflor (pMDC83 Pro35S:PGDH1-GFP). El plásmido pMDC83 es portador de la proteína verde de fusión GFP que se dispone en fase de lectura con el ADN introducido.

También se han obtenido plantas triple sobre-expresoras de tres genes que codifican para las tres enzimas que participan en la ruta fosforilativa de biosíntesis de serina, la D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (*PGDH1*), la fosfoserina aminotransferasa (*PSAT1*) y la fosfoserina fosfatasa (*PSP*). La construcción para la obtención de plantas sobre-expresoras del gen *PSAT1* consistió en el clonaje de la parte codificante de dicho gen en el plásmido pMDC86 para obtener el plásmido pMDC86 Pro35S:PSAT1-GFP. El plásmido pMDC86 es similar al pMDC83 descrito anteriormente salvo por el agente de selección en plantas, que en el plásmido pMDC83 proporciona tolerancia a higromicina y en el plásmido pMDC86 proporciona tolerancia a BASTA. El gen *PSAT1* no contiene intrones, por lo que se utilizó el BAC F8D20 para poder amplificar por PCR su región codificante. El producto de PCR resultante, utilizando los cebadores PSAT1+1 For y PSAT1+1270 Rev (**Tabla 4**), se clonó en el plásmido pCR8/GW/TOPO del kit de INVITROGEN pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning Kit

(Ref. K2500-20), transformándose posteriormente con dicho plásmido células competentes de *Escherichia coli* DH5 α .

La **Tabla 4** muestra los cebadores utilizados en los ejemplos de la invención.

5

Tabla 4

Nombre del cebador	Número de secuencia
PSAT1+1 For	SEQ ID NO: 10
PSAT1+1270 Rev	SEQ ID NO: 11
2x35S -786 For	SEQ ID NO: 12
T-Nos +322 <i>Bgl</i> II Rev	SEQ ID NO: 13
EDA9GFP <i>Xba</i> I <i>Avr</i> II For	SEQ ID NO: 14
EDA9GFP <i>Spe</i> I Rev	SEQ ID NO: 15

Tras comprobar mediante secuenciación que la secuencia de interés no tenía mutaciones, esta región codificante fue subclonada en el plásmido pMDC86, utilizando la tecnología Gateway®. El plásmido pMDC86 es portador de la proteína verde de fusión GFP que se dispone en fase de lectura con el ADN introducido. El plásmido pMDC86 Pro35S:PSAT1-GFP generado también fue comprobado por secuenciación, pero en este caso, solamente las regiones de inserción para confirmar que la GFP estuviera en fase de lectura con la región codificante del gen *PSAT1*. Por último, esta construcción se introdujo en la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Se diseñó por otra parte la construcción del gen *PSP1* bajo el control del promotor 35S y unido al gen que codifica para la proteína GFP en el plásmido pMDC100. El plásmido pMDC100 fue elegido para obtener esta construcción por proporcionar tolerancia en plantas a kanamicina, y a pesar de tener sitios de recombinación del sistema Gateway®, el clonaje de las secuencias en su interior fue mediante enzimas de restricción. El fragmento *Pro35S:PSP1-GFP* se obtuvo mediante amplificación por PCR utilizando los cebadores 2x35S -786 For y T-Nos +322 *Bgl*II Rev (**Tabla 4**) a partir de la construcción pMDC83 *Pro35S:PSP1-GFP*. Tras comprobar mediante electroforesis con una alícuota de la PCR que el fragmento amplificado tenía el tamaño adecuado y no había bandas inespecíficas, se procedió a purificar el resto de la reacción de la PCR y se digirió con la enzima de restricción *Hind*III, generando un amplicón con un extremo 5' cohesivo *Hind*III y un extremo 3' romo. Por otro lado, el plásmido pMDC100 se digirió con *Hind*III y *Ecl*136II (que genera un extremo romo). De esta forma, mediante purificación de la banda correcta, separada en un gel de

electroforesis, se eliminó en el pMDC100 toda la región que se encuentra entre las regiones de recombinación attR1 y attR2 y reemplazarla por el fragmento *Pro35S:PSP1-GFP*. De esta forma, se obtuvo el plásmido pMDC100, que confiere resistencia a kanamicina en plantas y que lleva el gen *PSP1* bajo el control del promotor 35S y unido a la GFP (pMDC100 *Pro35S:PSP1-GFP*). Tras confirmar que los bordes de inserción eran correctos mediante secuenciación, se procedió a introducir este plásmido en la cepa GV3101 de *A. tumefaciens* para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* se transformaron utilizando el método de la inmersión floral. Se generaron varias líneas transgénicas independientes de individuos homocigóticos para el transgén y con una inserción única.

Para la obtención de las líneas triples sobre-expresoras se partió de plantas sobre-expresoras del gen *PGDH1* cuyo agente de selección es el gen de resistencia al antibiótico higromicina. Se diseñaron dos construcciones, como se ha comentado anteriormente, para sobre-expresar los genes que codifican la enzima fosfoserina aminotransferasa (PSAT) y la enzima fosfoserina fosfatasa (PSP) en *Arabidopsis thaliana*. Estas dos enzimas participan en la segunda y en la tercera reacción de la ruta fosforilativa de biosíntesis de serina, respectivamente, mientras que la enzima PGDH1 participa en la primera. Las dos construcciones obtenidas para este propósito se han diseñado con dos plásmidos distintos, en el que cada uno presenta un agente de selección diferente (BASTA para el plásmido que expresa el transgén que contiene *PSAT1* y kanamicina para el plásmido que expresa el transgén del *PSP1*) y también, a su vez, diferente al agente de selección de las líneas sobre-expresoras de *PGDH1* (higromicina). La presencia de distintos agentes de selección en cada una de las líneas sobre-expresoras permitió obtener más fácilmente las líneas triples sobre-expresoras al poder utilizar la selección por antibióticos durante la germinación de las semillas.

Con cada una de estas construcciones se transformaron dos líneas sobre-expresoras del gen *PGDH1* nombradas como Oex PGDH1-L1 y Oex PGDH1-L2. Con esta estrategia, y para cada una de las líneas oex PGDH1, se consiguieron por una parte plantas sobre-expresoras para el gen *PSAT1* y *PGDH1*, y por otra, plantas que sobre-expresan *PSP1* y *PGDH1*. A partir de plantas doble sobre-expresoras homocigotas se realizaron cruces hasta conseguir plantas sobre-expresoras homocigotas para los tres transgenes. La identificación

de estas líneas homocigotas para cada uno de los tres genes fue posible a los diferentes agentes de selección empleados.

También se realizó una construcción para poder expresar el cDNA de *PGDH1* de *Arabidopsis thaliana* en maíz. Esta construcción consistió en el clonaje de la parte codificante del gen *PGDH1*, unida a la secuencia de la proteína GFP, en el plásmido pMCG1005 (obtenido de la Universidad del Estado de Iowa). El fragmento *PGDH1-GFP* se obtuvo a partir del plásmido pMDC83 *Pro35S:PGDH1-GFP* mediante PCR utilizando los cebadores EDA9GFP XbaI AvrII For y EDA9GFP SpeI Rev (**Tabla 4**). Tras verificar mediante electroforesis que el fragmento tenía un tamaño aproximado de 2656 pb, el amplicón fue purificado y digerido con la enzima de restricción *SpeI* para generar un fragmento *SpeI* cohesivo por un lado y romo por el otro. Por otro lado, el plásmido pMCG1005 se digirió con *SpeI* y *StuI* (esta última enzima genera un extremo romo) para eliminar el intrón de arroz *Waxy-a*. Tras purificar el fragmento correspondiente al plásmido (13220 pb) este se ligó con el fragmento *PGDH1-GFP* para obtener la construcción pMCG1005 *ProUbi:PGDH1-GFP*. Este plásmido formado confiere resistencia a BASTA en plantas y, tras confirmar que la secuencia introducida en el plásmido era correcta mediante secuenciación, se procedió a enviar dicho plásmido al servicio de transformación de plantas de la Universidad del Estado de Iowa para que obtuvieran plantas transformadas de maíz y nos las enviaran.

Las semillas de maíz obtenidas a partir de plantas transformadas por la construcción génica pMCG1005 *ProUbi:PGDH1-GFP*, procedentes del servicio de transformación de plantas de la Universidad del Estado de Iowa, fueron recibidas y se procedió a la identificación y aislamiento de las plantas que presentaran una sola copia del transgén. Estas semillas enviadas provenían de las plantas transgénicas regeneradas tras la transformación, por lo que según la terminología normalmente usada en *Arabidopsis thaliana*, se corresponderían con la generación segregante T2 (donde se identifican las líneas que presentan una copia del transgén mediante una relación 3:1).

Se sembraron las semillas T2 para cada línea independiente y tras germinar se realizaron ensayos de tolerancia a BASTA y PCRs diagnósticas para identificar las plantas transgénicas y los controles singénicos. Con los resultados se pudo establecer la segregación y, por tanto, cuantas inserciones del T-DNA presentaba las plantas progenitoras. Tras este ensayo se identificaron aquellas líneas de una inserción y dentro de

ellas las plantas que fueron tolerantes a BASTA y positivas para la PCR (y por lo tanto contienen el transgén de interés; estas plantas podrían ser ya homocigotas o heterocigotas pero por los ensayos realizados no las podíamos distinguir). Estas plantas seleccionadas tras crecer y florecer se autopolinizaron para obtener la siguiente generación de semillas.

- 5 Una vez obtenidas estas semillas se volvieron a sembrar y a analizar para identificar los lotes de semillas homocigotas (que serían aquellas 100% tolerantes o PCR+ por ser su progenitora homocigota).

- 10 Dado que el ciclo de vida del maíz es de entre 6 y 7 meses, los datos presentados son de algunas líneas heterocigotas y en algunos casos de líneas homocigotas. En los análisis del grano, donde no se disponía de suficientes semillas se hicieron pools de dos o tres líneas. A las líneas sobre-expresoras del gen *PGDH1* se las denominó ZmOex PGDH1.

Medidas del contenido de proteínas y almidón

- 15 El contenido de proteínas solubles totales se realizó con el reactivo de Bradford (Bio-Rad, 500-0006). El contenido de almidón se determinó con el kit de Enzytec (r-biopharm). En ambos casos se utilizaron hojas de roseta de *Arabidopsis thaliana* de dos semanas de edad. En el caso de maíz se utilizaron hojas, tallos o semillas y se optimizó el protocolo para cada material.

Ejemplo 2. Caracterización de plantas de *Arabidopsis thaliana* que sobre-expresan el gen *PGDH1* de *Arabidopsis thaliana*

- 25 Se analizó el contenido de aminoácidos libres, de almidón y de proteínas en las líneas sobre-expresoras de la proteína PGDH1 de *Arabidopsis thaliana* tanto en condiciones de CO₂ ambiental como en condiciones de elevado CO₂ (2500 ppms de CO₂) donde la actividad de la ruta del Glicolato asociado a la actividad fotorrespiratoria es menor. Se utilizaron líneas que sobre-expresan el gen *PGDH1* (Oex PGDH1-L1 y Oex PGDH1-L2) y líneas que sobre-expresaron las tres enzimas de la ruta PGDH1, PSAT1 y PSP (TriOex1-40, TriOex2-4, TriOex2-47 y TriOex2-49).

- 30 En primer lugar, se estudió si había un efecto negativo de la sobre-expresión de la proteína PGDH1 de *Arabidopsis thaliana* sobre el crecimiento de la planta. En cuatro de las seis líneas sobre-expresoras crecidas *in vitro* y cultivadas en condiciones de CO₂ ambiental no se observaron diferencias significativas en el crecimiento de la parte aérea respecto a la

línea control de plantas silvestres (WT), y solo la línea triple sobre-expresora TriOex2-49 y la línea Oex PGDH1-L2 de la que deriva presentaron un menor crecimiento de la parte aérea (**Figura 2A**). También se observó una reducción del crecimiento de la raíz principal (entre un 10 y un 20%) en tres de las seis líneas caracterizadas (TriOex2-4, TriOex2-49 y la línea Oex PGDH1-L2 de la que derivan (**Figura 2B**).

Los ensayos de caracterización fenotípica *in vitro* también se realizaron en condiciones de alto CO₂, para estudiar el papel de la proteína PGDH1 de *Arabidopsis thaliana* cuando la ruta del Glicolato asociada a la fotorrespiración, presenta una menor actividad. En este ensayo no se observaron diferencias significativas en el crecimiento de la parte aérea en ninguna de las líneas TriOex comparadas con el control. Solo se observó una disminución del peso de la parte aérea entorno a un 25% en la línea Oex PGDH1-L2 (**Figura 2C**). Al contrario de lo que ocurría en condiciones de CO₂ ambiental, se apreció un aumento significativo de la longitud de la raíz primaria en tres líneas al compararlas con el control (TriOex1-40, TriOex2-47 y TriOex2-49) con un incremento entre un 7-12% de la raíz primaria en comparación con el control (**Figura 2D**).

Con estos resultados se concluye que es posible obtener líneas sobre-expresoras de la proteína PGDH1 de *Arabidopsis thaliana* sin tener un efecto negativo sobre el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* y que la sobre-expresión puede tener incluso un efecto positivo sobre el crecimiento en condiciones de cultivo con elevado CO₂.

El análisis metabolómico de las líneas sobre-expresoras de la proteína PGDH1 de *Arabidopsis thaliana* mostró un aumento en el contenido de serina acompañado del aumento generalizado de otros aminoácidos en la mayoría de las líneas sobre-expresoras fundamentalmente en la parte aérea pero también en raíces, entre los que cabe destacar a la treonina, valina, asparagina, aspartato, glutamato y glutamina (**Tabla 5 y Tabla 6**) sugiriendo que los niveles de serina son esenciales para controlar la homeostasis del resto de aminoácidos en la planta, y por tanto de los procesos que lleva asociados, fundamentalmente la síntesis proteica. De todos ellos, el más interesante son la valina y la treonina por ser aminoácidos esenciales, pero sobre todo la treonina porque se considera uno de los cuatro aminoácidos esenciales que limitan la calidad nutricional de las plantas.

Las **Tablas 5 y 6** muestran los niveles de aminoácidos en la parte aérea (Tabla 5) y en raíces (Tabla 6) de las líneas sobre-expresoras del gen PGDH1 (OexPGDH1-L1 y

OexPGDH1-L2) y las líneas triple sobre-expresoras (TriOex1-40, TriOex2-4, TriOex2-47 y TriOex2-49) comparados con la línea de plantas silvestres (WT) en condiciones de CO₂ ambiental (aCO₂; 400 ppm). Los datos representan valores relativos normalizados respecto a la media calculada para el WT (media $\pm$ SE de al menos 6 determinaciones independientes). Los valores que son significativamente diferentes al control de plantas silvestres (WT) están resaltados en negrita (T-test, P < 0,05).

Tabla 5

Aminoácidos	WT aCO ₂	Oex PGDH1 L1 aCO ₂	Oex PGDH1 L2 aCO ₂	TriOex1-40 aCO ₂	TriOex2-4 aCO ₂	TriOex2-47 aCO ₂	TriOex2-49 aCO ₂
Ácido aspártico	1 $\pm$ 0,06	1,41$\pm$0,13	1,65$\pm$0,06	1,27$\pm$0,07	1,30$\pm$0,08	1,36$\pm$0,11	1,39$\pm$0,15
Alanina	1 $\pm$ 0,11	0,80 $\pm$ 0,13	1,06 $\pm$ 0,19	1,00 $\pm$ 0,16	0,84 $\pm$ 0,13	0,91 $\pm$ 0,17	0,90 $\pm$ 0,18
Alanina, β	1 $\pm$ 0,03	1,18$\pm$0,07	1,34$\pm$0,02	1,31$\pm$0,08	1,26$\pm$0,06	1,15 $\pm$ 0,10	1,31 $\pm$ 0,14
Asparagina	1 $\pm$ 0,19	2,00$\pm$0,40	2,62$\pm$0,70	1,66 $\pm$ 0,32	1,89$\pm$0,34	1,94 $\pm$ 0,43	1,55 $\pm$ 0,31
Fenilalanina	1 $\pm$ 0,03	1,08 $\pm$ 0,07	1,04 $\pm$ 0,03	1,17$\pm$0,05	1,12$\pm$0,03	1,02 $\pm$ 0,05	1,05 $\pm$ 0,09
Glicina	1 $\pm$ 0,04	1,43$\pm$0,08	1,65$\pm$0,13	1,33$\pm$0,13	1,11 $\pm$ 0,05	1,12 $\pm$ 0,06	0,88 $\pm$ 0,06
Glutamato	1 $\pm$ 0,08	1,86$\pm$0,23	1,71$\pm$0,26	1,50$\pm$0,18	1,82$\pm$0,25	1,64$\pm$0,26	1,34 $\pm$ 0,21
Glutamina	1 $\pm$ 0,13	2,14$\pm$0,22	2,03$\pm$0,14	1,96$\pm$0,37	2,47$\pm$0,12	1,99$\pm$0,40	1,45 $\pm$ 0,24
Homoserina	1 $\pm$ 0,05	1,16 $\pm$ 0,10	1,14 $\pm$ 0,07	1,17 $\pm$ 0,07	1,11 $\pm$ 0,05	1,10 $\pm$ 0,05	0,94 $\pm$ 0,04
Isoleucina	1 $\pm$ 0,03	1,15$\pm$0,05	1,13$\pm$0,03	1,18$\pm$0,07	1,09 $\pm$ 0,05	0,97 $\pm$ 0,04	1,09 $\pm$ 0,07
Leucina	1 $\pm$ 0,04	1,16 $\pm$ 0,08	1,18$\pm$0,02	1,12 $\pm$ 0,08	1,06 $\pm$ 0,05	0,99 $\pm$ 0,05	1,07 $\pm$ 0,08
Lisina	1 $\pm$ 0,08	1,20 $\pm$ 0,09	1,01 $\pm$ 0,08	1,15 $\pm$ 0,12	1,32$\pm$0,07	1,29$\pm$0,06	1,13 $\pm$ 0,11
Metionina	1 $\pm$ 0,04	1,14 $\pm$ 0,11	0,98 $\pm$ 0,04	1,19$\pm$0,06	1,23 $\pm$ 0,12	1,30$\pm$0,12	1,17 $\pm$ 0,14
Ornitina	1 $\pm$ 0,08	1,27 $\pm$ 0,13	1,14 $\pm$ 0,16	1,03 $\pm$ 0,07	1,20 $\pm$ 0,05	1,44$\pm$0,13	0,88 $\pm$ 0,07
Prolina	1 $\pm$ 0,06	1,14 $\pm$ 0,12	1,20 $\pm$ 0,09	1,26 $\pm$ 0,11	1,04 $\pm$ 0,07	0,81$\pm$0,05	0,99 $\pm$ 0,09
Serina	1 $\pm$ 0,07	2,14$\pm$0,19	2,38$\pm$0,18	1,56$\pm$0,15	1,99$\pm$0,18	2,03$\pm$0,15	1,90$\pm$0,21
Treonina	1 $\pm$ 0,03	1,40$\pm$0,08	1,46$\pm$0,04	1,33$\pm$0,08	1,44$\pm$0,07	1,32$\pm$0,06	1,33$\pm$0,11
Valina	1 $\pm$ 0,02	1,18$\pm$0,05	1,28$\pm$0,02	1,20$\pm$0,07	1,17$\pm$0,04	1,04 $\pm$ 0,08	1,08 $\pm$ 0,06

Tabla 6

Aminoácidos	WT aCO ₂	OexPGDH1 L1 aCO ₂	OexPGDH1 L2 aCO ₂	TriOex1- 40 aCO ₂	TriOex2-4 aCO ₂	TriOex2- 47 aCO ₂	TriOex2-49 aCO ₂
Ácido aspártico	1±0,08	1,26±0,08	1,23±0,03	1,05±0,04	1,17±0,04	1,31±0,04	1,15±0,05
Alanina	1±0,10	0,90±0,12	1,12±0,22	1,14±0,17	1,04±0,15	1,01±0,16	1,08±0,16
Alanina, β	1±0,08	1,16±0,07	1,19±0,08	1,07±0,06	1,23±0,08	1,23±0,07	1,01±0,08
Asparagina	1±0,10	1,80±0,23	1,77±0,19	1,32±0,10	1,85±0,17	2,01±0,24	1,59±0,25
Fenilalanina	1±0,09	1,48±0,07	1,29±0,02	1,16±0,06	1,58±0,05	1,69±0,06	1,49±0,07
Glicina	1±0,03	1,59±0,06	1,67±0,05	1,07±0,06	1,51±0,04	1,77±0,08	1,32±0,05
Glutamato	1±0,17	1,61±0,19	1,57±0,17	1,16±0,09	1,48±0,14	1,79±0,13	1,41±0,17
Glutamina	1±0,13	1,82±0,15	2,09±0,1	1,26±0,10	1,70±0,10	2,06±0,16	1,41±0,19
Homoserina	1±0,04	1,32±0,06	1,29±0,06	1,16±0,08	1,17±0,04	1,43±0,03	1,19±0,06
Isoleucina	1±0,04	1,02±0,02	0,92±0,02	1,04±0,04	0,98±0,01	1,10±0,03	0,99±0,03
Leucina	1±0,04	1,12±0,02	1,04±0,02	1,09±0,04	1,09±0,02	1,15±0,03	1,02±0,02
Lisina	1±0,07	0,97±0,02	0,84±0,03	0,88±0,05	0,95±0,04	1,12±0,05	0,88±0,04
Metionina	1±0,07	1,05±0,04	1,16±0,07	1,07±0,09	1,06±0,06	1,33±0,09	1,19±0,07
Ornitina	1±0,12	1,01±0,08	0,95±0,08	1,00±0,07	1,01±0,06	1,31±0,10	1,09±0,12
Prolina	1±0,05	1,02±0,08	1,02±0,02	0,98±0,03	1,06±0,05	0,95±0,04	0,87±0,02
Serina	1±0,05	5,43±0,18	5,06±0,10	1,49±0,08	4,74±0,13	5,99±0,23	4,50±0,21
Treonina	1±0,05	1,58±0,07	1,54±0,03	1,19±0,06	1,69±0,03	1,87±0,05	1,54±0,08
Valina	1±0,04	1,19±0,03	1,10±0,01	1,09±0,04	1,17±0,02	1,25±0,03	1,11±0,03

El análisis metabólico se realizó también en plantas cultivadas en altas concentraciones de CO₂. En este caso, se observó un aumento generalizado de prácticamente todos los aminoácidos en la parte aérea de las líneas sobre-expresoras, con especial atención a los aminoácidos esenciales isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, metionina y valina (Tabla 7). En raíces también se observó un aumento de fenilalanina y treonina (Tabla 8).

Las Tablas 7 y 8 muestran los niveles de aminoácidos en la parte aérea (Tabla 7) y en raíces (Tabla 8) de las líneas sobreexpresoras del gen PGDH1 (OexPGDH1-L1 y OexPGDH1-L2) y las líneas triple sobreexpresoras (TriOex1-40, TriOex2- 4, TriOex2-47 y TriOex2-49) comparados con la línea de la planta silvestre (WT) en condiciones de elevado CO₂ (eCO₂; 2500 ppm). Los datos representan valores relativos normalizados respecto a la media calculada para las plantas silvestres (WT) (media ± SE de al menos 6 determinaciones independientes). Los valores que son significativamente diferentes a la planta silvestre (WT) están resaltados en negrita (T-test, P < 0,05).

Tabla 7

Aminoácidos	WT eCO ₂	Oex PGDH1 L1 eCO ₂	OexPGDH1 L2 eCO ₂	TriOex1- 40 eCO ₂	TriOex2-4 eCO ₂	TriOex2- 47 eCO ₂	TriOex2- 49 eCO ₂
Ácido aspártico	1±0,02	1,74±0,08	1,62±0,07	1,33±0,03	1,45±0,21	1,59±0,08	1,62±0,07
Alanina	1±0,11	0,74±0,16	0,80±0,12	0,92±0,11	0,63±0,09	0,99±0,21	1,14±0,21
Alanina, β	1±0,09	1,47±0,10	1,65±0,07	1,42±0,13	1,77±0,11	1,75±0,22	1,67±0,18
Asparagina	1±0,12	2,10±0,27	1,93±0,24	1,73±0,35	2,91±0,64	2,27±0,41	1,70±0,34
Fenilalanina	1±0,05	1,35±0,13	1,73±0,09	1,51±0,05	2,31±0,36	1,98±0,17	1,53±0,08
Glicina	1±0,05	1,46±0,11	1,77±0,10	1,50±0,14	1,66±0,1	1,79±0,11	1,43±0,16
Glutamato	1±0,05	1,85±0,12	2,11±0,12	1,70±0,17	2,54±0,07	2,20±0,15	1,72±0,20
Glutamina	1±0,13	1,91±0,16	1,61±0,12	1,41±0,10	2,81±0,21	1,79±0,11	1,22±0,18
Homoserina	1±0,05	1,30±0,09	1,62±0,11	1,52±0,18	1,70±0,15	1,89±0,17	1,29±0,19
Isoleucina	1±0,03	1,51±0,09	1,52±0,03	1,39±0,07	1,94±0,11	1,65±0,14	1,68±0,11
Leucina	1±0,03	1,51±0,10	1,53±0,03	1,37±0,05	2,01±0,15	1,71±0,16	1,78±0,13
Lisina	1±0,06	1,37±0,14	1,98±0,16	1,85±0,26	2,60±0,20	2,55±0,33	1,95±0,23
Metionina	1±0,12	1,11±0,15	2,03±0,31	2,08±0,29	1,54±0,41	1,89±0,36	1,91±0,39
Ornitina	1±0,06	1,18±0,12	1,90±0,31	1,97±0,29	2,73±0,24	3,08±0,27	1,69±0,28
Prolina	1±0,02	1,83±0,14	1,38±0,06	1,22±0,05	2,02±0,54	1,26±0,08	1,68±0,23
Serina	1±0,03	2,53±0,12	2,81±0,06	1,61±0,10	2,78±0,10	3,11±0,13	2,80±0,25
Treonina	1±0,02	1,79±0,11	2,02±0,04	1,57±0,08	2,16±0,08	2,21±0,09	2,01±0,15
Valina	1±0,03	1,59±0,08	1,58±0,04	1,33±0,05	1,85±0,10	1,66±0,12	1,57±0,09

Tabla 8

Aminoácidos	WT eCO ₂	OexPGDH1 L1 eCO ₂	OexPGDH1 L2 eCO ₂	TriOex1- 40 eCO ₂	TriOex2-4 eCO ₂	TriOex2- 47 eCO ₂	TriOex2- 49 eCO ₂
Ácido aspártico	1±0,04	1,39±0,04	1,03±0,03	1,01±0,06	1,68±0,06	1,30±0,06	1,12±0,07
Alanina	1±0,15	1,40±0,19	0,93±0,16	0,81±0,14	1,05±0,15	0,83±0,13	0,96±0,22
Alanina, β	1±0,02	1,71±0,07	1,38±0,06	1,16±0,05	1,90±0,07	1,57±0,07	1,34±0,05
Asparagina	1±0,03	1,77±0,13	1,15±0,09	1,06±0,12	2,51±0,27	1,60±0,17	1,26±0,08
Fenilalanina	1±0,06	1,93±0,10	1,43±0,04	1,27±0,04	2,33±0,15	1,71±0,06	1,33±0,09
Glicina	1±0,02	1,59±0,04	1,41±0,04	1,18±0,03	1,84±0,06	1,73±0,05	1,34±0,06
Glutamato	1±0,03	1,65±0,08	1,17±0,06	1,02±0,05	2,35±0,13	1,61±0,11	1,32±0,09
Glutamina	1±0,05	1,91±0,09	1,34±0,08	1,12±0,05	2,78±0,15	1,77±0,09	1,44±0,10
Homoserina	1±0,02	1,44±0,02	1,15±0,04	1,08±0,06	1,56±0,06	1,38±0,04	1,03±0,14
Isoleucina	1±0,07	1,06±0,02	0,86±0,04	1,01±0,02	1,43±0,03	1,15±0,04	0,93±0,09
Leucina	1±0,06	1,16±0,03	0,95±0,05	1,07±0,02	1,62±0,05	1,30±0,04	1,02±0,08
Lisina	1±0,05	1,30±0,05	0,98±0,05	1,16±0,09	1,81±0,07	1,50±0,07	0,99±0,14
Metionina	1±0,07	1,12±0,06	1,18±0,06	1,06±0,09	1,42±0,09	1,27±0,10	1,03±0,09
Ornitina	1±0,11	1,06±0,05	0,81±0,05	1,03±0,07	1,81±0,06	1,49±0,10	0,96±0,16
Prolina	1±0,04	1,84±0,08	0,93±0,04	0,97±0,02	1,65±0,07	1,17±0,04	1,10±0,07
Serina	1±0,04	4,58±0,12	3,43±0,10	1,37±0,05	4,37±0,11	4,54±0,15	3,47±0,15
Treonina	1±0,06	1,65±0,03	1,23±0,06	1,11±0,04	2,18±0,06	1,63±0,05	1,35±0,10
Valina	1±0,06	1,23±0,02	0,96±0,04	1,03±0,03	1,58±0,04	1,25±0,03	1,02±0,08

Estos resultados, indican que el efecto de la sobre-expresión de la proteína PGDH1 de *Arabidopsis thaliana* sobre el contenido de aminoácidos es especialmente relevante en condiciones de elevado CO₂ en la parte aérea, puesto que en estas condiciones los niveles de algunos aminoácidos, como los aminoácidos esenciales isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, valina o treonina se reducen en plantas control comparadas con las condiciones de CO₂ ambiental (**Tabla 9**).

La **Tabla 9** muestra los niveles de aminoácidos en la parte aérea de la línea control (WT), las líneas sobreexpresoras del gen PGDH1 (OexPGDH1-L1 y OexPGDH1-L2) y las líneas triple sobreexpresoras (TriOex1-40, TriOex2-4, TriOex2-47 y TriOex2-49) en condiciones de elevado CO₂ (eCO₂; 2500 ppm) comparados con la planta silvestre (WT) crecida en condiciones de CO₂ ambiental (aCO₂; 400 ppm). Los datos representan valores relativos normalizados respecto a la media calculada para la planta silvestre (WT) en CO₂ ambiental (media $\pm$ SE de al menos 6 determinaciones independientes). Los valores que son significativamente diferentes a la planta silvestre (WT) están resaltados en negrita (T-test, $P < 0,05$).

Tabla 9

Aminoácidos	WT aCO ₂	WT eCO ₂	OexPGDH 1 L1 eCO ₂	OexPGDH 1 L2 eCO ₂	TriOex1 -40 eCO ₂	TriOex2-4 eCO ₂	TriOex2- 47 eCO ₂	TriOex2 -49 eCO ₂
Ácido aspártico	1± 0,06	1,19± 0,03	2,06±0,09	1,92±0,08	1,58± 0,04	1,72±0,26	1,88±0,10	1,92± 0,08
Alanina	1± 0,11	0,75± 0,08	0,55±0,12	0,60±0,09	0,69± 0,08	0,47±0,07	0,74±0,16	0,85± 0,16
Alanina, β	1± 0,03	0,85± 0,07	1,26±0,08	1,41±0,06	1,21± 0,11	1,51±0,10	1,49±0,19	1,42± 0,15
Asparagina	1± 0,19	1,74± 0,20	3,65±0,48	3,35±0,42	3,01± 0,62	5,05±1,12	3,94±0,71	2,96± 0,59
Fenilalanina	1± 0,03	0,70± 0,04	0,94±0,09	1,21±0,07	1,06± 0,03	1,61±0,25	1,38±0,12	1,07± 0,05
Glicina	1± 0,04	0,17± 0,01	0,25±0,02	0,31±0,02	0,26± 0,02	0,29±0,02	0,31±0,02	0,25± 0,03
Glutamato	1± 0,08	1,19± 0,06	2,19±0,14	2,50±0,14	2,02± 0,21	3,02±0,09	2,61±0,18	2,05± 0,23
Glutamina	1± 0,13	6,92± 0,88	13,22±1,11	9,73±1,55	9,73± 0,70	19,43±1,4 8	12,41±0,7 4	8,42± 1,22
Homoserina	1± 0,05	0,59± 0,03	0,76±0,05	0,95±0,07	0,89± 0,11	1,00±0,09	1,11±0,10	0,76± 0,11
Isoleucina	1± 0,03	0,55± 0,02	0,83±0,05	0,84±0,02	0,77± 0,04	1,07±0,06	0,91±0,08	0,93± 0,06
Leucina	1± 0,04	0,51± 0,02	0,78±0,05	0,78±0,02	0,70± 0,03	1,03±0,08	0,88±0,08	0,91± 0,06
Lisina	1± 0,08	0,42± 0,02	0,57±0,06	0,82±0,07	0,77± 0,11	0,91±0,18	1,06±0,14	0,81± 0,10
Metionina	1± 0,04	0,40± 0,05	0,44±0,06	0,80±0,12	0,83± 0,12	0,61±0,16	0,75±0,14	0,76± 0,15
Ornitina	1±0,0 8	0,39±0,0 2	0,46±0,05	0,74±0,12	0,77± 0,11	1,06±0,09	1,20±0,10	0,66± 0,11
Prolina	1±0,0 6	0,24±0,0 1	0,45±0,03	0,34±0,01	0,30± 0,01	0,49±0,13	0,31±0,02	0,41± 0,06
Serina	1±0,0 7	0,52±0,0 1	1,31±0,06	1,46±0,03	0,83± 0,05	1,44±0,05	1,61±0,07	1,45± 0,13
Treonina	1±0,0 3	0,63±0,0 2	1,12±0,07	1,27±0,02	0,98± 0,05	1,36±0,05	1,39±0,06	1,26± 0,09
Valina	1±0,0 2	0,63±0,0 2	1,01±0,05	1,01±0,02	0,85± 0,03	1,17±0,06	1,05±0,07	1,00± 0,06

Se procedió a cuantificar los niveles de almidón y proteínas en las líneas sobre-expresoras de la proteína PGDH1 de *Arabidopsis thaliana* en condiciones de CO₂ ambiental y en condiciones de elevado CO₂.

En condiciones de CO₂ ambiental se observó un incremento significativo en el contenido de almidón respecto del control, en la parte aérea de cuatro de las líneas sobre-expresoras analizadas (TriOex2-47, TriOex1-40, Oex PGDH1-L1 y Oex PGDH1-L2) (**Figura 3A**). Este aumento pudo observarse en la parte aérea de todas las líneas sobre-expresoras cuando las plantas se cultivaron en condiciones de elevado CO₂ (**Figura 3A**). No se observaron diferencias significativas en raíces entre plantas sobre-expresoras y controles en ninguna de las condiciones ensayadas (**Figura 3B**).

En condiciones de cultivo en presencia de altas concentraciones de elevado CO₂, las plantas sintetizan y almacenan más almidón en detrimento del contenido proteico. Esto es en parte debido a que la enzima Rubisco actúa mayoritariamente con actividad carboxilasa con lo que todo el D-3-fosfoglicerato formado entre en el ciclo de Calvin para sintetizar azúcares. Se comprobó que tanto las plantas controles como las sobre-expresoras de la proteína PGDH1 de *Arabidopsis thaliana* tenían mayor contenido en almidón en estas condiciones, pero las sobre-expresoras siempre mostraron mayores niveles que los controles (**Figura 3**). Por otra parte, todas las líneas mostraron menor contenido en proteínas en estas condiciones de elevado CO₂, pero esta reducción del contenido proteico fue menor en las líneas sobre-expresoras que en los controles tanto en parte aérea como en raíces (**Figura 3C y Figura 3D**). Así, las plantas sobre-expresoras de la proteína PGDH1 de *Arabidopsis thaliana* tuvieron mayor contenido en proteínas que los controles tanto en condiciones ambientales de CO₂ como en condiciones de elevado CO₂ (**Figura 3C y Figura 3D**). Además, en condiciones de elevado CO₂, el contenido proteico en las líneas sobre-expresoras fue similar o incluso superior al valor del control en condiciones de CO₂ ambiental (**Figura 3C y Figura 3D**).

Los resultados obtenidos demuestran que el efecto estimulador de la sobre-expresión de la proteína PGDH1 de *Arabidopsis thaliana* sobre el metabolismo de los aminoácidos implica a su vez un aumento del contenido proteico en las líneas de *Arabidopsis thaliana* sobre-expresoras y, sorprendentemente, un mayor contenido de almidón con respecto al control sin que afecte al crecimiento de la planta. Por una parte, el mayor contenido de serina de la ruta fosforilativa de biosíntesis de serina puede estimular la síntesis del resto de aminoácidos que activa la síntesis proteica. Por otra parte, el mayor contenido de serina de la ruta fosforilativa de biosíntesis de serina implicaría que un menor contenido de la serina fotorrespiratoria salga del ciclo y que se recicle de nuevo a D-3-fosfoglicerato, aumentando de este modo la asimilación de azúcares y finalmente almacenándose en forma de almidón.

Los resultados obtenidos también demuestran que el aumento de los niveles de CO₂ atmosférico afecta a la homeostasis del carbono y del nitrógeno, favoreciendo el metabolismo de los carbohidratos y reduciendo el de aminoácidos y proteínas. El efecto de la ruta fosforilativa de biosíntesis de serina sobre la homeostasis carbohidratos/proteínas es más evidente en condiciones de cambio climático. Los resultados obtenidos demuestran que la ingeniería genética de la ruta fosforilativa de biosíntesis de serina es extremadamente útil

como estrategia para aumentar la calidad nutricional de las plantas en especial en condiciones de actividad fotorrespiratoria reducida asociada al aumento del CO₂ atmosférico.

Ejemplo 3. Caracterización de plantas de maíz que sobre-expresan el gen *PGDH1* de *Arabidopsis thaliana*

Se estudió la contribución de la sobre-expresión de la proteína PGDH1 de *Arabidopsis thaliana* en una especie con metabolismo C₄, como es el maíz, con una menor tasa fotorrespiratoria que *Arabidopsis thaliana* y por tanto con menor actividad de la ruta del glicolato. Para ello se analizó el contenido de almidón y proteínas en plantas transgénicas de maíz sobre-expresoras del gen *PGDH1* de *Arabidopsis thaliana* (ZmOex PGDH1) cultivadas en invernadero con concentraciones de CO₂ ambiental. En este caso, no solo se obtuvieron resultados de las hojas y raíces, sino que también se midieron los contenidos en los tallos de tres líneas ZmOex PGDH1 (ZmOex PGDH1-22, ZmOex PGDH1-27 y ZmOex PGDH1-31) junto con la línea control (WT).

Respecto al almidón, en plantas heterocigotas de maíz para el transgen *PGDH1*, dos de las líneas sobre-expresoras de la proteína PGDH1 de *Arabidopsis thaliana* (ZmOex PGDH1-22 y ZmOex PGDH1-27) aumentaron de manera significativa su contenido tanto en hojas como en tallos comparado con el control (**Figura 4A y Figura 4B**). Una tercera línea también incrementó el contenido de almidón en tallos (ZmOex PGDH1-31). Este aumento osciló entre un 8% y un 61% dependiendo de las líneas indicando que hay mucha variabilidad entre líneas. Con el fin de dar mayor robustez al análisis estadístico, se hizo un análisis de todas las líneas sobre-expresoras en su conjunto (ZmOex PGDH1), y se compararon con las líneas controles. Así se observó un aumento significativo del contenido de almidón en las líneas sobre-expresoras con respecto a los controles en torno a un 29% en hojas y un 42% en tallos.

Respecto a las proteínas, en plantas heterocigotas de maíz para el transgen *PGDH1*, todas las líneas mostraron un mayor contenido que los controles en hojas y tallos, oscilando entre un 5% y un 25% con respecto al control, aunque solo fue significativo en una línea en tallos (**Figura 4D y Figura 4E**).

Por ello, tras obtener líneas homocigotas de maíz para el transgen *PGDH1*, se realizaron nuevos experimentos y se observó una línea con aumento significativo en el contenido de

proteínas en hojas y tres líneas con aumento significativo en tallos (**Tabla 10**). El análisis conjunto de todas las líneas mostró un aumento significativo entre un 9 y un 18 % del contenido proteico en hojas y tallos respectivamente. La **Tabla 10** muestra el contenido de proteínas en hojas y tallos de plantas de maíz sobre-expesoras del gen *PGDH1* de *Arabidopsis thaliana*. Los datos son o bien de líneas individuales (ZmOex PGDH1-22 y ZmOex PGDH1-27 y ZmOex PGDH1-31) o del conjunto de todas las líneas (ZmOex PGDH1). El material procede de plantas cultivadas en invernadero durante 15 días en condiciones ambientales de CO₂. Los valores representan la media del tanto por 1 respecto al control de plantas silvestres (WT) $\pm$ SE ($n \geq 30$ réplicas biológicas). (*) representa diferencias significativas respecto al control silvestres (WT; T-test, $P < 0,05$).

Tabla 10

Líneas	Contenido relativo		
	Hojas	Tallos	Grano
WT	1,00 $\pm$ 0,03	1,00 $\pm$ 0,03	1,00 $\pm$ 0,01
ZmOex PGDH1- 22	1,06 $\pm$ 0,03	1,14 $\pm$ 0,03*	1,03 $\pm$ 0,02
ZmOex PGDH1- 27	1,07 $\pm$ 0,03	1,18 $\pm$ 0,05*	1,02 $\pm$ 0,02
ZmOex PGDH1- 31	1,15 $\pm$ 0,04*	1,23 $\pm$ 0,05*	1,05 $\pm$ 0,02*
ZmOex PGDH1	1,09 $\pm$ 0,02*	1,18 $\pm$ 0,02*	1,03 $\pm$ 0,01

Finalmente, se determinó el contenido de almidón y proteínas en el grano de maíz de las líneas que sobre-expresan la proteína PGDH1 de *Arabidopsis thaliana*. Tal como en casos anteriores y para aumentar la robustez del análisis estadístico, se compararon los datos de las tres líneas sobre-expesoras en su conjunto. En el caso del almidón, se observó un aumento significativo del contenido en almidón del 6,7%. En proteínas solo se observó un aumento del 2,6% que no fue significativo (**Figura 4**). Los mayores porcentajes de incremento en tallos y hojas con respecto al grano pueden atribuirse en parte a que algunas de las plantas madre no fueron homocigotas, y por consiguiente algunos de los granos procedentes de estas líneas no serán transgénicos. La repetición de estos experimentos obtenidos de granos de líneas homocigotas mejoró estos resultados. Así, el contenido de proteínas también aumentó de forma significativa en el grano en una de las líneas estudiadas un 5%, mientras que en las otras dos el aumento fue entre el 2 y el 3% (**Tabla 10**).

Un análisis de la expresión génica del gen *PGDH1* en las líneas transgénicas, indicó que las líneas ZmOex PGDH1-27 y ZmOex PGDH1-31 son las muestran mayor nivel de expresión del transgén en todos los órganos estudiados (**Figura 5**).

Adicionalmente, se estudió la contribución de la sobre-expresión de la proteína PGDH1 de *Arabidopsis thaliana* en condiciones de elevado CO₂ en una especie con metabolismo fotosintético C₄, como es el maíz. Las plantas con metabolismo fotosintético C₄ en principio presentan una menor tasa fotorrespiratoria que las plantas con metabolismo C₃, pero no nula, por lo que es importante conocer los efectos de la proteína PGDH1 de *Arabidopsis thaliana* en este tipo de metabolismos tanto en CO₂ ambiente como en elevado CO₂. Para ello se analizó el contenido de proteínas en plantas transgénicas de maíz sobre-expresoras del gen *PGDH1* en homocigosis de *Arabidopsis thaliana* (ZmOex PGDH1). En este caso, se obtuvieron resultados en hojas y tallos de tres líneas ZmOex PGDH1 (ZmOex PGDH1-22, ZmOex PGDH1-27 y ZmOex PGDH1-31) junto con la línea control de plantas silvestres (WT).

Respecto al contenido en proteínas, todas las líneas mostraron un mayor contenido que los controles en hojas, siendo entre el 14% y el 22% en el mejor de los casos (**Tabla 11**). En tallos, las líneas con mayor nivel de expresión de PGDH1 también mostraron un aumento significativo del contenido en proteínas, siendo entre un 17% y un 38% mayor que en los controles (**Tabla 11**). Se presenta también el análisis de todas las líneas sobreexpresoras en su conjunto (ZmOex PGDH1) con respecto al control de plantas silvestres (WT). En ese caso, el contenido en proteínas de hojas y tallos aumentó de forma significativa un 18% y un 20% respectivamente respecto al control de plantas silvestres (WT) (**Tabla 11**). Los datos son o bien de líneas individuales (ZmOex PGDH1-22 y ZmOex PGDH1-27 y ZmOex PGDH1-31) o del conjunto de todas las líneas (ZmOex PGDH1). El material procede de plantas cultivadas en invernadero durante 15 días en presencia de 2000 ppms de CO₂. Los valores representan la media del tanto por 1 respecto al control de plantas silvestres (WT) ± SE (n ≥ 30 réplicas biológicas). (*) representa diferencias significativas respecto al control de plantas silvestres (WT; T-test, P < 0,05).

Tabla 11

Líneas	Contenido relativo	
	Hojas	Tallos
WT	1,00 ± 0,02	1,00 ± 0,04
ZmOex PGDH1- 22	1,15 ± 0,02*	1,04 ± 0,05
ZmOex PGDH1- 27	1,16 ± 0,04*	1,17 ± 0,05*
ZmOex PGDH1- 31	1,22 ± 0,03*	1,39 ± 0,08*
ZmOex PGDH1	1,18 ± 0,02*	1,20 ± 0,04*

Es importante señalar que el aumento en contenido proteico se produjo sin reducción significativa del crecimiento de la parte aérea en dos de las líneas sobre-expresoras como se muestra en la **Figura 6**. Solo la línea ZmOex PGDH1-31 mostró una reducción de su crecimiento del 15%. Pero esta reducción fue menor que el incremento del 22% y 39% del aumento del contenido proteico en hojas y tallos respectivamente en esta línea.

LISTA DE REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Mizokami et al. (2019). Elevated CO₂-induced changes in mesophyll conductance and anatomical traits in wild type and carbohydrate-metabolism mutants of Arabidopsis. J Exp Bot.;70(18):4807-4818. doi: 10.1093/jxb/erz208

Myers et al. (2019). Increasing CO₂ threatens human nutrition. Nature.;510(7503):139-42. doi: 10.1038/nature13179. Erratum in: Nature. (2019);574(7778):E14.

REIVINDICACIONES

1. Una planta genéticamente modificada para sobre-expresar un gen que codifica para la proteína D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (PGDH1), en la que la secuencia aminoacídica de dicha proteína PGDH1 tiene una identidad de al menos 65% respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1 y en la que dicha planta no es de la especie *Arabidopsis thaliana*.
5
2. La planta según la reivindicación 1, en la que la secuencia aminoacídica de dicha proteína PGDH1 tiene una identidad de al menos 75% respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1.
10
3. La planta según la reivindicación 1 o 2, en la que la secuencia aminoacídica de dicha proteína PGDH1 tiene una identidad de al menos 85% respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1.
15
4. La planta según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la secuencia aminoacídica de dicha proteína PGDH1 tiene una identidad de al menos 95% respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 20 5. La planta según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la secuencia aminoacídica del dominio catalítico de dicha proteína PGDH1 tiene una identidad de al menos 75% respecto a la secuencia SEQ ID NO: 2.
- 25 6. La planta según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que, en el dominio catalítico de dicha proteína PGDH1 al menos uno de los aminoácidos es:
 - leucina en la posición 65;
 - leucina en la posición 78;
 - arginina en la posición 108;
 - serina en la posición 109;
 - 30 - treonina en la posición 111;
 - alanina en la posición 142;
 - alanina en la posición 143;
 - alanina en la posición 162;
 - ácido glutámico en la posición 163;
 - 35 - arginina en la posición 291;

- glicina en la posición 292;
 - leucina en la posición 300;
 - ácido aspártico en la posición 315;
 - valina en la posición 316;
 - 5 - fenilalanina en la posición 317;
 - ácido glutámico en la posición 320;
 - prolina en la posición 321;
 - prolina en la posición 338;
 - histidina en la posición 339;
 - 10 - glicina en la posición 341;
 - serina en la posición 343;
 - treonina en la posición 344;
 - ácido glutámico en la posición 346;
 - alanina en la posición 347; y
 - 15 - glutamina en la posición 348.
7. La planta según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la secuencia aminoacídica de dicha proteína PGDH1 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y
- 20 SEQ ID NO: 7.
8. La planta según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la secuencia aminoacídica de dicha proteína PGDH1 es la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 25 9. La planta según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que presenta un contenido superior en aminoácidos y/o en proteínas y/o en almidón respecto a una planta sin transformar.
- 30 10. La planta según la reivindicación 9, que presenta un contenido al menos 5% superior en aminoácidos y/o al menos 5% superior en proteínas y/o al menos 5% superior en almidón respecto a una planta sin transformar.
11. La planta según la reivindicación 9, que presenta un contenido al menos 5% superior en aminoácidos y/o al menos 5% superior en proteínas y/o al menos 5% superior en

almidón respecto a una planta sin transformar, en condiciones de cultivo en las que la concentración de CO₂ es de al menos 800 ppm.

- 5 12. La planta según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que la planta es de una especie de interés agronómico.
13. La planta según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la planta es de una especie con metabolismo C₃.
- 10 14. La planta según la reivindicación 13, en la que la planta se selecciona de entre tomate y brócoli.
- 15 15. La planta según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la planta es de una especie con metabolismo C₄.
16. La planta según la reivindicación 15, en la que la planta es maíz.
- 20 17. La planta según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en la que la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la proteína PGDH1 tiene una identidad de al menos 65% respecto a la secuencia SEQ ID NO: 8 o respecto a la secuencia SEQ ID NO: 9.
- 25 18. La planta según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en la que el gen que codifica para la proteína PGDH1 está operativamente ligado a un promotor constitutivo.
- 30 19. La planta según la reivindicación 18, en la que el promotor constitutivo se selecciona de entre el promotor constitutivo del gen que codifica para la ubiquitina del maíz y el promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor 35S.
- 35 20. Una célula vegetal genéticamente modificada con un vector de expresión que comprende un gen que codifica para la proteína D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (PGDH1), en la que la secuencia aminoacídica de dicha proteína PGDH1 tiene una identidad de al menos 65% respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1 y en la que dicha célula no es de *Arabidopsis thaliana*.

21. La célula según la reivindicación 20, en la que la secuencia aminoacídica de dicha proteína PGDH1 tiene una identidad de al menos 75% respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 5 22. La célula según la reivindicación 20 o 21, en la que la secuencia aminoacídica de dicha proteína PGDH1 tiene una identidad de al menos 85% respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 10 23. La célula según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, en la que la secuencia aminoacídica de dicha proteína PGDH1 tiene una identidad de al menos 95% respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 15 24. La célula según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, en la que la secuencia aminoacídica del dominio catalítico de dicha proteína PGDH1 tiene una identidad de al menos 75% respecto a la secuencia SEQ ID NO: 2.
25. La célula según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24, en la que, en el dominio catalítico de dicha proteína PGDH1 al menos uno de los aminoácidos es:
- el aminoácido en la posición 65 es leucina;
 - 20 - el aminoácido en la posición 78 es leucina;
 - el aminoácido en la posición 108 es arginina;
 - el aminoácido en la posición 109 es serina;
 - el aminoácido en la posición 111 es treonina;
 - el aminoácido en la posición 142 es alanina;
 - 25 - el aminoácido en la posición 143 es alanina;
 - el aminoácido en la posición 162 es alanina;
 - el aminoácido en la posición 163 es ácido glutámico;
 - el aminoácido en la posición 291 es arginina;
 - el aminoácido en la posición 292 es glicina;
 - 30 - el aminoácido en la posición 300 es leucina;
 - el aminoácido en la posición 315 es ácido aspártico;
 - el aminoácido en la posición 316 es valina;
 - el aminoácido en la posición 317 es fenilalanina;
 - el aminoácido en la posición 320 es ácido glutámico;
 - 35 - el aminoácido en la posición 321 es prolina;

- el aminoácido en la posición 338 es prolina;
 - el aminoácido en la posición 339 es histidina;
 - el aminoácido en la posición 341 es glicina;
 - el aminoácido en la posición 343 es serina;
 - 5 - el aminoácido en la posición 344 es treonina;
 - el aminoácido en la posición 346 es ácido glutámico;
 - el aminoácido en la posición 347 es alanina; y
 - el aminoácido en la posición 348 es glutamina.
- 10 26. La célula según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 25, en la que la secuencia aminoacídica de dicha proteína PGDH1 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7.
- 15 27. La célula según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 26, en la que la secuencia aminoacídica de dicha proteína PGDH1 es la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 20 28. La célula según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 27, que presenta un contenido superior en aminoácidos, en proteínas y en almidón respecto a una célula vegetal sin transformar.
- 25 29. La célula según la reivindicación 28, que presenta un contenido al menos 5% superior en aminoácidos y/o al menos 5% superior en proteínas y/o al menos 5% superior en almidón respecto a una célula vegetal sin transformar.
- 30 30. La célula según la reivindicación 29, que presenta un contenido al menos 5% superior en aminoácidos y/o al menos 5% superior en proteínas y/o al menos 5% superior en almidón respecto a una planta sin transformar, en condiciones de cultivo en las que la concentración de CO₂ es de al menos 800 ppm.
- 35 31. La célula según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 30, en la que la célula es de una especie de interés agronómico.
- 35 32. La célula según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 31, caracterizada en que la célula es de una especie de planta con metabolismo C₃.

33. La célula según la reivindicación 32, en la que la planta se selecciona de entre tomate y brócoli.
- 5 34. La célula según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 31, en la que la célula es de una especie de planta con metabolismo C₄.
35. La célula según la reivindicación 34, en la que la planta es maíz.
- 10 36. La célula según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 35, en la que la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la proteína PGDH1 tiene una identidad de al menos 65% respecto a la secuencia SEQ ID NO: 8 o respecto a la secuencia SEQ ID NO: 9.
- 15 37. Un constructo de expresión recombinante que comprende un gen que codifica para la proteína D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (PGDH1), en el que la secuencia aminoacídica de dicha proteína PGDH1 tiene una identidad de al menos 65% respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1 y en el que el gen que codifica para la proteína PGDH1 está operativamente ligado a un promotor constitutivo.
- 20 38. El constructo según la reivindicación 37, en el que el promotor constitutivo se selecciona de entre el promotor constitutivo del gen que codifica para la ubiquitina del maíz y el promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor 35S.
- 25 39. El constructo según la reivindicación 37 o 38, en el que la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la proteína PGDH1 tiene una identidad de al menos 65% respecto a la secuencia SEQ ID NO: 8 o respecto a la secuencia SEQ ID NO: 9.
40. Un vector de expresión recombinante que comprende el constructo según cualquiera de las reivindicaciones 37 a 39.
- 30 41. El vector según la reivindicación 40, en el que la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la proteína PGDH1 tiene una identidad de al menos 65% respecto a la secuencia SEQ ID NO: 8 o respecto a la secuencia SEQ ID NO: 9.

42. Un procedimiento para obtener una planta genéticamente modificada o una célula vegetal genéticamente modificada que comprende transformar la planta silvestre o la célula vegetal correspondiente con un vector de expresión que comprende un gen que codifica para la proteína D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (PGDH1), en el que la secuencia aminoacídica de dicha proteína PGDH1 tiene una identidad de al menos 65% respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1 y en el que dicha planta o célula vegetal no es de la especie *Arabidopsis thaliana*.
43. El procedimiento según la reivindicación 42, en el que la secuencia aminoacídica de dicha proteína PGDH1 tiene una identidad de al menos 75% respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1.
44. El procedimiento según la reivindicación 42 o 43, en el que la secuencia aminoacídica de dicha proteína PGDH1 tiene una identidad de al menos 85% respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1.
45. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 42 a 44, en el que la secuencia aminoacídica de dicha proteína PGDH1 tiene una identidad de al menos 95% respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1.
46. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 42 a 45, en el que la secuencia aminoacídica del dominio catalítico de dicha proteína PGDH1 tiene una identidad de al menos 75% respecto a la secuencia SEQ ID NO: 2.
47. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 42 a 46, en el que, en el dominio catalítico de dicha proteína PGDH1 al menos uno de los aminoácidos es:
- el aminoácido en la posición 65 es leucina;
 - el aminoácido en la posición 78 es leucina;
 - el aminoácido en la posición 108 es arginina;
 - el aminoácido en la posición 109 es serina;
 - el aminoácido en la posición 111 es treonina;
 - el aminoácido en la posición 142 es alanina;
 - el aminoácido en la posición 143 es alanina;
 - el aminoácido en la posición 162 es alanina;
 - el aminoácido en la posición 163 es ácido glutámico;

- el aminoácido en la posición 291 es arginina;
- el aminoácido en la posición 292 es glicina;
- el aminoácido en la posición 300 es leucina;
- el aminoácido en la posición 315 es ácido aspártico;
- 5 - el aminoácido en la posición 316 es valina;
- el aminoácido en la posición 317 es fenilalanina;
- el aminoácido en la posición 320 es ácido glutámico;
- el aminoácido en la posición 321 es prolina;
- el aminoácido en la posición 338 es prolina;
- 10 - el aminoácido en la posición 339 es histidina;
- el aminoácido en la posición 341 es glicina;
- el aminoácido en la posición 343 es serina;
- el aminoácido en la posición 344 es treonina;
- el aminoácido en la posición 346 es ácido glutámico;
- 15 - el aminoácido en la posición 347 es alanina; y
- el aminoácido en la posición 348 es glutamina.

48. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 42 a 47, en el que la
 20 secuencia aminoacídica de dicha proteína PGDH1 comprende una secuencia
 seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5,
 SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7.

49. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 42 a 48, en el que la
 25 secuencia aminoacídica de dicha proteína PGDH1 es la secuencia SEQ ID NO: 1.

50. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 42 a 49, en el que la planta o
 la célula vegetal es de una especie de interés agronómico.

51. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 42 a 50, en la que la planta o
 30 la célula vegetal es de una especie con metabolismo C₃.

52. El procedimiento según la reivindicación 51, en la que la planta o la célula vegetal se
 selecciona de entre tomate y brócoli.

53. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 42 a 50, en la que la planta o la célula vegetal es de una especie con metabolismo C₄.
- 5 54. El procedimiento según la reivindicación 53, en la que la planta o la célula vegetal es de maíz.
55. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 42 a 54, en el que la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la proteína PGDH1 tiene una identidad de al menos 65% respecto a la secuencia SEQ ID NO: 8 o respecto a la secuencia SEQ
10 ID NO: 9.
56. Uso de la planta de las reivindicaciones 1 a 19, o de la célula vegetal de cualquiera de las reivindicaciones 20 a 36, o del constructo de expresión recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 37 a 39, o del vector de expresión recombinante de la
15 reivindicación 40 o 41, para la producción de proteínas, aminoácidos y/o almidón.
57. Uso según la reivindicación 56, en el que la célula vegetal o la planta se cultiva en condiciones en las que la concentración de CO₂ es de al menos 800 ppm.

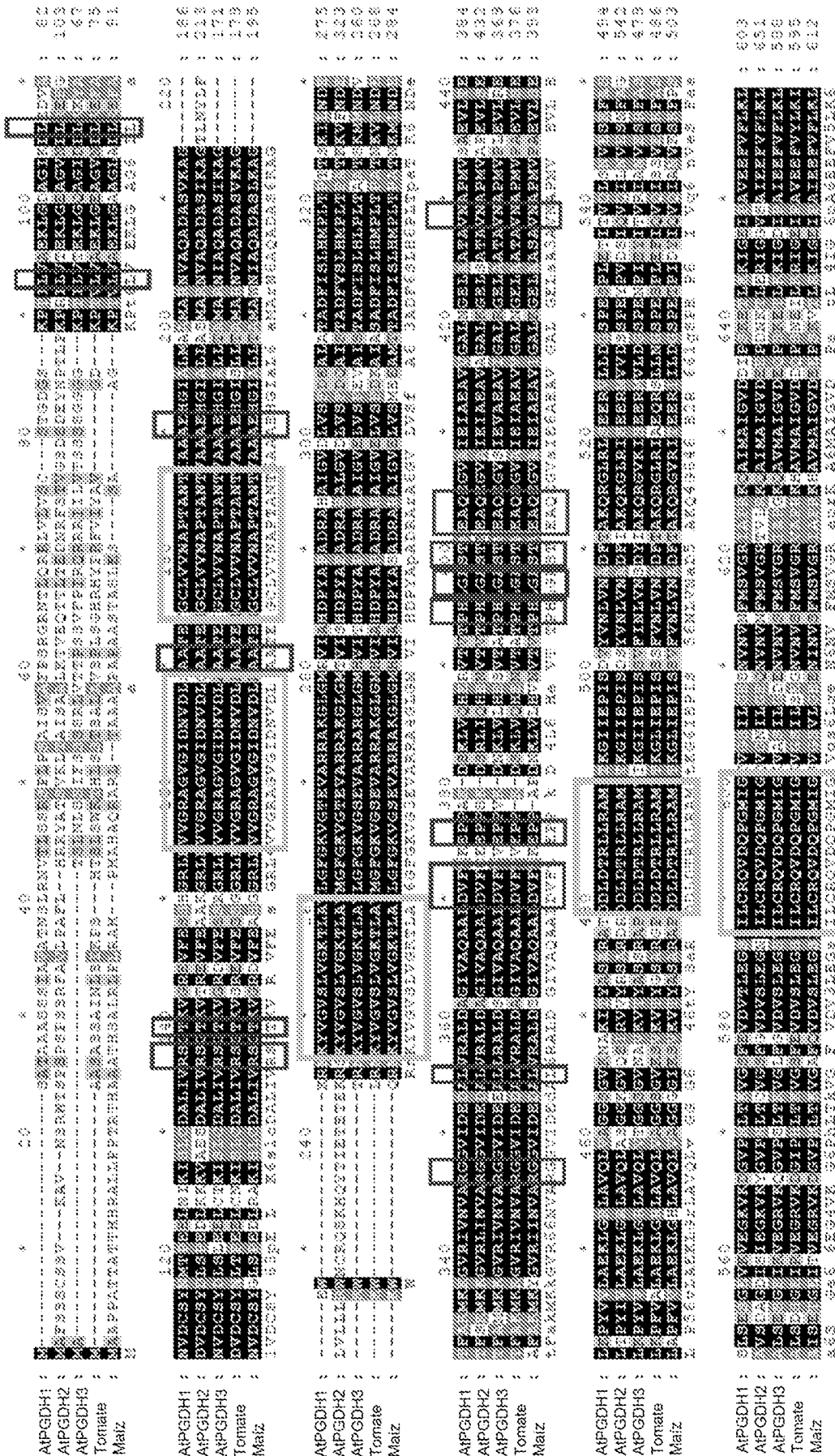


FIGURA 1

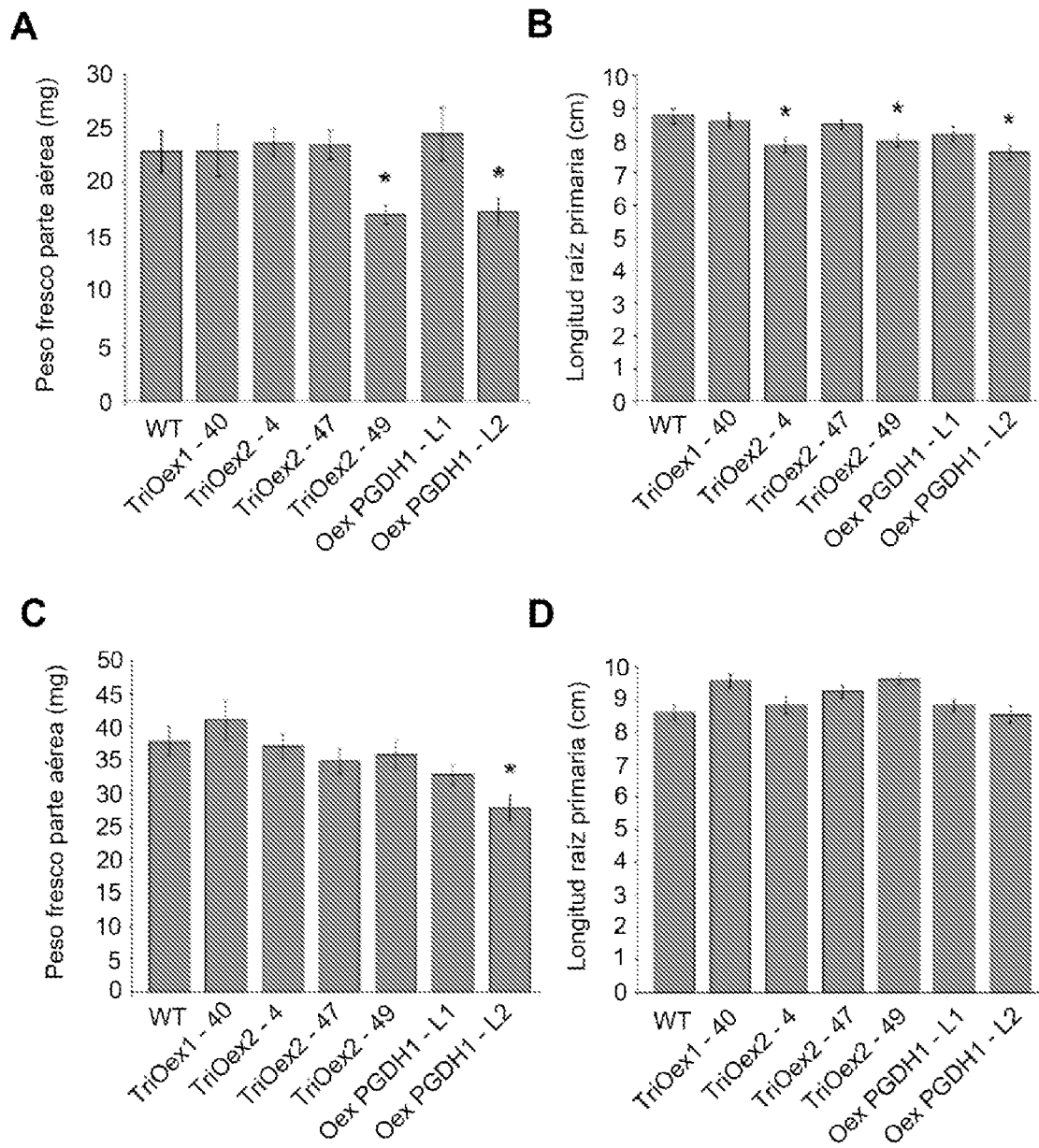


FIGURA 2

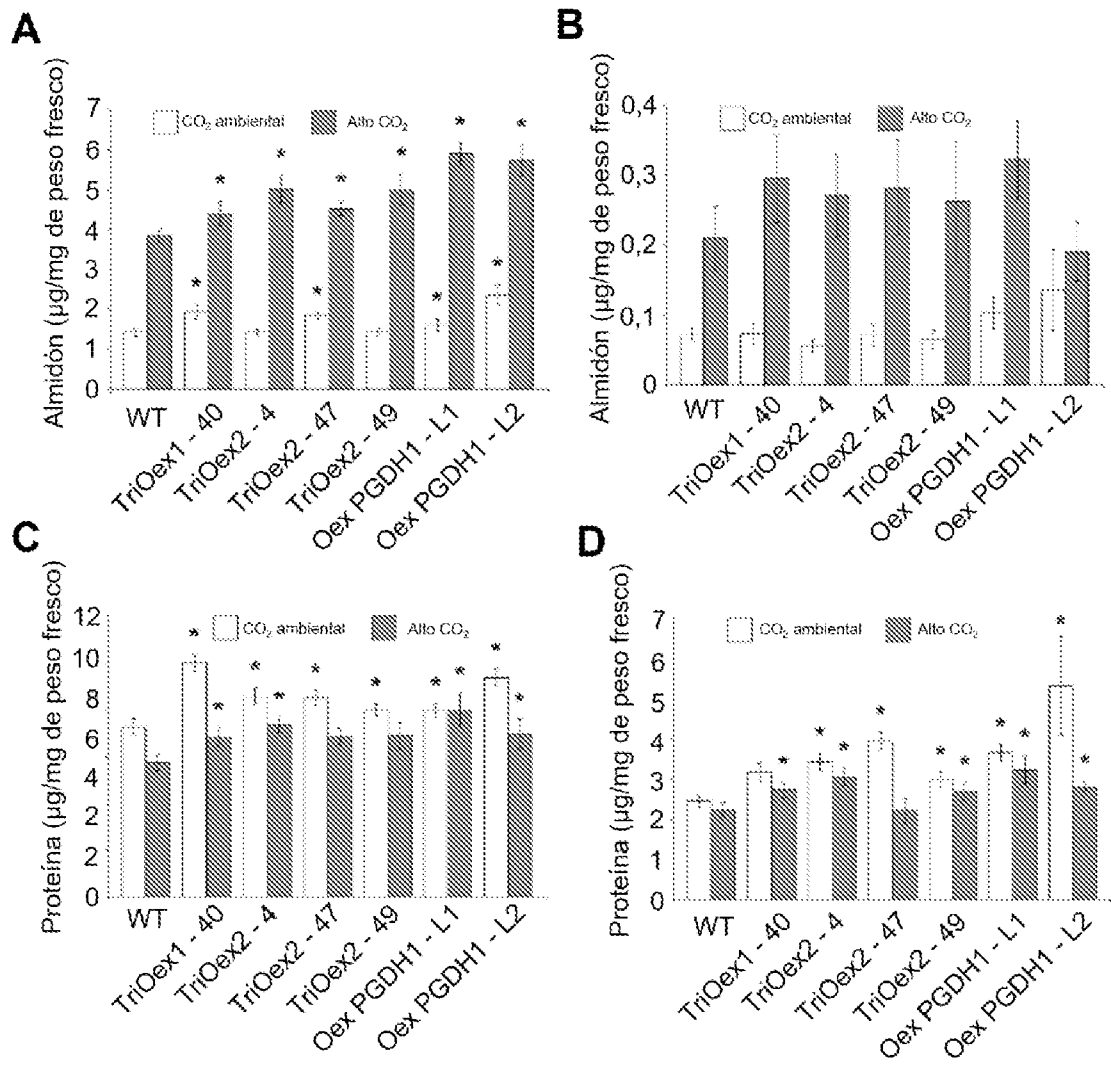


FIGURA 3

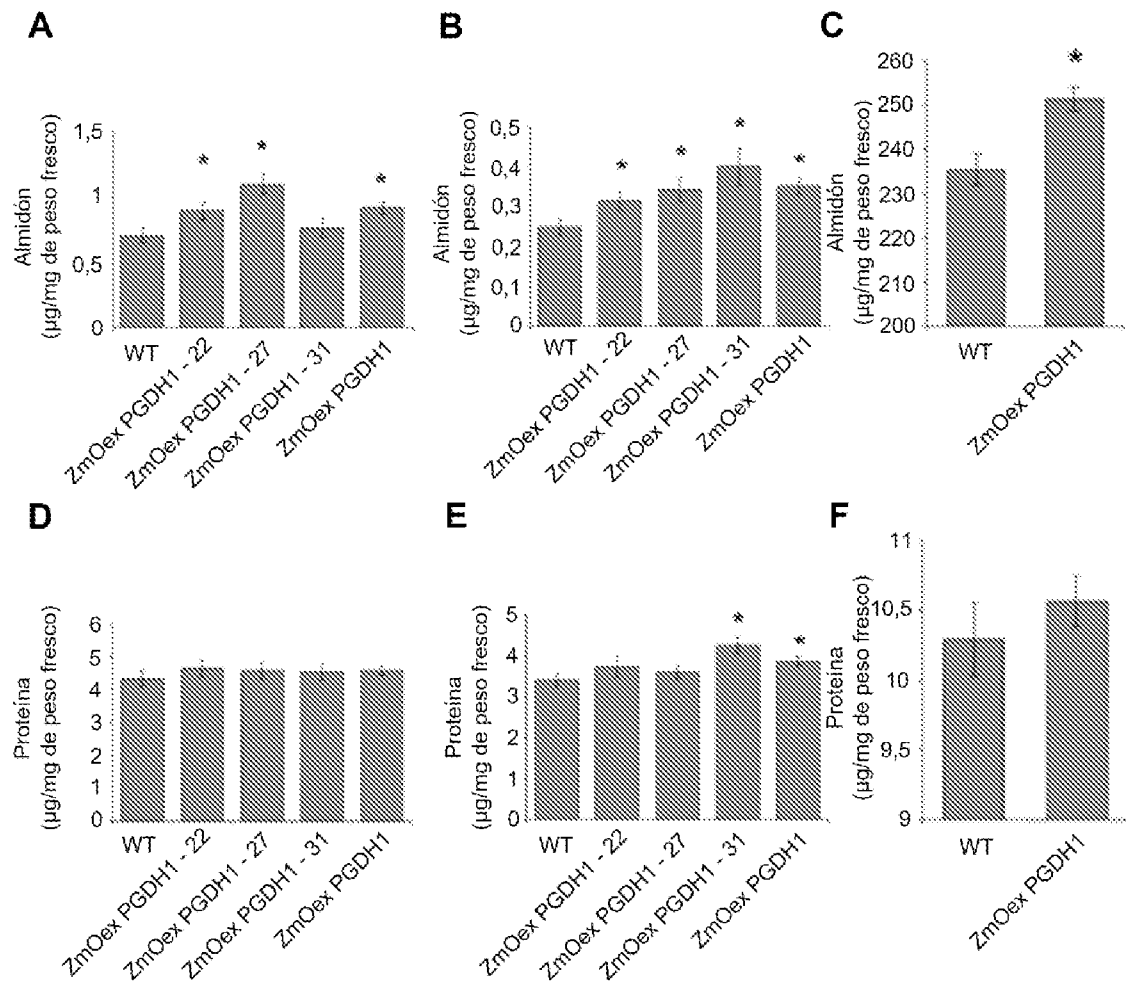


FIGURA 4

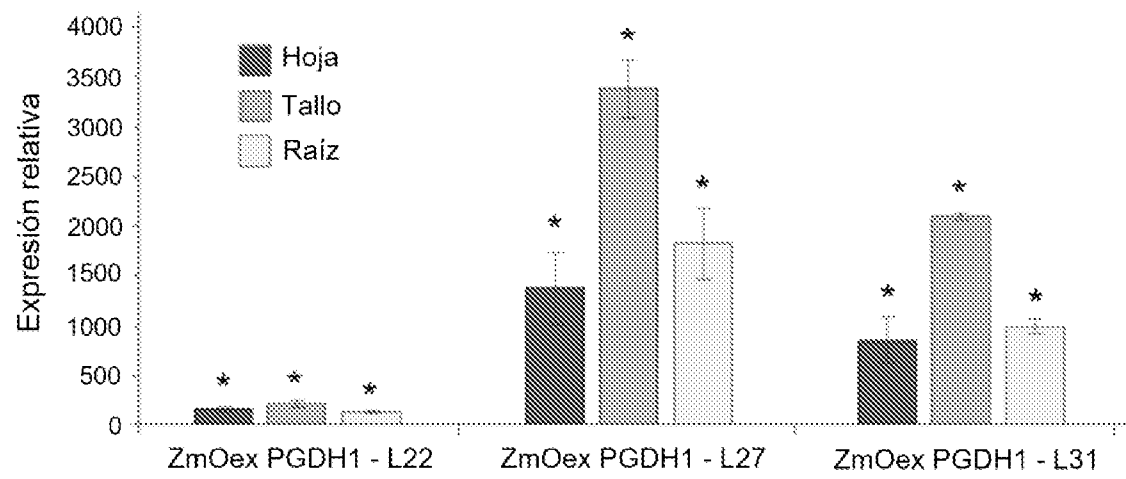


FIGURA 5

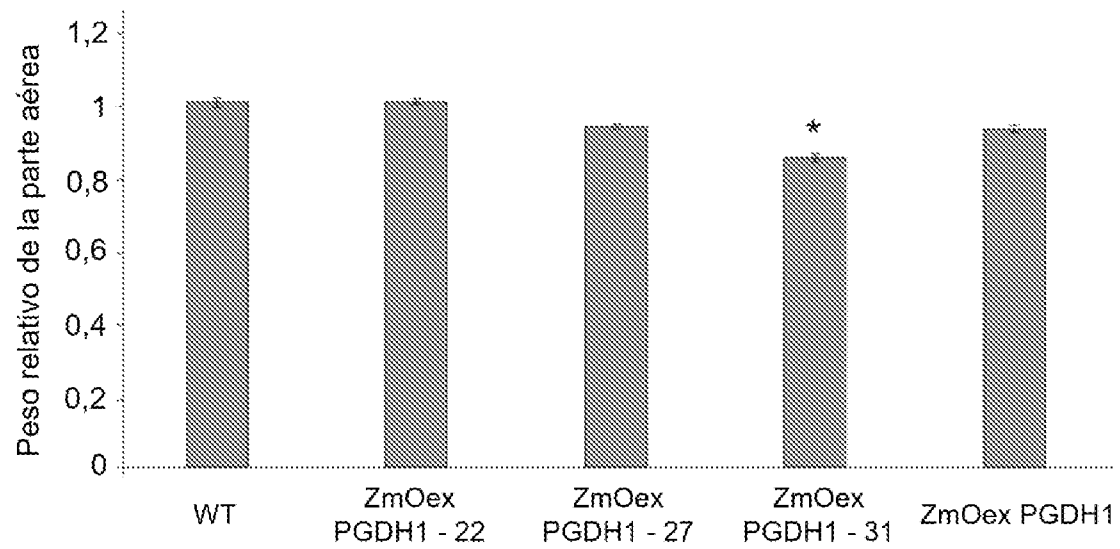


FIGURA 6



- ②¹ N.º solicitud: 202330933
②² Fecha de presentación de la solicitud: 14.11.2023
③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. cl.: **C12N15/82** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	TOUJANI, W. et al., "Functional characterization of the plastidial 3-phosphoglycerate dehydrogenase family in Arabidopsis." Plant Physiology (2013), Vol. 163, Nº 3, Páginas 1164 - 1178, ISSN 1532-2548 (Electronic), <DOI:10.1104/pp.113.226720>. todo el documento.	37-41
X	ROSA-TÉLLEZ, S. et al., "PGDH family genes differentially affect Arabidopsis tolerance to salt stress." Plant Science (2020), Vol. 290, artículo nº: 110284110284. <DOI: 10.1016/j.plantsci.2019.110284>. todo el documento,	37-41
A	GUO, X. et al., "Genetic engineering of maize (<i>Zea mays</i> L.) with improved grain nutrients." Journal of Agricultural and Food Chemistry (2018), Vol. 66, Nº 7, Páginas 1670 - 1677, ISSN 1520-5118 (Electronic), <DOI:10.1021/acs.jafc.7b05390>. todo el documento.	1-36, 42-57
A	WO 2010034672 A1 (BASF PLANT SCIENCE GMBH ET AL) 01/04/2010, todo el documento.	1-36, 42-57
A	ROC, R. et al., "Serine in plants: biosynthesis, metabolism, and functions." Trends in Plant Science, (2014), Vol. 19, Nº 9, Páginas 564 - 569, ISSN 1878-4372 (Electronic), <DOI: doi:10.1016/j.tplants.2014.06.003>. todo el documento.	1-36, 42-57

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: 1-36, 42-57 (todas parcialmente) y 37-41 (todas completamente)

Fecha de realización del informe
18.09.2024

Examinador
M. Hernández Cuéllar

Página
1/2

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

C12N

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

EPODOC, WPI, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, EBI SEQUENCES DATABASES