(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 354 895**

(21) Número de solicitud: 200802608

(51) Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN B1

(22) Fecha de presentación: **12.09.2008**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **21.03.2011**

Fecha de la concesión: **11.01.2012**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **23.01.2012**

(45) Fecha de publicación del folleto de la patente: **23.01.2012**

(73) Titular/es:
IDEN CARBOHYDRATE BIOTECHNOLOGY, S.L
AVDA. CONDE OLIVETO, 2 - 3º IZDA.
31002 PAMPLONA, NAVARRA, ES

(72) Inventor/es:
ALONSO CASAJÚS, NORA;
MUÑOZ PEÉREZ, FRANCISCO JOSÉ;
BAROJA FERNÁNDEZ, MIREN EDURNE y
POZUETA ROMERO, FRANCISCO JAVIER

(74) Agente: **Illescas Taboada, Manuel**

(54) Título: **PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS QUE PRESENTAN ALTO CONTENIDO Y RENDIMIENTO EN ALMIDÓN Y ALTO BALANCE AMILOSA/AMILOPECTINA.**

(57) Resumen:
Procedimiento para la producción de plantas transgénicas que presentan alto contenido y rendimiento en almidón y alto balance amilosa/amilopectina. Las alfa-1,4·glucan fosforilasas (GPs) catalizan el corte reversible de uniones alfa-1,4 de los extremos no-reductores de homopolisacáridos con al menos 5 moléculas de glucosa tales como almidón, maltodextrinas y glucógeno, dando lugar a la producción de glucosa-1-fosfato. Las GPs en bacterias y células animales son responsables de la degradación del glucógeno. Aunque el incremento de la actividad GP conlleva a una reducción de los niveles intracelulares de glucógeno en bacterias y células animales en esta invención se describe la obtención de plantas que poseen altos niveles y rendimientos de almidón, así como un elevado balance amilosa/amilopectina, como consecuencia de la expresión de genes que codifican para GPs.

ES 2 354 895 B1

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción de plantas transgénicas que presentan alto contenido y rendimiento en almidón y alto balance amilosa/amilopectina.

Campo de la invención

La presente invención se engloba dentro del campo de la ingeniería genética y de la fisiología vegetal. Concretamente la invención comprende un procedimiento para la producción de plantas transgénicas con altos niveles de almidón y alto ratio amilosa/amilopectina, los vectores utilizados para transformar las células, las propias células transformadas, las plantas transgénicas obtenidas por dicho procedimiento y sus respectivos usos.

Estado de la técnica anterior

Tanto el almidón de las plantas como el glucógeno de bacterias y animales son homopolímeros ramificados de moléculas de glucosa unidas por enlaces covalentes de tipo α-1,4 y α-1,6. Estos polímeros constituyen formas importantes de almacenamiento de carbohidratos y energía. En las plantas el almidón se sintetiza en el plastidio, se acumula en grandes cantidades en órganos tales como semillas (trigo, cebada, maíz, guisante, etc.) y tubérculos (patata y batata entre otros) y es un constituyente fundamental de la dieta del ser humano. Por otro lado, el almidón es utilizado frecuentemente en la industria papelera, cosmética, farmacéutica y alimentaria, y también como materia prima fundamental para la fabricación de plásticos biodegradables, pinturas de bajo impacto medioambiental y bioetanol. Numerosas aplicaciones del almidón están basadas principalmente en el balance de amilosa y amilopectina, el cual determina la estructura del gránulo de almidón, así como su viscosidad en suspensiones acuosas.

El ADPG es la molécula precursora universal de la biosíntesis del almidón y del glucógeno en plantas y bacterias, respectivamente. Está ampliamente asumido que la producción de este azúcar-nucleótido está exclusivamente controlada por el enzima ADPG pirofosforilasa (AGPasa) (EC 2.7.7.27) (1-4). Sin embargo, existen evidencias que muestran que la sacarosa sintasa (EC 2.4.1.13) (UDP-glucosa:D-fructosa-2-glucosil transferasa) está implicada en la síntesis de ADPG necesario para la biosíntesis del almidón (5-9). En lo que a mecanismos de degradación del ADPG se refiere, existen enzimas que hidrolizan ADPG tanto en plantas (10-13), como en bacterias (14, 15).

En plantas, la degradación del almidón está controlada por reacciones hidrolíticas catalizadas por α-amilasas, β-amilasas y α-glucosidasas (16, 17). Por el contrario, en animales, bacterias y levaduras son las alfa-l,4-glucan fosforilasas (GP) (EC 2.4.1.1) las que controlan la degradación de la molécula de glucógeno *in vivo* (18-22). Las GPs catalizan el corte reversible de uniones α-1,4 de los extremos no reductores de poliglucanos tales como almidón, maltodextrinas y glucógeno, dando lugar a la producción de glucosa-1-fosfato (G1P). Las secuencias nucleotídicas de origen animal, vegetal o bacteriano, que codifican para enzimas con actividad GPs, son secuencias conservadas.

Las plantas poseen GPs intra- y extra-plastidiales. A diferencia de lo que ocurre en bacterias, levaduras y animales, hasta el momento se desconoce la función de las GPs vegetales, especialmente las intraplastidiales. Teniendo en cuenta el carácter reversible de las GPs, es posible que su función en el metabolismo del almidón dependa del balance Pi/GlP (21). Siendo así, el alto balance Pi/GlP existente en la célula vegetal indicaría fuertemente que la GP plastidial no está implicada en la síntesis de almidón, reforzando la teoría de que la síntesis del almidón tiene lugar única y exclusivamente mediante procesos dependientes de la producción de ADPG.

Existen evidencias que sugieren la posible implicación de GPs plastidiales en la degradación del almidón en hojas de *Phaseoulus vulgaris* y *Arabidopsis thaliana* (23). Por otro lado, se ha sugerido que las GPs plastidiales poseen funciones relacionadas con el estrés abiótico, la floración y el crecimiento de semillas (24-27). La discusión sobre la función biológica de las GPs plastidiales en plantas se complica aún más al tener en cuenta que mutantes STA4 del alga *Chlamydomonas reinhardtii* deficitarios en GP plastidial poseen niveles reducidos de almidón, lo cual sugiere que la GP plastidial no está implicada en la degradación del almidón en *C. reinhardtii* (28). Por otro lado, existen trabajos que muestran que las GPs plastidiales no están implicadas en la degradación del almidón en plantas vasculares tales como patata y trigo (29, 30). Añadiendo más confusión al debate sobre la posible implicación de las GP plastidiales en la degradación del almidón, algunos trabajos han mostrado una correlación positiva entre la actividad de la GP plastidial, la actividad de enzimas implicados en la síntesis del almidón y el acúmulo de almidón (25, 31-33).

Existen trabajos en los que se describe la producción y caracterización de plantas con actividad GP reducida (24). Tales plantas acumulan niveles normales de almidón. Por otro lado, existe un trabajo en el que se describe que la sobre-expresión del gen *glgP* de *E. coli* que codifica para GP da lugar a bacterias con reducidos o nulos niveles de glucógeno (22). Finalmente, existen trabajos en los que se describe que la sobre-expresión de genes que codifican para GP de mamíferos da lugar a células de humanos con niveles reducidos de glucógeno (18). El estado de la técnica no ofrece una clara relación entre la enzima GP vegetal y su función concreta. Es más, hasta el momento no se conocen publicaciones referidas a la producción y/o caracterización de especies de plantas superiores con alta actividad GP.

La presente invención se focaliza precisamente en este último aspecto al describir plantas transgénicas vasculares con alta actividad GP (tanto a nivel citosólico como plastidial) caracterizadas por expresar genes codificantes de proteínas/enzimas con actividad GP consiguiendo una elevada actividad GP (tanto a nivel citosólico como plastidial) y consecuentemente un elevado nivel y rendimiento en almidón así como un alto balance amilosa/amilopectina. Otro

aspecto importante a tener en cuenta es que la presente invención evidencia que la expresión de los genes que codifican para enzimas GP, y por lo tanto el aumento de actividad GP, tiene como resultado un incremento del contenido en almidón.

Así, la presente invención rompe el prejuicio establecido en el estado de la técnica para la actividad de las GP de animales, bacterias y levaduras, donde se define que la actividad GP tiende al corte de las uniones α-1,4 de los polímeros de glucosa dando lugar a G1P. También pone en evidencia que la GP bacteriana promueve la síntesis de almidón en plantas transgénicas que expresan el gen que codifica para dicha enzima.

Así, el objeto de la invención es la producción de plantas con alto contenido y rendimiento de almidón y un alto balance amilosa/amilopectina como consecuencia del incremento de la actividad GP (tanto en el citosol como en el plastidio) al expresar genes que codifican para proteínas con actividad GP.

Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

Tal y como se ha comentado anteriormente, el objeto de la invención es la producción de plantas transgénicas con alto contenido y rendimiento de almidón y un alto balance amilosa/amilopectina como consecuencia del incremento de la actividad GP (tanto en el citosol como en el plastidio) al expresar genes que codifican para proteínas con alta actividad GP. A efectos de la presente invención, se hacen constar los siguientes términos:

Célula: es la unidad mínima (morfológica y funcional) de todo ser vivo, capaz de actuar de manera autónoma. De particular interés a la presente invención resultan las células bacterianas y vegetales.

Citoplasma: solución líquida que compone el medio intracelular.

Plastidio: orgánulo propio de células vegetales. Es el encargado de realizar la fotosíntesis en los organismos eucariontes fotosintetizadores.

Vector genético: "vehículo" utilizado para transferir material genético exógeno al interior de una célula. Cualquiera de los vectores conocidos en el estado de la técnica puede utilizarse en la presente invención. Sin embargo en la presente invención fue utilizado preferentemente *Agrobacterium tumefaciens*.

Secuencias homologas: son secuencias nucleotídicas de ADN casi idénticas, entre las que se puede producir apareamiento de bases bajo estrictas condiciones.

Expresión ectópica: se entiende por expresión ectópica de un gen cuando su producto se expresa en un lugar en el que normalmente no lo hace.

Planta transgénica: planta cuyo genoma ha sido modificado mediante ingeniería genética con el objetivo de conseguir características biológicas diferentes a las de la planta silvestre (como es el caso de la presente invención).

Alta actividad de la enzima GP: se entiende por alta actividad de la enzima GP cuando dicha actividad es al menos 5 veces superior a la existente en plantas silvestres.

Alto contenido en almidón: según se utiliza en la presente invención, esta expresión está directamente referida a un valor estadísticamente significativo, superior a los valores observados en las plantas control. En la Figura 7 se observa que el contenido medio en almidón en los tubérculos de las plantas silvestres analizadas (CR1 y CR2) es de aproximadamente 290 μmoles de glucosa/g (peso fresco), con un margen de variación del 10%. Por lo tanto podría considerarse como "alto contenido en amidón" aquel que supere, al menos en un 20%, dicho valor de 290 μmoles de glucosa/g (peso fresco). En la presente invención se supera dicho valor consiguiendo tubérculos transgénicos que acumulan cantidades de almidón de 400 μmoles de glucosa/g (peso fresco) como mínimo.

Alto balance amilosa/amilopectina: tal y como se observa en la figura 9 el balance amilosa/amilopectina, expresado en porcentaje de amilosa, en los tubérculos de las plantas silvestres (CR) analizadas es aproximadamente 22,5% con un margen de error de un 2,5% (lo cual constituye un 10% del valor medio observado en CR). Se considera que existe un alto balance en amilosa/amilopectina cuando el valor del porcentaje en amilosa de la planta transgénica analizada es al menos un 10% mayor que el valor del porcentaje en amilosa de la planta silvestre correspondiente (en este caso concreto, tubérculos con un balance amilosa/amilopectina superior a un 25% se consideran como ricos en amilosa).

Descripción de las figuras

Figura 1: Etapas de construcción del plásmido de expresión pET15b-glgP.

Figura 2: Etapas de construcción del plásmido de expresión pBIN20-B33-C1P-GP-NOS.

Figura 3: Etapas de construcción del plásmido de expresión pBIN2035S-GP-NOS.

Figura 4: SDS-PAGE. Tinción de la GP recombinante purificada a partir de extractos de células de *E. coli* BL21 (DE3)C43 transformadas con pET15b-glgP (CECT 7071).

Figura 5: Western blot de tubérculos de plantas patata no transformada (línea 1) y tubérculos de diferentes clones de plantas de patata transformadas con CECT 7054 (línea 2) y con CECT 7055 (líneas 3 y 4). En cada carril se cargaron 50 μg de proteína y fueron sometidas a SDS-PAGE. La GP de *E. coli* se immunodecoró haciendo uso del anticuerpo policlonal específico de GP de *E. coli*. Obsérvese que tan solo las líneas que expresan *glgP* de *E. coli* desarrollan una banda de aproximadamente 93 kDa.

Figura 6: Actividad GP en tubérculos de plantas de patata silvestres y plantas de patata que expresan *glgP* de *E. coli* tras integrar en su genoma las construcciones 35S-glgP-NOS y B33-ChlTP-glgP-NOS haciendo uso de las cepas de *A. tumefaciens* CECT 7054 y CECT 7055, respectivamente. La actividad (en miliU/g peso fresco) se refiere a la cantidad de G1P producida a partir de glucógeno por peso fresco de un extracto crudo de tubérculo. Las dos plantas silvestres analizadas se designan como CR1 y CR2. Las plantas transgénicas reciben la designación de B33-7, B33-11, B33-12, B33-13 y B33-14 (las obtenidas haciendo uso de CECT 7055) y 35S-1, 35S-6, 35S-11 y 35S-14 (las obtenidas haciendo uso de CECT 7054). Los valores representados se corresponden a la media y desviación típica de tubérculos de 10 plantas diferentes por línea.

Figura 7: Contenido en almidón en tubérculos de plantas de patata silvestres y plantas de patata que expresan *glgP* de *E. coli* tras integrar en su genoma las construcciones 35S-glgP-NOS y B33-ChlTP-glgP-NOS haciendo uso de las cepas de *A. tumefaciens* CECT 7054 y CECT 7055, respectivamente. Las dos plantas silvestres analizadas se designan como CR1 y CR2. Las plantas transgénicas reciben la designación de B33-7, B33-11, B33-12, B33-13 y B33-14 (las obtenidas haciendo uso de CECT 7055) y 35S-1, 35S-6, 35S-11 y 35S-14 (las obtenidas haciendo uso de CECT 7054). Los valores representados se corresponden a la media y desviación típica de tubérculos de 10 plantas diferentes por línea.

Figura 8: Contenido en sacarosa (A), glucosa (B) y fructosa (C) en tubérculos de plantas de patata silvestres y plantas de patata que expresan *glgP* de *E. coli* tras integrar en su genoma las construcciones 35S-glgP-NOS y B33-ChlTP-glgP-NOS haciendo uso de las cepas de *A. tumefaciens* CECT 7054 y CECT 7055, respectivamente. Las dos plantas silvestres analizadas se designan como CR1 y CR2. Las plantas transgénicas reciben la designación de B33-7, B33-11, B33-12, B33-13 y B33-14 (las obtenidas haciendo uso de CECT 7055) y 35S-1, 35S-6, 35S-11 y 35S-14 (las obtenidas haciendo uso de CECT 7054). Los valores representados se corresponden a la media y desviación típica de tubérculos de 10 plantas diferentes por línea.

Figura 9: Balance amilosa/amilopectina, expresado como % amilosa, en tubérculos de plantas de patata silvestres y plantas de patata que expresan *glgP* de *E. coli* tras integrar en su genoma las construcciones 35S-glgP-NOS y B33-ChlTP-glgP-NOS haciendo uso de las cepas de *A. tumefaciens* CECT 7054 y CECT 7055, respectivamente. Las dos plantas silvestres analizadas se designan como CR1 y CR2. Las plantas transgénicas reciben la designación de B33-7, B33-11, B33-12, B33-13 y B33-14 (las obtenidas haciendo uso de CECT 7055) y 35S-1, 35S-6, 35S-11 y 35S-14 (las obtenidas haciendo uso de CECT 7054). Los valores representados se corresponden a la media y desviación típica de tubérculos de 10 plantas diferentes por línea.

Descripción detallada de la invención

Obtención y purificación de GP recombinante activa

Conocida la secuencia nucleotídica de *glgP* de *Escherichia coli* (22) se crearon dos cebadores específicos (SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2), correspondientes a los extremos 5' y 3' del gen. Haciendo uso de estos cebadores se amplificó por métodos convencionales de PCR un fragmento de DNA de aproximadamente 2460 pares de bases a partir de ADN genómico de *E. coli*. Tal fragmento de DNA se introdujo en el plásmido pGemT-easy (Promega) dando lugar a la construcción pG-glgP (Fig. 1) la cual fue amplificada en la bacteria hospedadora XL1 Blue. pG-glgP fue digerido con los enzimas de restricción XhoI y BamHI. El fragmento liberado (que contiene a *glgP*) fue clonado en los mismos sitios de restricción del plásmido de expresión pET-15b(+) (Novagen). El plásmido resultante designado con el nombre de pET15b-glgP (Fig. 1) fue introducido por electroporación en la cepa *E. coli* BL21(DE3)C43 (Novagen) con número de depósito CECT 7071. La expresión de *glgP* tuvo lugar mediante la adición de 1 mM isopropil-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) en 100 ml de cultivo celular crecido a 37ºC. Tras seis horas de cultivo inducido se recogieron las bacterias y se resuspendieron en 4 ml de "binding buffer" (Novagen, His-bind purification kits), se sonicaron y se centrifugaron a 40.000 g durante veinte minutos. El sobrenadante que contiene la GP recombinante con una cola de histidinas en el extremo N-terminal se hizo pasar a través por una columna de afinidad del kit de purificación de proteínas "His-bind" de Novagen. Siguiendo las instrucciones del kit se eluyó la GP con 6 ml del tampón de elución recomendado, en el que se había incluido 200 mM de imidazol en lugar de 1 molar. Tras la elución la proteína fue sometida rápidamente a una diálisis para retirar cualquier traza de imidazol que inactive irreversiblemente a la GP.

Determinación del contenido en azúcares solubles y almidón

Los azúcares solubles se extrajeron haciendo uso de las técnicas descritas en la literatura científica (34, 35). Sacarosa, maltosa, maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa, maltohexaosa, maltoheptaosa, fructosa y glucosa fueron determinados haciendo uso de un cromatógrafo iónico automatizado marca DIONEX ajustado a una columna CarboPac PA10, un detector electroquímico ED50, una bomba de gradiente GP50 El y un organizador de eluyentes E01 (22). El ADPG fue determinado haciendo uso de un sistema Waters de HPLC ajustado a una columna Partisil-10-SAX (10). El almidón, el glucógeno y la amilopectina se midieron haciendo uso de kits comerciales descritos en la literatura (36). El balance amilosa/amilopectina se determinó haciendo uso del método espectrofotométrico descrito en la literatura (36).

Identificación del producto con actividad enzimática GP

El producto enzimático GP se identificó mediante el siguiente patrón funcional:

- Es una alfa-l,4-glucan fosforilasa (EC 2.4.1.1). Comúnmente esta enzima cataliza el corte reversible por fosforolisis de uniones α-1,4 de los extremos no-reductores de homopolisacáridos de moléculas de glucosa (ramificados o no) unidas covalentemente por enlaces α-1,4 y α-1,6 tales como maltodextrinas, almidón y glucógeno, dando lugar a la producción de G1P.

Obtención de anticuerpos policlonales específicos de GP de E. coli

Dos miligramos de GP de *E. coli* recombinante purificada fueron separados en SDS-PAGE. Tras haber sido eluída, la GP recombinante purificada fue mezclada con adyuvante completo de Freund (en una relación 50/50) y posteriormente fue alicuotada en tres fracciones iguales, cada una de las cuales fue inyectada en un conejo en períodos de dos semanas. Tras aproximadamente dos meses de la primera inyección, se extrajo el suero sanguíneo del conejo el cual contiene los anticuerpos policlonales específicos de GP de *E. coli*.

Identificación del producto mediante la técnica de Western blot

Extractos crudos de tubérculos de plantas silvestres y plantas transgénicas que expresan el gen *glgP* que codifica para GP de *E. coli* fueron separadas en SDS-PAGE. Posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y la GP de *E. coli* se detectó haciendo uso del anticuerpo específico anti GP de *E. coli* según la metodología descrita en la literatura (37).

Obtención de plantas transgénicas que expresan glgP de E. coli

a. *Plantas de patata con elevada actividad GP en los amiloplastos de tubérculos*

El plásmido pG-glgP-NcoI (idéntico a pG-glgP, excepto que posee un sitio NcoI en el codon ATG de iniciación de la traducción) fue digerido con los enzimas NcoI y BamHI. El fragmento liberado fue clonado en los sitios NcoI y BamHI de psK-B33-SuSy-NOS (B33 es la región promotora del gen que codifica para la patatina cuya expresión es específica de tubérculos)(38) dando lugar al plásmido pSK-B33-glgP-NOS (Fig. 2).

Para la producción de una construcción génica que codifique para la GP de *E. coli* localizada en el plastidio, pG-glgP-NcoI fue digerido con NcoI y BamHI. El fragmento liberado fue clonado entre los sitios NcoI y BamHI del plásmido pSK-ChlTP-ASPP que contiene la región del gen que codifica para el péptido de tránsito al cloroplasto de la proteína P541 (39), dando lugar al plásmido pSK-ChlTP-glgP (Fig. 2).

Para la producción de una construcción que codifique para la GP de *E. coli* que se acumule específicamente en los amiloplastos de tubérculos de patata, pSK-ChlTP-glgP fue digerido secuencialmente con SalI, T4-DNA polimerasa y BamHI. El fragmento liberado fue clonado en pSK-B33-glgP-NOS tras haber sido digerido secuencialmente con NcoI, T4 DNA polimerasa y BamHI, dando lugar al plásmido pSK-B33-ChlTP-glgP-NOS (Fig. 2).

Para la producción de un plásmido binario que contenga la construcción génica B33-ChlTP-glgP-NOS necesaria para transformar plantas vía *Agrobacterium tumefaciens*, psK-B33-ChlTP-glgP-NOS fue digerido secuencialmente con NotI, T4 DNA polimerasa y XhoI. El fragmento liberado fue clonado en el plásmido binario pBIN20 (40) que previamente había sido digerido secuencialmente con HpaI, T4 DNA polimerasa y XhoI, dando lugar al plásmido pBIN20-B33-C1P-GP-NOS (Fig. 2). PBIN20-B33-C1P-GP-NOS se introdujo por electroporación en diferentes cepas de *A. tumefaciens* necesarias para transformar especies tales como patata, *Arabidopsis thaliana*, tomate, tabaco, maíz y arroz (como por ejemplo la cepa C58:GV2260, con nº de depósito CECT 7055). CECT 7055 se utilizó para transformar plantas de patata según protocolos convencionales de transformación de esta especie (41).

b. *Plantas que expresan constitutivamente glgP y que poseen una elevada actividad GP citosólica*

Para la producción de plantas con alta actividad GP citosólica, se crearon construcciones del gen *glgP* de *E. coli* cuya expresión está gobernada por el promotor constitutivo 35S del virus del mosaico del tabaco. Para ello, el plásmido pSK-35S fue digerido con XhoI y NcoI. El fragmento liberado (que contiene al promotor 35S unido a una región amplificadora (42), fue clonado entre los sitios XhoI y NcoI del plásmido pSK-B33-glgP-NOS, dando lugar al plásmido pSK-35S-glgP-NOS (Fig. 3). Para poder transferir esta construcción al genoma de las plantas vía *A. tumefaciens*, es preciso que previamente sea clonada en un plásmido binario. Para ello, pSK-35S-glgP-NOS fue digerido secuencialmente con las enzimas NotI, T4 DNA polimerasa y XhoI. El fragmento liberado fue clonado dentro del plásmido binario pBIN20 que previamente había sido digerido secuencialmente con los enzimas HpaI, T4 DNA polimerasa y XhoI. El plásmido así obtenido se designó con el nombre de pBIN2035S-GP-NOS (Fig. 3). pBIN2035S-GP-NOS se introdujo por electroporación en diferentes cepas de *A. tumefaciens* (como por ejemplo la cepa C58:GV2260 con el nº de depósito CECT 7054), necesarias para transformar especies tales como patata, *Arabidopsis thaliana*, tomate, tabaco, maíz y arroz.

Así, el primer objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de plantas transgénicas con elevada actividad GP, elevado contenido y rendimiento en almidón y alto balance amilosa/amilopectina, con respecto a las plantas silvestres sin transformar, caracterizado por la transformación de la planta silvestre con un vector de expresión que comprende una secuencia nucleotídica, de origen animal, vegetal o bacteriano, que codifica para una proteína con alta actividad GP y la expresa en el interior de la planta transformada.

En una realización preferida, el procedimiento de la invención se caracteriza porque la actividad GP de la proteína codificada y expresada en el interior de la planta transformada es al menos 5 veces superior a la actividad GP de la planta silvestre, el contenido en almidón de las plantas transgénicas obtenidas es al menos un 20% superior al de las plantas silvestres y el valor del contenido en amilosa de las plantas transgénicas obtenidas es al menos un 10% superior al valor del contenido en amilosa de las plantas silvestres sin transformar, en todos los casos, cultivadas en las mismas condiciones que las plantas transgénicas.

En otra realización preferida, el procedimiento de la invención se caracteriza porque la secuencia nucleotídica comprendida en el vector de expresión utilizado para transformar la planta silvestre se selecciona entre:

a. Una secuencia nucleotídica que codifique para la secuencia aminoacídica caracterizada por la SEQ ID NO: 4;

b. Una secuencia nucleotídica caracterizada por la SEQ ID NO: 3;

c. Una secuencia nucleotídica que hibride con las definidas en “a” o “b” y que codifique para un producto enzimático con actividad GP;

d. Una secuencia nucleotídica que difiera de las definidas en “a”, “b” o “c” debido a la degeneración del código genético.

En otra realización preferida, el procedimiento de la invención se caracteriza porque la elevada actividad GP dentro de la planta transgénica transformada puede conseguirse tanto a nivel citosólico, mediante la transformación de la planta silvestre con *Agrobacterium tumefaciens* CECT 7054 que comprende el plásmido pBIN2035S-GP-NOS, como a nivel plastidial, mediante la transformación de la planta silvestre con *Agrobacterium tumefaciens* CECT 7055 que comprende el plásmido pBIN20-B33-C1P-GP-NOS.

El segundo aspecto de la presente invención se refiere a los vectores de expresión:

- *Agrobacterium tumefaciens* CECT 7054 caracterizado por comprender el plásmido pBIN2035S-GP-NOS.

- *Agrobacterium tumefaciens* CECT 7055 caracterizado por comprender el plásmido pBIN20-B33-C1P-GP-NOS.

El tercer objeto de la presente invención se refiere a las células transformadas o infectadas con los dos vectores mencionados anteriormente, caracterizadas por ser una célula bacteriana o vegetal.

En una realización preferida, la célula bacteriana de la invención se caracteriza por ser una célula bacteriana de *E. coli* BL21 (DE3) C43, transformada con el plásmido pET15b-glgP que expresa el gen que codifica para la proteína GP recombinante.

En otra realización preferida, la célula vegetal de la invención se caracteriza por estar transformada o infectada por *Agrobacterium tumefaciens* CECT 7054 que comprende el plásmido pBIN2035S-GP-NOS o por *Agrobacterium tumefaciens* CECT 7055 que comprende el plásmido pBIN20-B33-C1P-GP-N()S, y por pertenecer, entre otras, a cualquiera de las siguientes especies de plantas: patata (*Solanum tuberosum*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), arroz (*Oryza sativa*), maíz (*Zea mays*) o arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*).

El cuarto objeto de la presente invención se refiere al uso de la célula bacteriana definida anteriormente para la producción de la proteína GP recombinante activa, y para la producción de anticuerpos específicos frente a GP.

El quinto objeto de la presente invención se refiere al uso de las células bacterianas o vegetales transformadas o infectadas con *Agrobacterium tumefaciens* CECT 7054 que comprende el plásmido pBIN2035S-GP-NOS o con *Agrobacterium tumefaciens* CECT 7055 que comprende el plásmido pBIN20-B33-C1P-GP-NOS, para la producción de almidón.

El sexto objeto de la presente invención se refiere a las plantas transgénicas transformadas con el vector *Agrobacterium tumefaciens* CECT 7054 que comprende el plásmido pBIN2035S-GP-NOS o con *Agrobacterium tumefaciens* CECT 7055 que comprende el plásmido pBIN20-B33-C1P-GP-NOS y que se caracterizan por poseer alta actividad GP respecto a la planta silvestre, tanto a nivel citosólico como plastidial y, consecuentemente, un elevado contenido y rendimiento en almidón y un alto balance amilosa/amilopectina respecto a la planta silvestre sin transformar, en todos los casos, cultivadas en las mismas condiciones y en las mismas fechas que las plantas transgénicas. En una realización preferida, la planta transgénica de la invención se caracteriza porque su actividad GP es al menos 5 veces superior a la actividad GP de la planta silvestre, su contenido en almidón es al menos un 20% superior al contenido en almidón de las plantas silvestres y el valor de su contenido en amilosa es al menos un 10% superior al valor del contenido en amilosa de las plantas silvestres, cultivadas en todos los casos en las mismas condiciones.

En otra realización preferida, la planta transgénica de la invención se caracteriza porque expresa el gen glgP (SEQ ID NO: 3) y codifica para proteínas con alta actividad GP, y además, es seleccionada de entre el grupo que comprende: patata (*Solanum tuberosum*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), arroz (*Oryza sativa*), maíz (*Zea mays*) o arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*).

El séptimo objeto de la presente invención se refiere al uso de las plantas transgénicas mencionadas anteriormente, para la producción de almidón.

El octavo objeto de la presente invención se refiere a los anticuerpos policlonales o monoclonales frente a la enzima GP.

El noveno objeto de la presente invención se refiere al uso de dichos anticuerpos para medir la concentración de GP presente en una muestra.

Depósito de microorganismos según el tratado de Budapest

Los microorganismos utilizados en la presente invención fueron depositados en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), sita en el Edificio de Investigación de la Universidad de Valencia, Campues Bunassot, Burjassot 46100 (Valencia, España).

- Cepa de *E. coli* BL21(DE3)C43 transformada con el plásmido pET15b-glgP, depositada en la fecha 09/05/2005 con nº de depósito CECT 7071.
- Cepa de *A. tumefaciens* C58:GV2260 transformada con el plásmido pBIN20-B33-C1P-GP-NOS, depositada en la fecha 25/07/2005 con nº de depósito CECT 7055.
- Cepa de *A. tumefaciens* C58:GV2260 transformada con el plásmido pBIN2035S-GP-NOS, depositada en la fecha 25/07/2005 con nº de depósito CECT 7054.

Ejemplos

Los ejemplos que se exponen a continuación tienen el objetivo de ilustrar la invención sin limitar el alcance de la misma.

Ejemplo 1

Producción en Escherichia coli de una GP recombinante

El conocimiento de la secuencia nucleotídica del gen *glgP* que codifica para la GP de *E. coli* permitió la creación de dos cebadores específicos cuyas secuencias son, en sentido 5'-3', SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. Haciendo uso de estos cebadores se amplificó por métodos convencionales de PCR un fragmento de DNA a partir de ADN genómico de *E. coli*, que se introdujo en el plásmido pGemT-easy (Promega), dando lugar al plásmido pG-glgP. pG-glgP fue digerido con los enzimas de restricción XhoI y BamHI. El fragmento liberado (que contiene a *glgP*) fue clonado en los mismos sitios de restricción del plásmido de expresión pET-15b(+) (Novagen). El plásmido resultante (designado con el nombre de pET15b-glgP, Fig. 1) fue introducido por electroporación en *E. coli* BL21(DE3)C43 (Novagen). La secuencia nucleotídica del fragmento clonado en pET-15b(+) es SEQ ID NO: 3. La secuencia aminoacídica deducida tras la expresión de SEQ ID NO: 3 es SEQ ID NO: 4.

La inducción de la expresión de *glgP* en bacterias BL21(DE3)C43 transformadas con pET15b-glgP (CECT 7071) tuvo lugar al añadir 1 mM IPTG. Tras seis horas adicionales de cultivo a 37ºC, se observó que las bacterias transformadas con pET15b-glgP acumulaban una proteína de aproximadamente 95 kDa que podía purificarse a homogeneidad de manera simple por medio de cromatografía de afinidad haciendo uso del kit de purificación "His-bind" (Novagen) (Fig. 4). Además, estas bacterias se caracterizan por no poseer glucógeno (22).

Ejemplo 2

Ensayos enzimáticos

Las reacciones enzimáticas se desarrollaron a 37ºC. Las actividades GP se midieron en el sentido de la degradación del poliglucano analizado. En un primer paso, 50 μL de mezcla de reacción compuesta por 50 mM HEPES (pH 7.5), 30 mM tampón fosfato (pH 7.5), poliglucano (equivalente a 10 mM de glucosa) y extracto de proteína, se incubaron durante 15 minutos. La reacción fue detenida tras hervir durante 2 minutos y centrifugar a 30000 g durante 20 minutos. La G1P liberada existente en el sobrenadante fue determinada por cualquiera de los siguientes métodos:

- Por espectrofotometría. 300 μL de mezcla conteniendo Hepes 50 mM pH 7, EDTA 1 mM, $MgCl_2$ 2 mM, KC1 15 mM, NAD^+ 0,6 mM, una unidad de fosfoglucomutasa y otra de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides*, y 30 μL del sobrenadante resultante del paso uno se incubaron durante 20 minutos. La producción de NADH se monitorizó a 340 nm utilizando un espectrofotómetro Multiskan EX (Labsystems). Fue despreciable la cantidad de NADH producida por cualquier extracto proteico en ausencia de glucógeno en el paso uno.

- Por cromatografía. 40 μL del sobrenadante del paso 1 fueron sometidos a cromatografía líquida de alta afinidad haciendo uso de un sistema DX-500 Dionex acoplado a una columna Carbo-Pac PA10 y detección amperométrica.

La unidad (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la producción de 1 μmol de producto por minuto.

Ejemplo 3

Identificación del producto con actividad GP

El producto con actividad GP así obtenido cumple las características generales descritas en la literatura científica relativas a cualquier GP (22, 43-45).

- La GP de *E. coli* reconoce homopolisacáridos de 5 ó más moléculas de glucosa tales como glucógeno, almidón, maltoheptaosa, maltohexaosa y maltopentaosa.

- No actúa sobre maltotetraosa, maltotriosa ni maltosa.

- No se inhibe por ADPglucosa, UDPglucosa, nucleosido mono- di- y tri-fosfatos tales como AMP, ADP y ATP, 3-fosfoglicerato, fructosa-1,6-bifosfato, fructosa-6-fosfato, glucosa-6-fosfato o glucosa.

- Peso molecular aparente de la proteína purificada en geles desnaturalizantes, en torno a 93 kDa (Fig. 4).

Ejemplo 4

Obtención de plantas con alta actividad GP (tanto plastidial como citosólica) como consecuencia de la expresión ectópica de un gen que codifica para una GP

Utilizando la cepa de *A. tumefaciens* CECT 7054 (que alberga el plásmido pBIN2035S-GP-NOS) se obtuvieron plantas de patata (*Solanum tuberosum*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), arroz (*Oryza sativa*), maíz (*Zea mays*) y arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) que expresan constitutivamente glgP. Utilizando la cepa de *A. tumefaciens* CECT 7055 (que alberga el plásmido PBIN20-B33-C1P-GP-NOS) se obtuvieron plantas de patata que expresan en sus tubérculos *glgP*. Tubérculos de plantas de patata transformadas haciendo uso de CECT 7054 y CECT 7055 acumulaban una proteína que era reconocida específicamente por el anticuerpo policlonal obtenido frente a la GP de *E. coli* (Fig. 5), en cambio, los tubérculos de plantas de patata silvestres no transformadas cultivadas en las mismas condiciones ambientales, de cultivo (riego, abonos, tratamientos con pesticidas, etc), y en las mismas fechas que las plantas transformadas, no expresaban dicha enzima. Tanto los tubérculos de las plantas de patata transformadas haciendo uso de CECT 7054 (que alberga una construcción que codifica para una GP localizada en el citosol) como los de plantas de patata transformadas haciendo uso de CECT 7055 (que alberga una construcción que codifica para una GP localizada en los amiloplastos) presentaron las siguientes características:

1. La actividad GP es 5-8 veces superior a la existente en tubérculos no transformados (Fig. 6).

2. Alto contenido en almidón respecto al existente en tubérculos no transformados (ap. 300 μmol glucosa/g peso fresco frente a 450-700 μmol glucosa/g peso fresco observado en las líneas 35S-glgP-NOS y B33-ChlTP-glgP-NOS) (Fig. 7). Sorprendentemente por lo tanto, al contrario de lo que ocurre en bacterias y células de mamíferos, el incremento de la actividad GP da lugar a un incremento del contenido en almidón.

3. Alto contenido en sacarosa y tendencia a un bajo contenido en glucosa y fructosa (Fig. 8).

4. Alto balance amilosa/amilopectina comparado con tubérculos de plantas no transformadas (Fig. 9). De nuevo, este resultado es sorprendente ya que, si la GP tuviese una función degradadora de polímeros de glucosa, el balance amilosa/amilopectina de los tubérculos que expresan GP ectópicamente debería ser más bajo que el observado en tubérculos de plantas no transformadas. Los resultados ilustrados en la Fig. 7 y en la Fig. 9 indican que la expresión de GP conduce a un incremento de la cantidad de almidón acumulado en el órgano de reserva.

5. La morfología externa de las plantas que expresan GP ectópicamente no es aberrante, tras ser comparada con la de las plantas no transformadas.

6. El número de tubérculos en las líneas que expresan GP ectópicamente es normal al comparar con las plantas no transformadas. La productividad en Kg de peso fresco por planta no se ve afectada por la expresión de GP, pero si la producción de almidón por planta.

TABLA 1

Especificidad de sustrato de la GP de E. coli. La mezcla de reacción (50 µl) está compuesta por 50 mM HEPES (pH 7.5), 30 mM Pi, el glucano indicado (5 mM glucosa) y 3 U de GP recombinante. Tras 3 horas de incubación a 37ºC la reacción se detuvo tras calentar a 100ºC durante 2 min. Los productos se analizaron por HPLC con detección amperométrica

Substrato	Productos							
	G1P	Maltosa	Maltotriosa	Maltotetrosa	Maltopentosa	Maltohexosa	Maltoheptosa	Glucógeno
Glucógeno	0.5 mM	b.d.l.	b.d.l.	b.d.l.	b.d.l.	b.d.l.	b.d.l.	4.5 mM
Maltoheptosa	2.1 mM	b.d.l.	b.d.l.	0.2 mM	0.4 mM	1 mM	1.3 mM	-
Maltohexosa	1.7 mM	b.d.l.	b.d.l.	0.6 mM	0.5 mM	2.1 mM	0.1	-
Maltopentosa	1.6 mM	b.d.l.	b.d.l.	1.0 mM	2.2 mM	0.2	b.d.l.	-
Maltotetrosa	b.d.l.*	b.d.l.	b.d.l.	5 mM	-	-	-	-
Maltotriosa	b.d.l.	b.d.l.	5 mM	-	-	-	-	-
Maltosa	b.d.l.	5 mM	-	-	-	-	-	-

TABLA 2

Efecto de diferentes compuestos en la actividad GP de E. coli

Efectores	Actividad (U/mg proteina)	% control
Ninguno	8.0	100
ADPG, 2 mM	8.3	104
UDPglucosa, 2 mM	8.1	101
AMP, 3 mM	7.6	95
ADP, 2 mM	7.0	88
ATP, 2 mM	4.8	60
AMP cíclico, 1 mM	7.3	91
Pirofosfato, 3 mM	7.8	98
3-fosfoglicerato, 2 mM	8.9	111
Fructosa-1,6-bifosfato, 2 mM	9.0	113
Fructosa-6-fosfato, 2 mM	8.4	105
Glucosa-6-fosfato, 2 mM	7.6	95
Glucosa, 20 mM	7.2	90

Bibliografía

1. **Okita**, T.W (1992) Is there an altemative pathway for starch síntesis? *Plant Physiol*. 100, 560-56.

2. **Müller-Röber**, B., **Sonnewald**, U., **Willmitzer**, L. (1992) Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expresión of tuber storage protein genes. *EMBO J*. 11, 1229-1238.

3. **Stark**, D.M., **Timmerman**, K.P., **Barry**, G.F., **Preiss**, J., **Kishore**, G.M. (1992) Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADPglucose pyrophosphorylase. *Science* 258,287-282.

4. **Neuhaus**, E.H., **Häusler**, R.E., **Sonnewald**, U. (2005) No time to shift the paradigm on the metabolic pathway to transitory starch in leaves. *Trends Plant Sci*. 10, 154-156.

5. **Murata**, T., **Sugiyama**, T., **Minamikawa**, T., **Akazawa**, T. (1966) Enzymic mechanism of starch synthesis in ripening rice grains. Mechanism of the sucrose-starch conversion. *Arch. Biochem. Biophys*. 113, 34-44.

6. **Delmer**, D. P. (1972) The purification and properties of sucrose synthase from etiolated *Phaseolus aureus* seedlings. *J. Biol. Chem*. 247, 3822-3828.

7. **Baroja-Fernández**, E., **Muñoz**, F.J., **Saikusa**, T., **Rodríguez-López**, M., **Akazawa**, T., **Pozueta-Romero**, J. (2003) Sucrose synthase catalyzes the de novo production of ADPglucose linked to starch biosynthesis in heterotrophic tissues of plants. *Plant Cell Physiol*. 44, 500-509.

8. **Muñoz**, F.J., **Baroja-Fernández**, E., **Morán-Zorzano**, M.T., **Viale**, A.M., **Etxeberria**, E., **Alonso-Casajús**, N., **Pozueta-Romero**, J. (2005) Sucrose synthase controls the intracellular levels of ADPglucose linked to transitory starch biosynthesis in source leaves. *Plant Cell Physiol*. 46, 1366-1376.

9. **Muñoz**, F.J., **Morán-Zorzano**, M.T., **Alonso-Casajús**, N., **Baroja-Fernández**, E., **Etxeberria**, E., **Pozueta-Romero**, J. (2006) New enzymes, new pathways and an alternative view on starch biosynthesis in both photosynthetic and heterotrophic tissues of plants. *Biocatal. Biotransformation* 24, 63-76.

10. **Rodríguez-López**, M., **Baroja-Fernández**, E., **Zandueta-Criado**, A., **Pozueta-Romero**, J. (2000) "Adenosine diphosphate glucose pyrophosphatase: a plastidial phosphodiesterase that prevents starch biosynthesis". *Proc. Natl. Acad. Sci*., 97, 8705-8710.

11. **Baroja-Fernández**, E., **Zandueta-Criado**, A., **Rodríguez-López**, M., **Akazawa,** T., **Pozueta-Romero**, J. (2000) "Distinct isoforms of ADPglucose pyrophosphatase and ADPglucose pyrophosphorylase occur in the suspension-cultured cells of sycamore (*Acer pseudoplatanus L.*). *FEBS Lett*. 480, 277-282.

12. **Muñoz**, F.J., **Baroja-Fernández**, E., **Alonso-Casajús**, N., **Morán-Zorzano**, M.T., **Pozueta-Romero**, J. (2006) Cloning, expression and characterization of a Nudix hydrolase that catalyzes the hydrolytic breakdown of ADP-glucose linked to starch biosynthesis in *Arabidopsis thaliana. Plant Cell Physiol*., 47, 926-934.

13. **Nanjo**, Y., **Oka**, H., **Ikarashi**, N., **Kanedo**, K., **Kitajima**, A., **Mitsui**, T., **Muñoz**, F.J. **Rodríguez-López**, M., **Baroja-Fernández**, E., **Pozueta-Romero**, J. (2006) Cloning, expression and characterization of a N-glycosylated plastidial nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase. *Plant Cell* 18, 2582-2592; PCT/ES01/00021; PCT: ES03/00363; P200601235).

14. **Moreno-Bruna**, B., **Baroja-Fernández**, E., **Muñoz**, F.J., **Bastarrica-Berasategui**, A., **Zandueta-Crido**, A., **Rodríguez-López**, M., **Lasa**, I., **Akazawa,**, T., **Pozueta-Romero**, J. (2001) "Adenosine diphosphate sugar pyrophosphatase prevents glycogen biosynthesis in *Escherichia coli*" *Proc. Natl. Acad. Sci*. 98, 8128-8132.

15. **Morán-Zorzano**, M.T., **Viale**, A.M., **Muñoz**, F.J., **Alonso-Casajús**, N., **Eydallín**, G.G., **Zugasti**, B., **Baroja-Fernández**, E., **Pozueta-Romero**, J. (2007) *Escherichia coli* AspP activity is enhanced by molecular crowding and by both glucose-1,6-bisphosphate and nucleotide-sugars. *FEBS Lett*. 581, 1035-1040.

16. **Asatsuma**, S., **Sawada**, C., **Itoh**, K., **Okito**, M., **Kitajima**, A., **Mitsui**, T. (2005) Involvement of β-amylase I-1 in starch degradation in rice amyloplasts. *Plant Cell Physiol*. 46, 858-869.

17. **Smith**, A.M., **Zeeman**, S.C., **Smith**, S.M. (2005) Starch degradation. *Annu. Rev. Plant Biol*. 56, 73-98.

18. **Baqué**, S., **Guinovart**, J.J., **Gómez-Foix**, A.M. (1996) Overexpression of muscle glycogen phosphorylase in cultured human muscle fibers causes increased glucose consumption and nonoxidative disposal. *J. Biol. Chem*. 271, 2594-2598.

19. **Burwinkel**, B., **Bakker**, H.D., **Herschkovitz**, E., **Moses**, S.W., **Shin**, Y.S., **Kilimann**, M.W. (1998) Mutations in the liver glycogen phosphorylase gene (PYGL) underlying glycogenosis type VI. *Am. J. Hum. Genet*. 62, 785-791.

20. **Bollen**, M., **Keppens**, S., **Stalmans**, W. (1998) Specific feautres of glycogen metabolism in the liver. *Biochem. J*. 336, 19-31.

21. **Newgard**, C.B., **Hwang**, P.K., **Fletterick**, R.J. (1989) The family of glycogen phosphorylases: structure and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. 24, 69-99.

22. **Alonso-Casajús**, N., **Dauvillée**, D., **Viale**, A.M., **Muñoz**, F.J., **Baroja-Fernández**, E., **Morán-Zorzano**, M.T., **Eydallin**, G., **Ball**, S., **Pozueta-Romero**, J. (2006) Glycogen phosphorylase, the product of the glgP gene, catalyzes glycogen breakdown by removing glucose units from the nonreducing ends in *Escherichia coli. J. Bacteriol*. 188, 5266-5272.

23. **Weise**, S.E., **Schrader**, S.M., **Kleinbeck**, K.R., **Sharkey**, T.D. (2006) Carbon balance and circadian regulation of hydrolytic and phosphorolytic breakdown of transitory starch. *Plant Physiol*. 141, 879-886.

24. **Duwenig**, E., **Steup**, M., **Willmitzer**, L., **Kossmann**, J. (1997) Antisense inhibition of cytosolic phosphorylase in potato plants (*Solanum tuberosum L.*) affects tuber sprouting and flower formation with only little impact on carbohydrate metabolism. *Plant J*. 12, 323-333.

25. **Schupp**, N., **Ziegler**, P. (2004) The relation of starch phosphorylases to starch metabolism in wheat. *Plant Cell Physiol*. 45, 1471-1484.

26. **Sonnewald**, U., **Basner**, A., **Greve**, B., **Steup**, M. (1995) A second L-type esozyme of potato glucan phosphorylase: cloning, antisense inhibition and expression analysis. *Plant Mol. Biol*. 27, 567-576.

27. **Zeeman**, S.C., **Thorneycroft**, D., **Schupp**, N., **Chapple**, A., **Weck**, M., **Dunstan**, H., **Haldimann**, P., **Bechtold**, N., **Smith**, A.M., **Smith**, S.M. (2004) Plastidial alpha-glucan phosphorylase is not required for starch degradation in Arabidopsis leaves but has a role in the tolerance of abiotic stress. *Plant Physiol*. 135, 849-858.

28. **Dauvillée**, D., **Chochois**, V., **Steup**, M., **Haebel**, S., **Eckermann**, N., **Ritte**, G., **Ral**, J.-P., **Colleoni**, C., **Hicks**, G., **Wattebled**, F., **Deschamps**, P., **d'Hulst**, C., **Liénard**, L., **Cournac**, L., **Putaux**, J.-L., **Dupeyre**, D., **Ball**, S.G. (2006) Plastidial phosphorylase is required for normal starch synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii. Plant J*. 48, 274-285.

29. **St-Pierre**, B., **Brisson**, N. (1995) Induction of the plastidic starch-phosphorylase gene in potato storage sink tissue. *Planta* 195, 339-344.

30. **Schupp**, N., **Ziegler**, P. (2004) The relation of starch phosphorylases to starch metabolism in wheat. *Plant Cell Physiol*. 45, 1471-1484.

31. **Schneider**, E.M., **Becker**, J.U., **Volkmann**, D. (1981) Biochemical properties of potato phosphorylase change with its intracellular localization as revealed by immunological methods. *Planta* 151, 124-134.

32. **Nakamura**, Y., **Yuki**, K. (1992) Changes in enzyme activities associated with carbohydrate metabolism during the development of rice endosperm. *Plant Sci*. 82, 15-20.

33. **Nelson**, O., **Pan**, D. (1995) Starch synthesis in maize endosperms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. 46, 475-496.

34. **Baroja-Fernández**, E., **Muñoz**, F.J., **Zandueta-Criado**, A., **Morán-Zorzano**, M.T., **Viale**, A.M., **Etxeberria**, E., **Alonso-Casajús**, N., **Pozueta-Romero**, J. (2004) Most of ADPglucose linked to starch biosynthesis occurs outside the chloroplast in source leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101, 13080-13085.

35. **Muñoz**, F.J., **Baroja-Fernández**, E., **Morán-Zorzano**, M.T., **Viale**, A.M., **Etxeberria**, E., **Alonso-Casajús**, N., **Pozueta-Romero**, J. (2005) Sucrose synthase controls the intracellular levels of ADPglucose linked to transitory starch biosynthesis in source leaves *Plant Cell Physiol*. 2005 Aug; 46(8): 1366-76.

36. **Andersson**, M., **Melander**, M., **Pojmark**, P., **Larsson**, H., **Bülow**, L, **Hofvander**, P. (2006) "Targeted gene supresión by RNA interference: an efficient method for production of high-amylose potato lines" *J. Biotechnol*. 123, 137-148.

37. **Towbin**, H., **Staehelin**, T., **Gordon**, J. (1979) "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.

38. **Liu**, X.J., **Prat**, S., **Willmitzer**, L. **Frommer**, W.B. (1990) Cis regulatory elements directing tuber-specific and sucrose-inducible expresión of a chimeric class I patatin promoter-GUS-gene fusion. *Mol. Gen. Genetics* 223, 401-406.

39. **Houlné**, G., **Schantz**, M-L., **Meyer**, B., **Pozueta-Romero**, J., **Schantz**, R. (1994) "A chromoplast-specific protein in *Capsicum annuum*: characterization and expression of the corresponding gene" *Curr. Genet*. 26, 524-527.

40. **Hennegan**, K.P., **Danna**, K.J. (1998) pBIN20: An improved binary vector for Agrobacterium-mediated transformation. *Plant Mol. Biol., Rep*. 16, 129-131.

41. **Rocha-Sosa**, M., **Sonnewald**, U., **Frommer**, W., **Stratmann**, M., **Schell**, J., **Willmitzer**, L. (1989) Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatine gene. *EMBO J*. 8, 23-29.

42. **Gallie**, D.R., **Sleat**, D.E., **Watts**, J.W., **Turner**, P.C., **Wilson**, T-MA. (1987) The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts *in vitro* and *in vivo*. *Nucleic Acids Res*. 15, 3257-3273.

43. **Schinzel**, R., **Nidetzky**, B. (1999) Bacterial β-glucan phosphorylases. *FEMS Microbiol. Lett*. 171, 73-79.

44. **Yu**, F., **Jen**, Y., **Takeuchi**, E., **Inouye**, M., **Nakayama**, H., **Tagaya**, M., **Fukui**, T. (1988) β-glucan phosphorylase from *Escherichia coli. J. Biol. Chem*. 263, 13706-13711.

45. **Buchbinder**, J.L., **Rath**, V.L., **Fletterick**, R.J. (2001) Structural relatioships among regulated and unregulated phosphorylases. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct*. 30, 191-209.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la obtención de plantas transgénicas que comprende la transformación de la planta silvestre con el vector de expresión *Agrobacterium tumefaciens* CECT 7054 **caracterizado** por comprender el plásmido pBIN2035S-GP-NOS o *Agrobacterium tumefaciens* CECT 7055 **caracterizado** por comprender el plásmido pBIN20-B33-C1P-GP-NOS.

2. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la actividad GP de la proteína codificada y expresada en el interior de la planta transformada es al menos 5 veces superior a la actividad GP de la planta silvestre.

3. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el contenido en almidón de las plantas transgénicas obtenidas es al menos un 20% superior al contenido en almidón de las plantas silvestres sin transformar cultivadas en las mismas condiciones.

4. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el valor del contenido en amilosa de las plantas transgénicas obtenidas es al menos un 10% superior al valor del contenido en amilosa de las plantas silvestres sin transformar.

5. Procedimiento, según las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque la secuencia nucleotídica comprendida en el vector de expresión utilizado para transformar la planta silvestre se selecciona entre:

a. Una secuencia nucleotídica que codifique para la secuencia aminoacídica **caracterizada** por la SEQ ID NO: 4;

b. Una secuencia nucleotídica **caracterizada** por la SEQ ID NO: 3;

c. Una secuencia nucleotídica que hibride con las definidas en “a” o “b” y que codifique para un producto enzimático con actividad GP;

d. Una secuencia nucleotídica que difiera de las definidas en “a”, “b” o “c” debido a la degeneración del código genético.

6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la elevada actividad GP dentro de la planta transgénica transformada puede conseguirse tanto a nivel citosólico como a nivel plastidial.

7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la elevada actividad GP a nivel citosólico es conseguida mediante la transformación de la planta silvestre con *Agrobacterium tumefaciens* CECT 7054 que comprende el plásmido pBIN2035S-GP-NOS.

8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la elevada actividad GP a nivel plastidial es conseguida mediante la transformación de la planta silvestre con *Agrobacterium tumefaciens* CECT 7055 que comprende el plásmido pBIN20-B33-C1P-GP-NOS.

9. Vector de expresión *Agrobacterium tumefaciens* CECT 7054 **caracterizado** por comprender el plásmido pBIN2035S-GP-NOS.

10. Vector de expresión *Agrobacterium tumefaciens* CECT 7055 **caracterizado** por comprender el plásmido pBIN20-B33-C1P-GP-NOS.

11. Célula transformada o infectada con el vector de las reivindicaciones 9 o 10.

12. Célula, según la reivindicación 11, **caracterizada** por ser una célula bacteriana o vegetal.

13. Célula bacteriana de *E. coli* CECT 7071, según la reivindicación 12, **caracterizada** por estar transformada con el plásmido pET15b-glgP y expresar el gen que codifica para la proteína GP recombinante.

14. Célula vegetal, según la reivindicación 12, **caracterizada** por estar transformada o infectada por *Agrobacterium tumefaciens* CECT 7054 que comprende el plásmido pBIN2035S-GP-NOS o por *Agrobacterium tumefaciens* CECT 7055 que comprende el plásmido pBIN20-B33-C1P-GP-NOS.

15. Célula vegetal, según la reivindicación 14, **caracterizada** por pertenecer a cualquiera de las siguientes especies de plantas: patata (*Solanum tuberosum*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), arroz (*Oryza sativa*), maíz (*Zea mays*) o arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*).

16. Uso de la célula de la reivindicación 13 para la producción de la proteína GP recombinante activa.

17. Uso de la célula de la reivindicación 13 para la producción de anticuerpos específicos frente a GP.

18. Uso de la célula de cualquiera de las reivindicaciones 11,12,14 y/ó 15 para la producción de almidón.

19. Planta transgénica transformada con el vector de las reivindicaciones 9 o 10 **caracterizada** por poseer alta actividad GP respecto a la planta silvestre, tanto a nivel citosólico como plastidial y, consecuentemente, un elevado contenido y rendimiento en almidón y un alto balance amilosa/amilopectina.

20. Planta transgénica, según la reivindicación 19, **caracterizada** porque su actividad GP es al menos 5 veces superior a la actividad GP de la planta silvestre sin transformar.

21. Planta transgénica, según la reivindicación 19, **caracterizada** porque su contenido en almidón es al menos un 20% superior al contenido en almidón de las plantas silvestres sin transformar.

22. Planta transgénica, según la reivindicación 19, **caracterizada** porque el valor de su contenido en amilosa es al menos un 10% superior al valor del contenido en amilosa de las plantas silvestres sin transformar.

23. Planta transgénica, según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, **caracterizada** por expresar el gen glgP (SEQ ID NO: 3) y codificar para proteínas con alta actividad GP.

24. Planta transgénica, según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23, seleccionada el grupo que comprende: patata (*Solanum tuberosum*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), arroz (*Oryza sativa*), maíz (*Zea mays*) o arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*).

25. Uso de las plantas transgénicas de las reivindicaciones 19 a 24, para la producción de almidón.

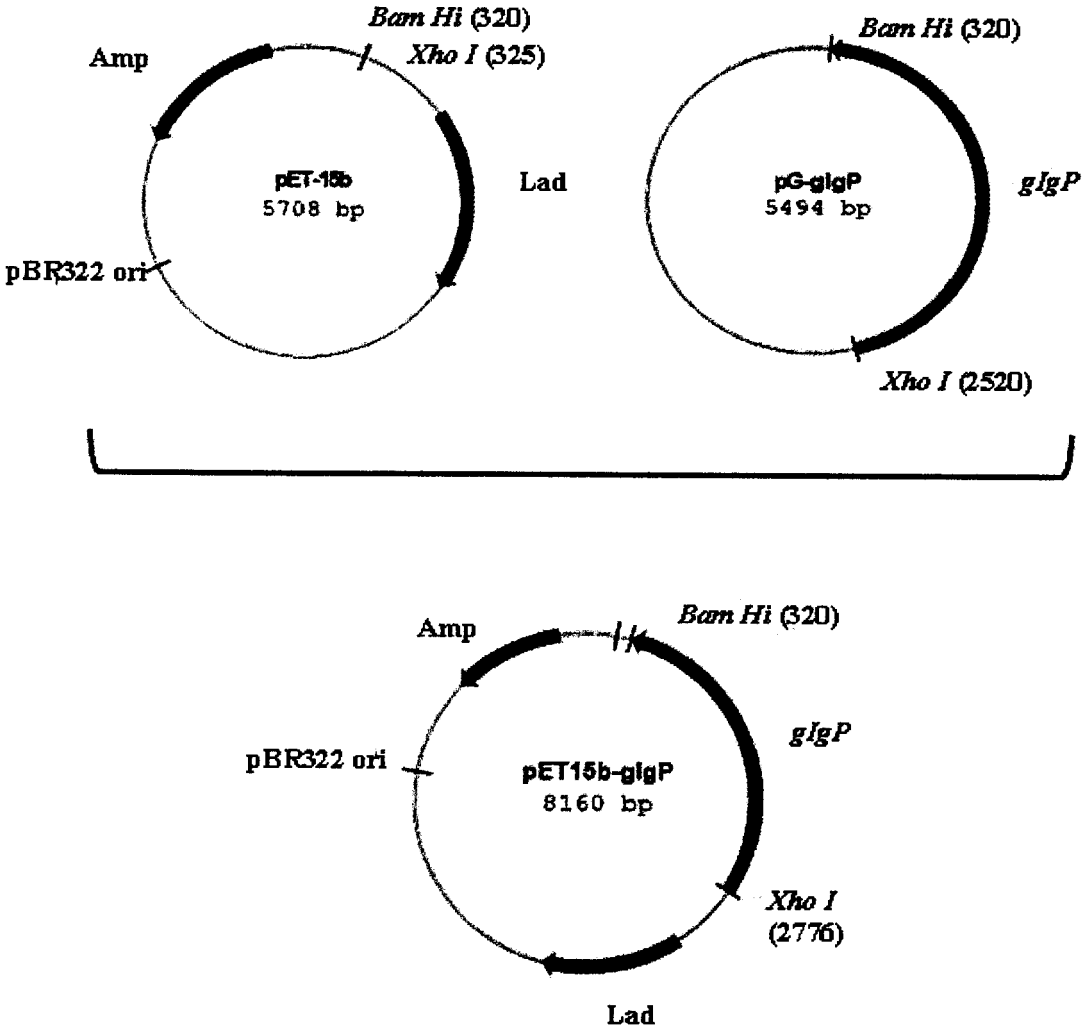

Bam Hi (320)
Amp
Xho I (325)
pET-15b
5708 bp
Lad
pBR322 ori
Bam Hi (320)
pG-glgP
5494 bp
glgP
Xho I (2520)
Amp
Bam Hi (320)
glgP
pBR322 ori
pET15b-glgP
8160 bp
Xho I
(2776)
Lad

Figura 1

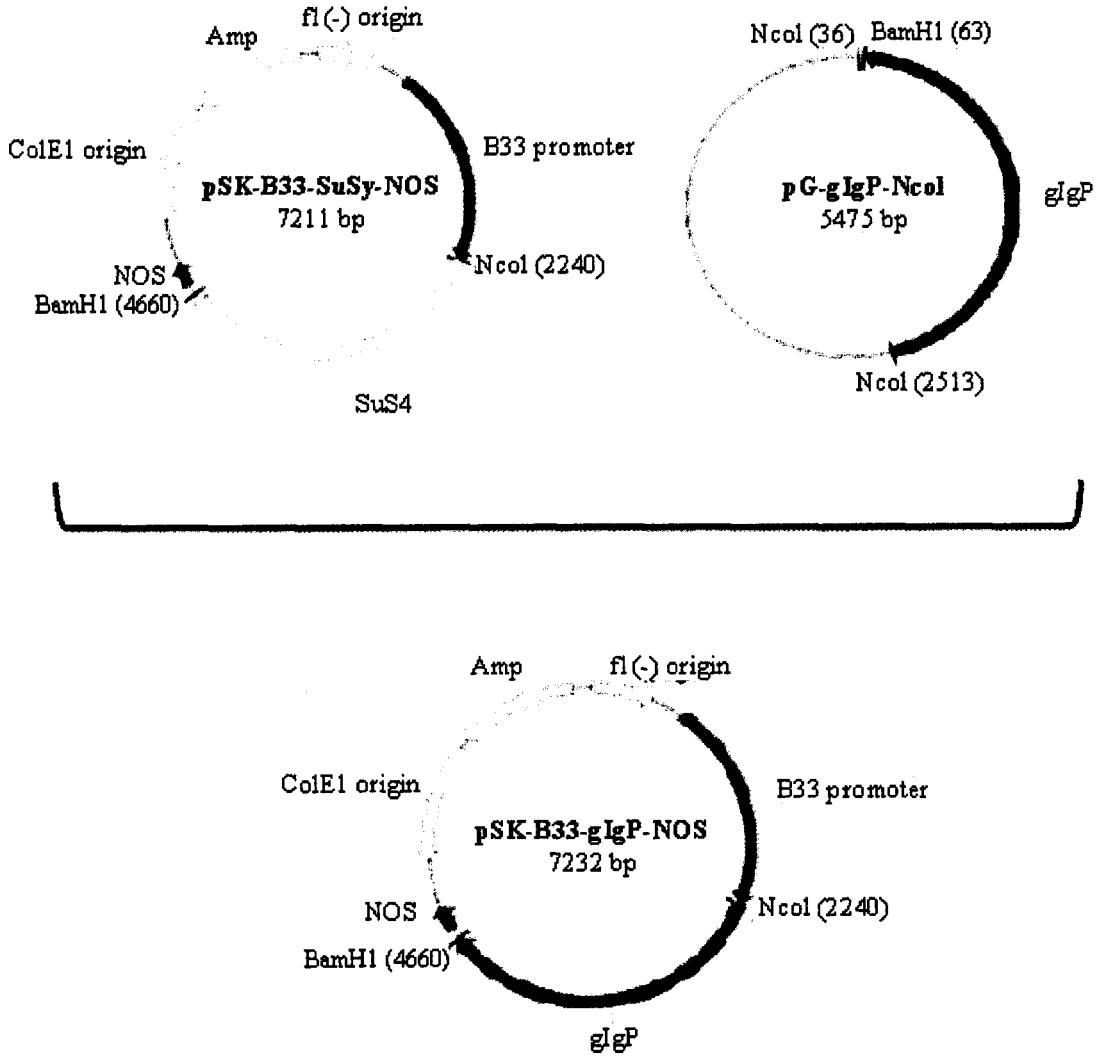
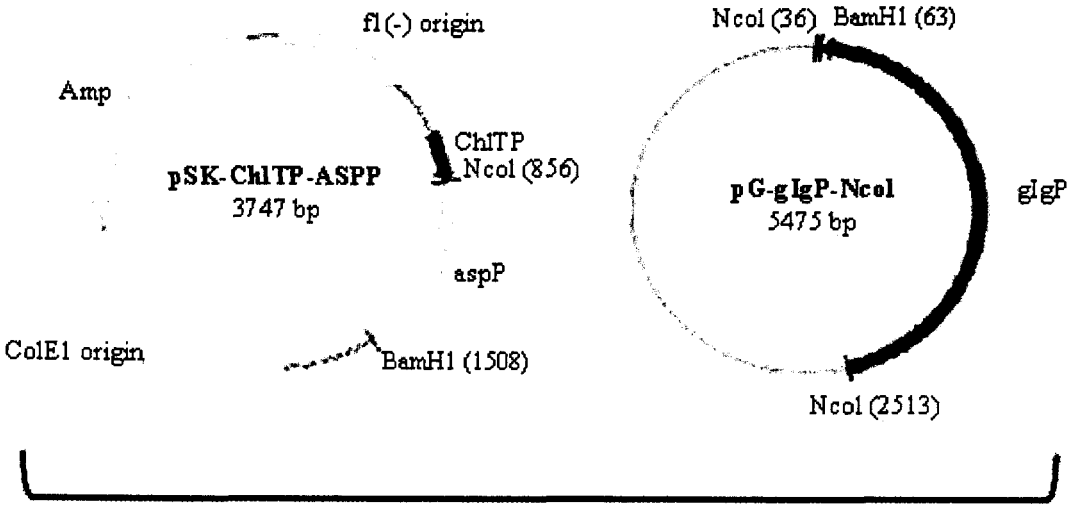

Amp
f1 (-) origin
ColE1 origin
pSK-B33-SuSy-NOS
7211 bp
B33 promoter
NOS
BamH1 (4660)
NcoI (2240)
SuS4
NcoI (36)
BamH1 (63)
pG-gIgP-NcoI
5475 bp
gIgP
NcoI (2513)
Amp
f1 (-) origin
ColE1 origin
pSK-B33-gIgP-NOS
7232 bp
B33 promoter
NOS
BamH1 (4660)
NcoI (2240)
gIgP

Figura 2A


f1(-) origin
Amp
ChlTP
NcoI (856)
pSK-ChlTP-ASPP
3747 bp
aspP
ColE1 origin
BamH1 (1508)
NcoI (36)
BamH1 (63)
pG-gIgP-NcoI
5475 bp
gIgP
NcoI (2513)

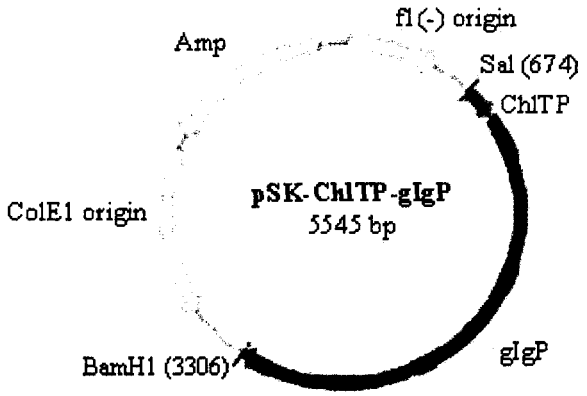

f1(-) origin
Amp
Sal (674)
ChlTP
ColE1 origin
pSK-ChlTP-gIgP
5545 bp
BamH1 (3306)
gIgP

Figura 2B

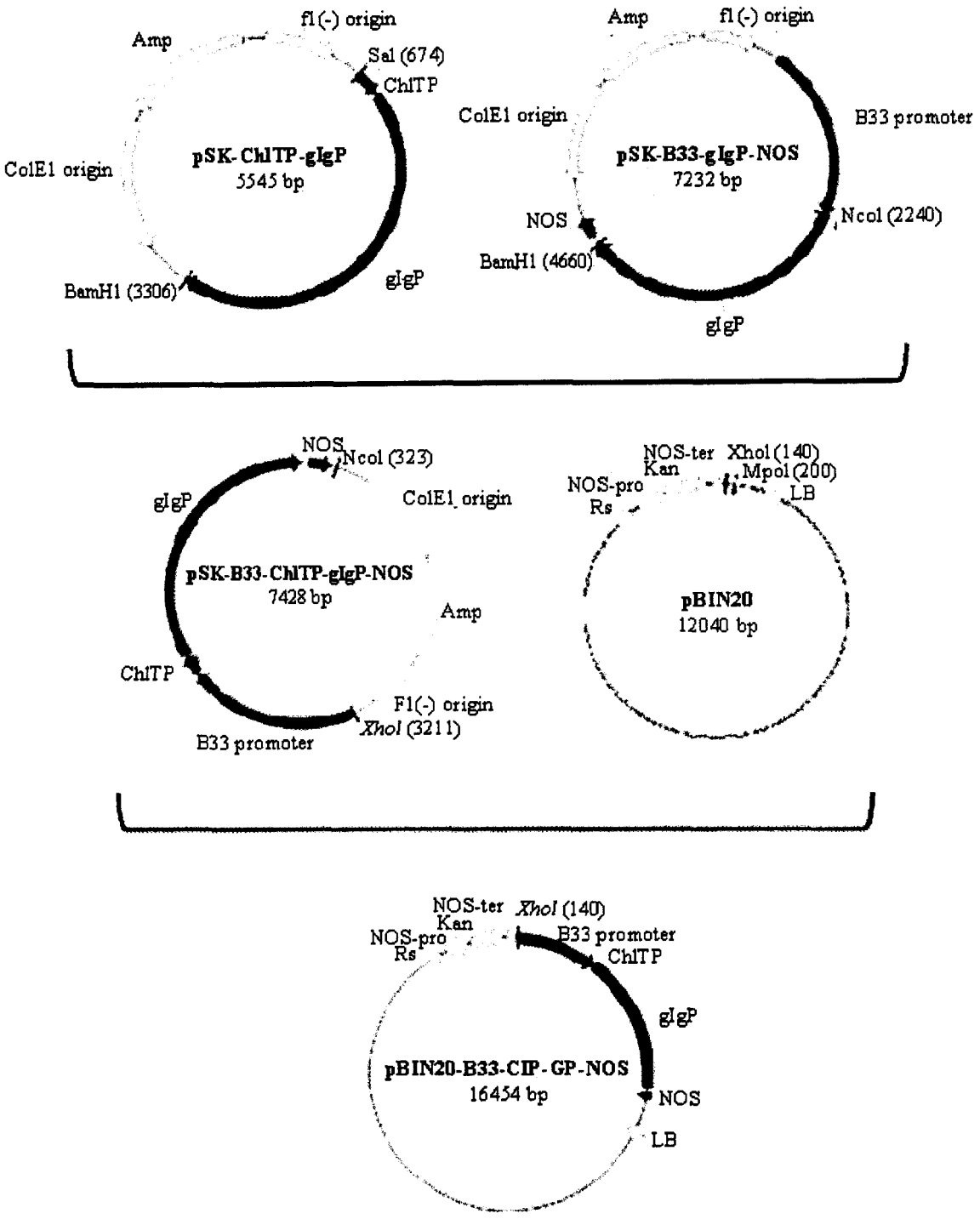

Amp
f1(-) origin
Sal (674)
ChlTP
ColE1 origin
pSK-ChlTP-glgP
5545 bp
BamH1 (3306)
glgP
Amp
f1(-) origin
ColE1 origin
B33 promoter
pSK-B33-glgP-NOS
7232 bp
NOS
NcoI (2240)
BamH1 (4660)
glgP
NOS
NcoI (323)
glgP
ColE1 origin
pSK-B33-ChlTP-glgP-NOS
7428 bp
Amp
ChlTP
F1(-) origin
XhoI (3211)
B33 promoter
NOS-ter
Kan
XhoI (140)
MpoI (200)
NOS-pro
Rs
LB
pBIN20
12040 bp
NOS-ter
Kan
XhoI (140)
NOS-pro
Rs
B33 promoter
ChlTP
glgP
pBIN20-B33-CIP-GP-NOS
16454 bp
NOS
LB

Figura 2C

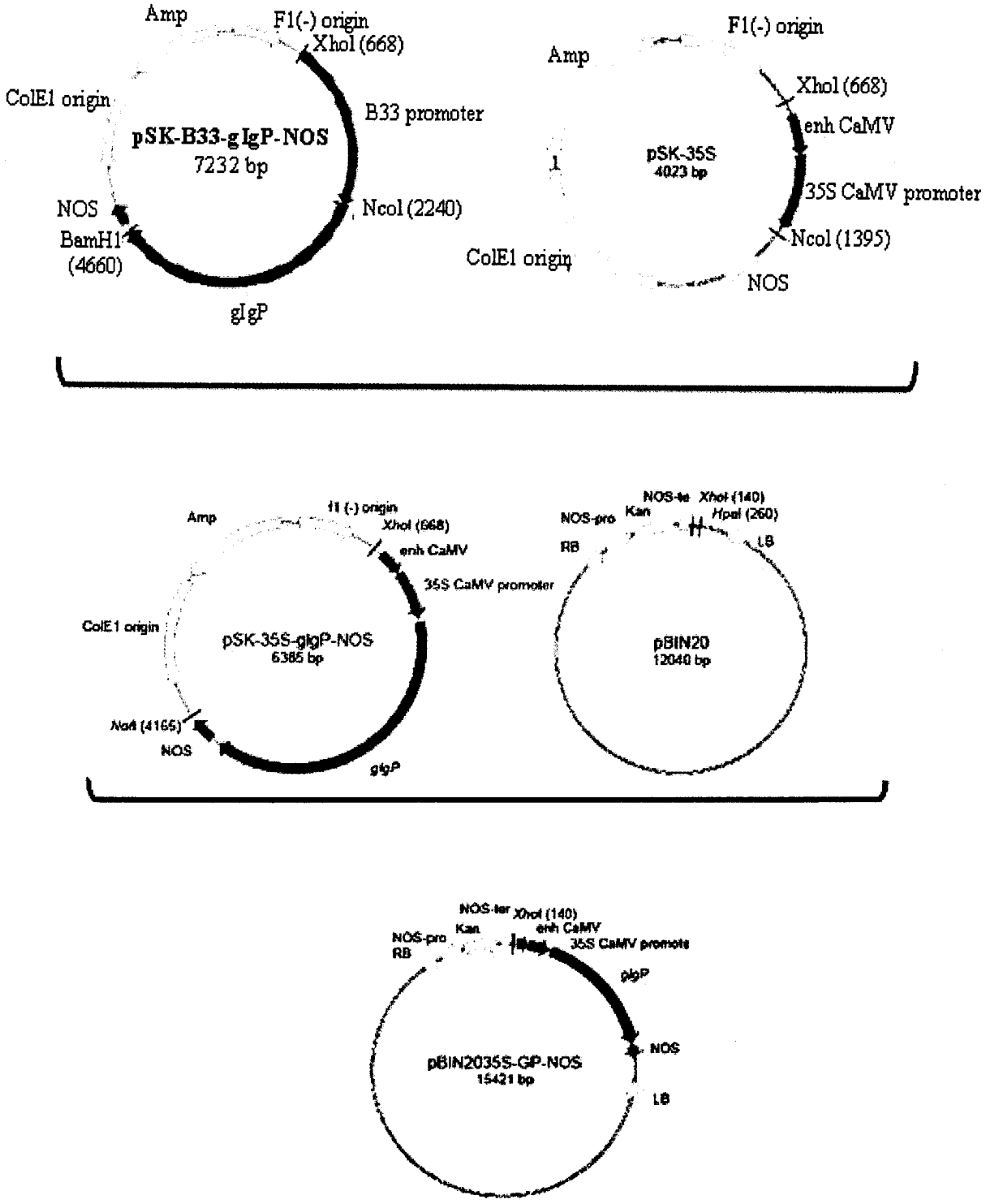

Amp
F1(-) origin
XhoI (668)
ColE1 origin
B33 promoter
pSK-B33-gIgP-NOS
7232 bp
NOS
BamH1
(4660)
NcoI (2240)
gIgP
F1(-) origin
Amp
XhoI (668)
enh CaMV
pSK-35S
4023 bp
35S CaMV promoter
NcoI (1395)
ColE1 origin
NOS
Amp
F1 (-) origin
XhoI (668)
enh CaMV
35S CaMV promoter
ColE1 origin
pSK-35S-gIgP-NOS
6385 bp
NotI (4166)
NOS
gIgP
NOS-ter
XhoI (140)
Kan
HpaI (260)
NOS-pro
RB
LB
pBIN20
12040 bp
NOS-ter
XhoI (140)
Kan
enh CaMV
NOS-pro
RB
35S CaMV promoter
gIgP
NOS
pBIN2035S-GP-NOS
15421 bp
LB

Figura 3

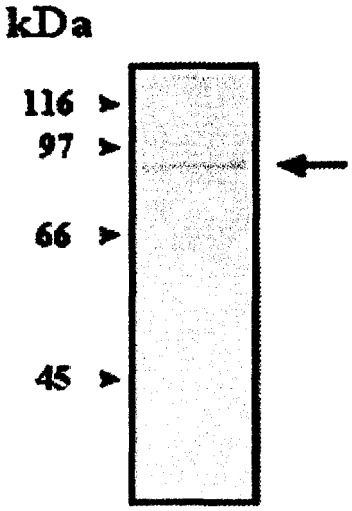


Figura 4

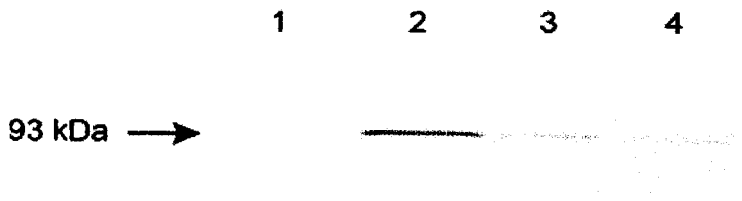


Figura 5

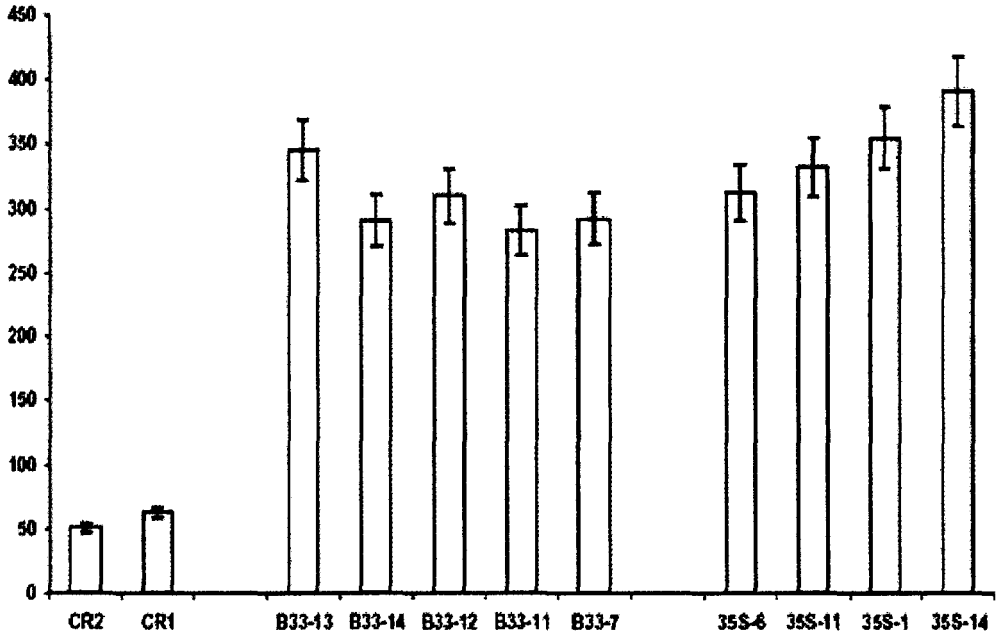

450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
CR2
CR1
B33-13
B33-14
B33-12
B33-11
B33-7
35S-6
35S-11
35S-1
35S-14

Figura 6

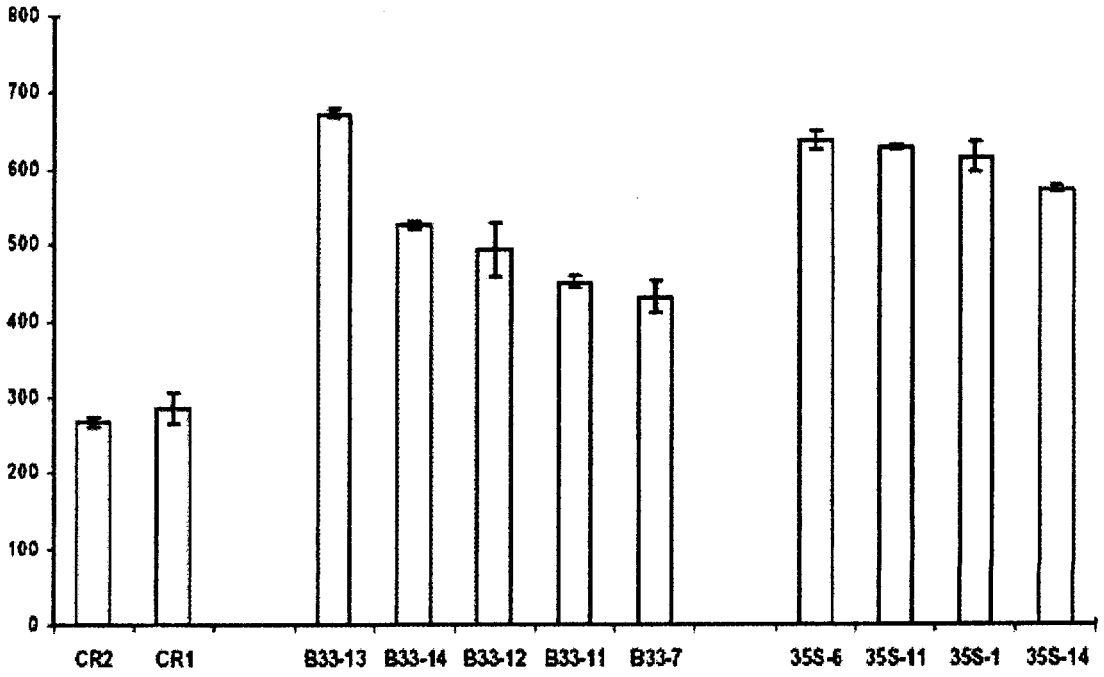

800
700
600
500
400
300
200
100
0
CR2
CR1
B33-13
B33-14
B33-12
B33-11
B33-7
35S-6
35S-11
35S-1
35S-14

Figura 7

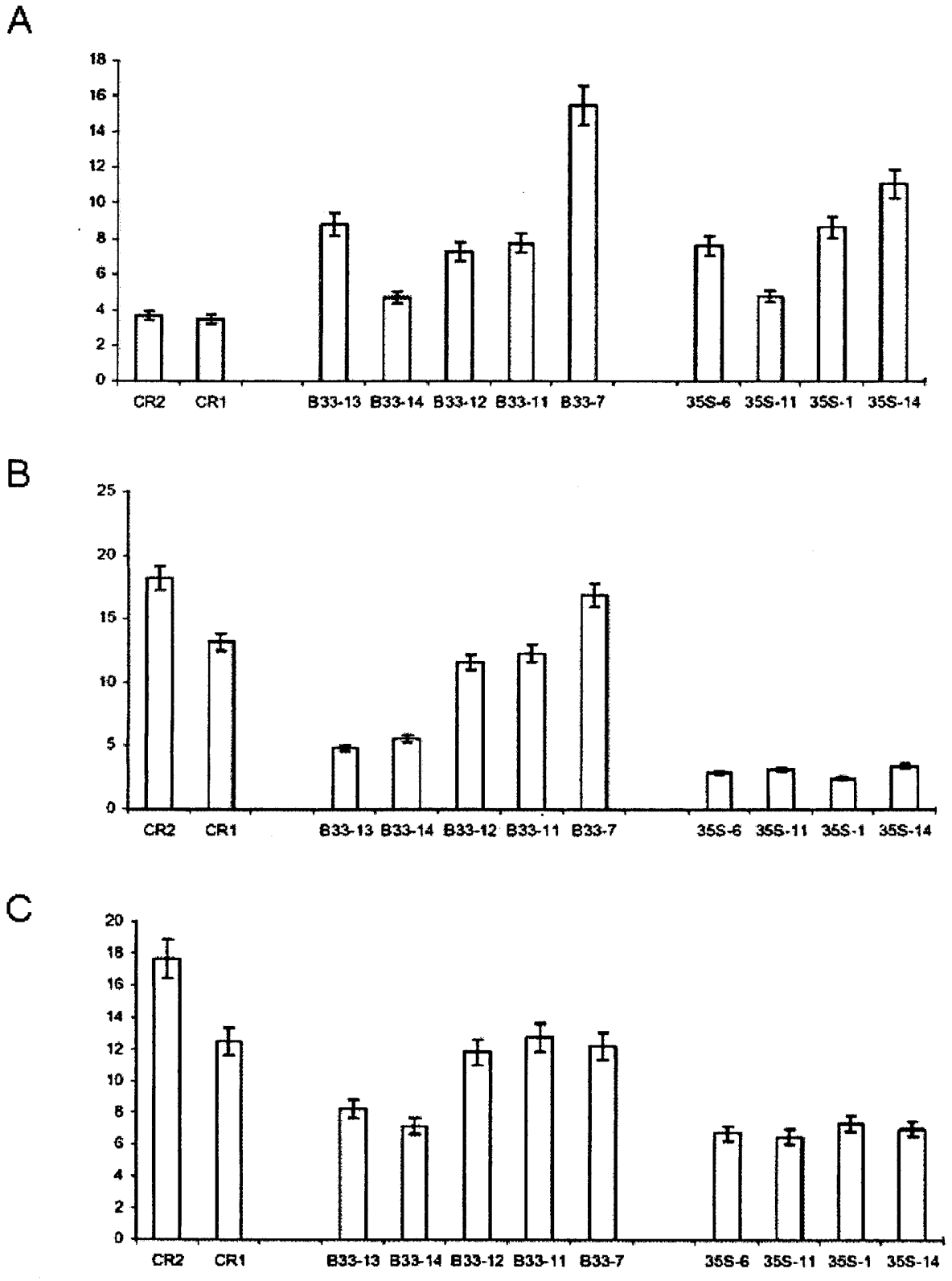

A
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
CR2
CR1
B33-13
B33-14
B33-12
B33-11
B33-7
35S-6
35S-11
35S-1
35S-14
B
25
20
15
10
5
0
CR2
CR1
B33-13
B33-14
B33-12
B33-11
B33-7
35S-6
35S-11
35S-1
35S-14
C
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
CR2
CR1
B33-13
B33-14
B33-12
B33-11
B33-7
35S-6
35S-11
35S-1
35S-14

Figura 8

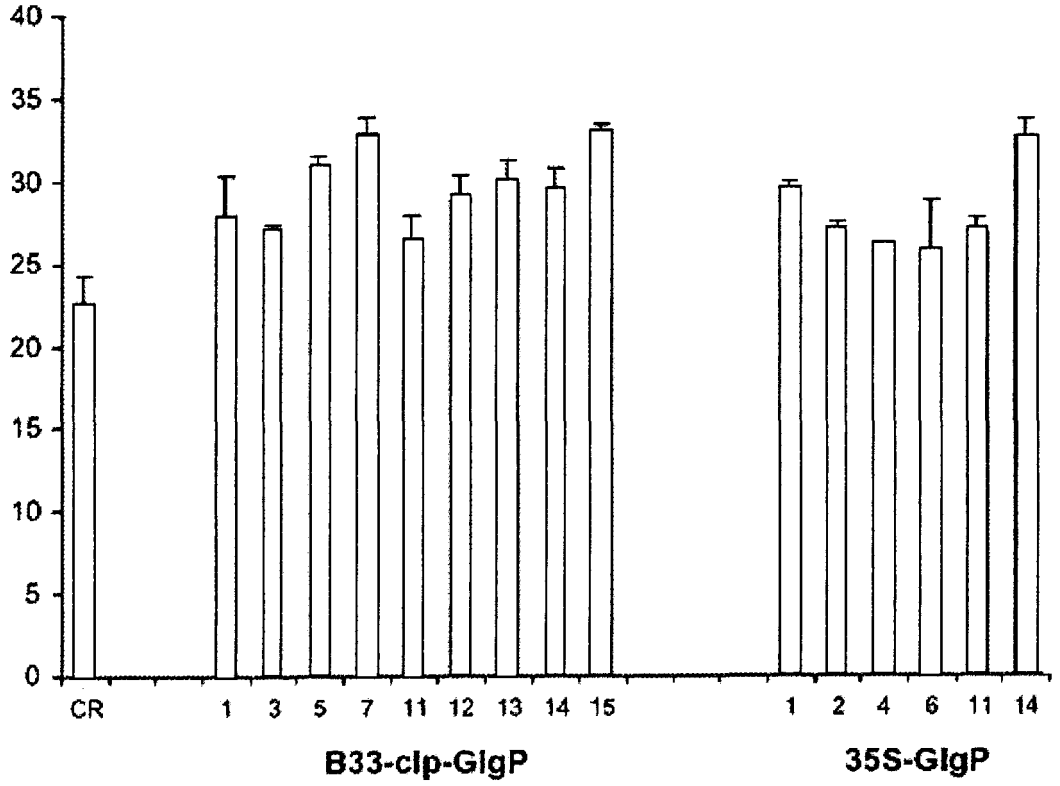

40
35
30
25
20
15
10
5
0
CR
1
3
5
7
11
12
13
14
15
1
2
4
6
11
14
B33-clp-GlgP
35S-GlgP

Figura 9

LISTA DE SECUENCIAS

<110> IDEN CARBOHYDRATE BIOTECHNOLOGY, S.L.

<120> Procedimiento de producción de plantas transgénicas que presentan un alto contenido y rendimiento en almidón y con alto balance amilosa/amilopectina.

<130> P-02382

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 43
<212> DNA
<213> *Escherichia coli*
<223> Cebador 5' de glgP

<400> 1
gctagcagga gctcgagtcc atgaatgctc cgtttacata ttc 43

<210> 2
<211> 31
<212> DNA
<213> *Escherichia coli*
<223> Cebador 3' de glgP

<400> 2
ggatccttac aatctcaccg gatcgatatg c 31

<210> 3
<211> 2448
<212> DNA
<213> *Escherichia coli*
<223> Gen glgP

<400> 3
atggatgctc cgtttacata ttcatcgccc acgcttagcg tagaagctct taagcactct 60
atcgcttaca agctgatgtt tacgattgga aaggacccgg tcgtcgccaa taaacatgaa 120
tggctgaacg caacgttatt tgctgtgcgc gatcgtctcg tggagcgctg gttacgttca 180
aaccgtgccc agttgtcgca agaaactcgt caggtttact acctgtcgat ggagtttttg 240
attggccgta cgctctccaa cgccatgttg tcgctaggaa tttacgaaga tgtacagggc 300
gcactggaag cgatggggtt aaatctcgaa gagctgattg atgaagaaaa tgacccaggc 360
ctcggtaacg gtggcctggg acgtctggcg gcttgcttcc ttgattctct ggcgacgtta 420
gggttgccgg ggcgcggtta cggcatccgc tatgactacg gtatgttcaa gcagaacatc 480
gttaacggta gccagaaaga gtcgccagac tactggctgg aatacggtaa cccgtgggaa 540
ttcaaacgcc acaacacgcg ctataaagtc cgttttggcg gtcgcattca gcaggaaggt 600
aaaaaaacgc gctggattga aaccgaagag attctgggag tcgcttacga tcagataatc 660

aaaaaaacgc gctggattga aaccgaagag attctgggag tcgcttacga tcagataatc 660
cctggttacg acaccgacgc gaccaacacg ctgcgtttgt ggagtgcgca agccagtagc 720
gaaattaacc tcggtaaatt caaccagggt gactacttcg cggcagtgga agataaaaac 780
cactccgaga acgtatctcg cgtactgtat ccggatgact ccacctactc cgggcgtgac 840
gtgcgcctgc gtcaggaata cttcctggtt tcctcgacca ttcaggacat tttaagccgc 900
cattatcagt tgcataaaac ctacgataac ctggcggata aaatcgcgat tcatctcaat 960
gatacccatc cggtactgtc gattcctgag atgatgcgtc tgctgatcga tgagcaccaa 1020
tttagctggg acgacgcgtt tgaggtgtgt tgtcaggtct tctcctacac taaccacacg 1080
ctgatgagcg aggcgctgga aacctggccg gttgatatgc tgggtaaaat tctgccgcgt 1140
cacctgcaga tcatctttga aatcaacgac tatttcctga aaaccttgca ggaacagtat 1200
ccgaacgata ccgatctgct gggacgggcg tcgatcattg atgaatccaa cggtcgtcgt 1260
gtgcgtatgg cctggctggc ggttgttgtg agccacaaag ttaacggtgt atcggaactg 1320
cactctaatc tgatggtgca atcgttgttt gccgactttg cgaaaatctt cccgggtcgt 1380
ttcaccaacg tcaccaacgg tgtgacgccg cgtcgctggc tggcggtagc gaacccatcg 1440
ctttcagccg tgctggacga acacctgggc cgtaactggc gcaccgacct tagcctgctt 1500
aatgagctgc aacaacactg tgatttccca atggttaatc acgctgtgca tcaggcgaag 1560
ctggagaaca aaaagcgtct ggcagagtat atcgcccagc agctgaatgt ggtggtgaat 1620
ccaaaggcgt tgttcgatgt acaaatcaaa cgtattcacg aatacaaacg tcaattgatg 1680
aatgtgttgc atgtgattac ccgctataac cgcatcaagg ccgacccgga tgcgaagtgg 1740
gtaccgcgcg tgaatatttt tggcggtaag gcggcttcgg cctattacat ggcgaagcac 1800
attattcatt tgatcaatga cgtagcgaaa gtgatcaaca acgatccgca gattggcgat 1860
aagctgaaag tcgtgttcat cccgaactac agcgttagcc tggcgcagtt gatcattccg 1920
gcggcagatc tgtctgaaca gatttcgctg gcagggacgg aagcttccgg caccagtaac 1980
atgaagtttg cgcttaacgg tgcgctgact atcggtacgt tggacggtgc gaatgtcgag 2040
atgctggatc atgtcggtgc tgacaatatc tttatttttg gtaacacagc ggaagaagtg 2100
gaagaactgc gtcgtcaggg ctacaaaccg cgtgaatact acgagaaaga tgaggagctg 2160
catcaggtgc tgacgcaaat cggcagcggt gtattcagtc cggaagatcc gggtcgctat 2220
cgcgatctgg ttgattcgct gatcaacttc ggcgatcact accaggtact ggcggattat 2280
cgcagctatg tcgattgtca ggataaagtc gatgaactct acgagcttca ggaagagtgg 2340
accgcaaaag cgatgctgaa cattgccaat atgggctact tctcttctga ccgtactatc 2400
aaagagtacg ccgatcatat ctggcatatc gatccggtga gattgtaa 2448

<210> 4
<211> 815
<212> PRT
<213> *Escherichia coli*
<223> Péptido glgP

<400> 4

```
Met Asp Ala Pro Phe Thr Tyr Ser Ser Pro Thr Leu Ser Val Glu Ala
1               5                   10                  15

Leu Lys His Ser Ile Ala Tyr Lys Leu Met Phe Thr Ile Gly Lys Asp
            20                  25                  30

Pro Val Val Ala Asn Lys His Glu Trp Leu Asn Ala Thr Leu Phe Ala
        35                  40                  45

Val Arg Asp Arg Leu Val Glu Arg Trp Leu Arg Ser Asn Arg Ala Gln
    50                  55                  60

Leu Ser Gln Glu Thr Arg Gln Val Tyr Tyr Leu Ser Met Glu Phe Leu
65                  70                  75                  80

Ile Gly Arg Thr Leu Ser Asn Ala Met Leu Ser Leu Gly Ile Tyr Glu
                85                  90                  95

Asp Val Gln Gly Ala Leu Glu Ala Met Gly Leu Asn Leu Glu Glu Leu
            100                 105                 110

Ile Asp Glu Glu Asn Asp Pro Gly Leu Gly Asn Gly Gly Leu Gly Arg
        115                 120                 125

Leu Ala Ala Cys Phe Leu Asp Ser Leu Ala Thr Leu Gly Leu Pro Gly
    130                 135                 140

Arg Gly Tyr Gly Ile Arg Tyr Asp Tyr Gly Met Phe Lys Gln Asn Ile
145                 150                 155                 160

Val Asn Gly Ser Gln Lys Glu Ser Pro Asp Tyr Trp Leu Glu Tyr Gly
                165                 170                 175

Asn Pro Trp Glu Phe Lys Arg His Asn Thr Arg Tyr Lys Val Arg Phe
            180                 185                 190

Gly Gly Arg Ile Gln Gln Glu Gly Lys Lys Thr Arg Trp Ile Glu Thr
        195                 200                 205
```

Glu Glu Ile Leu Gly Val Ala Tyr Asp Gln Ile Ile Pro Gly Tyr Asp
210 215 220

Thr Asp Ala Thr Asn Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ala Gln Ala Ser Ser
225 230 235 240

Glu Ile Asn Leu Gly Lys Phe Asn Gln Gly Asp Tyr Phe Ala Ala Val
245 250 255

Glu Asp Lys Asn His Ser Glu Asn Val Ser Arg Val Leu Tyr Pro Asp
260 265 270

Asp Ser Thr Tyr Ser Gly Arg Asp Val Arg Leu Arg Gln Glu Tyr Phe
275 280 285

Leu Val Ser Ser Thr Ile Gln Asp Ile Leu Ser Arg His Tyr Gln Leu
290 295 300

His Lys Thr Tyr Asp Asn Leu Ala Asp Lys Ile Ala Ile His Leu Asn
305 310 315 320

Asp Thr His Pro Val Leu Ser Ile Pro Glu Met Met Arg Leu Leu Ile
325 330 335

Asp Glu His Gln Phe Ser Trp Asp Asp Ala Phe Glu Val Cys Cys Gln
340 345 350

Val Phe Ser Tyr Thr Asn His Thr Leu Met Ser Glu Ala Leu Glu Thr
355 360 365

Trp Pro Val Asp Met Leu Gly Lys Ile Leu Pro Arg His Leu Gln Ile
370 375 380

Ile Phe Glu Ile Asn Asp Tyr Phe Leu Lys Thr Leu Gln Glu Gln Tyr
385 390 395 400

Pro Asn Asp Thr Asp Leu Leu Gly Arg Ala Ser Ile Ile Asp Glu Ser
405 410 415

Asn Gly Arg Arg Val Arg Met Ala Trp Leu Ala Val Val Val Ser His
420 425 430

Lys Val Asn Gly Val Ser Glu Leu His Ser Asn Leu Met Val Gln Ser
435 440 445

Leu Phe Ala Asp Phe Ala Lys Ile Phe Pro Gly Arg Phe Thr Asn Val
450 455 460

Thr Asn Gly Val Thr Pro Arg Arg Trp Leu Ala Val Ala Asn Pro Ser
465 470 475 480

Leu Ser Ala Val Leu Asp Glu His Leu Gly Arg Asn Trp Arg Thr Asp
485 490 495

Leu Ser Leu Leu Asn Glu Leu Gln Gln His Cys Asp Phe Pro Met Val
500 505 510

Asn His Ala Val His Gln Ala Lys Leu Glu Asn Lys Lys Arg Leu Ala
515 520 525

Glu Tyr Ile Ala Gln Gln Leu Asn Val Val Val Asn Pro Lys Ala Leu
530 535 540

Phe Asp Val Gln Ile Lys Arg Ile His Glu Tyr Lys Arg Gln Leu Met
545 550 555 560

Asn Val Leu His Val Ile Thr Arg Tyr Asn Arg Ile Lys Ala Asp Pro
565 570 575

Asp Ala Lys Trp Val Pro Arg Val Asn Ile Phe Gly Gly Lys Ala Ala
580 585 590

Ser Ala Tyr Tyr Met Ala Lys His Ile Ile His Leu Ile Asn Asp Val
595 600 605

Ala Lys Val Ile Asn Asn Asp Pro Gln Ile Gly Asp Lys Leu Lys Val
610 615 620

Val Phe Ile Pro Asn Tyr Ser Val Ser Leu Ala Gln Leu Ile Ile Pro
625 630 635 640

Ala Ala Asp Leu Ser Glu Gln Ile Ser Leu Ala Gly Thr Glu Ala Ser
645 650 655

Gly Thr Ser Asn Met Lys Phe Ala Leu Asn Gly Ala Leu Thr Ile Gly
660 665 670

Thr Leu Asp Gly Ala Asn Val Glu Met Leu Asp His Val Gly Ala Asp
675 680 685

Asn Ile Phe Ile Phe Gly Asn Thr Ala Glu Glu Val Glu Glu Leu Arg
690 695 700

Arg Gln Gly Tyr Lys Pro Arg Glu Tyr Tyr Glu Lys Asp Glu Glu Leu
705 710 715 720

His Gln Val Leu Thr Gln Ile Gly Ser Gly Val Phe Ser Pro Glu Asp
725 730 735

Pro Gly Arg Tyr Arg Asp Leu Val Asp Ser Leu Ile Asn Phe Gly Asp
740 745 750

His Tyr Gln Val Leu Ala Asp Tyr Arg Ser Tyr Val Asp Cys Gln Asp
755 760 765

Lys Val Asp Glu Leu Tyr Glu Leu Gln Glu Glu Trp Thr Ala Lys Ala
770 775 780

Met Leu Asn Ile Ala Asn Met Gly Tyr Phe Ser Ser Asp Arg Thr Ile
785 790 795 800

Lys Glu Tyr Ala Asp His Ile Trp His Ile Asp Pro Val Arg Leu
805 810 815

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 200802608

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 12.09.2008

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***C12N15/82*** (01.01.2006)
A01H5/00 (01.01.2006)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	EP 1535998 A1 (UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA. CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 01.06.2005, página 5.	1,6,7,9,11,12,14,15
Y	EP 1721980 A1 (UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA. CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 15.11.2006, página 18.	1,6,7,9,11,12,14,15
Y	US 20060160192 A1 (KONSTANTIN VYACHESLAVOVICH RYBAK et al.) 20.07.2006, páginas 19-21.	1,6,7,9,11,12,14,15
A	SATOH H. et al. Mutation of the plastidial α-glucan phosphorylase gene in rice affects the synthesis and structure of starch in the endosperm. Julio 2008. *The Plant Cell*. Vol. 20, páginas 1833-1849. Página 1843.	1-25
A	CURTIS L. et al. The complexities of starch biosynthesis in cereal endosperms. Abril 2008. *Current Opinion in Biotechnology*. Vol. 19, páginas 160-165. Página 163.	1-25
A	SCHUPP N. et al. The relation of starch phosphorylases to starch metabolism in wheat. 2004. *Plant and Cell Physiology*. Vol. 45 (10), páginas 1471-1484. Página 1471.	1-25

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado
☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
03.03.2011	I. Rueda Molins	1/4

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

C12N, A01H

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 03.03.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-25	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	2-5, 8, 10, 13, 16-25	**SI**
	Reivindicaciones	1, 6, 7, 9, 11, 12, 14, 15	**NO**

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EP 1535998 A1 (UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA. CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS)	01.06.2005
D02	EP 1721980 A1 (UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA. CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS)	15.11.2006
D03	US 20060160192 A1 (KONSTANTIN VYACHESLAVOVICH RYBAK et al.)	20.07.2006

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

La solicitud de patente divulga un procedimiento para la producción de plantas transgénicas que presentan alto contenido en almidón y alto balance amilosa/amilopectina.

Los documentos D01 y D02 reflejan un método para la obtención de plantas trasngénicas.

El documento D03 muestra la secuencia nucleotídica del gen *glgP*.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Artículos 6 y 8 LP 11/1986)

En las reivindicaciones 1, 6 y 7 de la solicitud de patente se reivindica un procedimiento para la obtención de plantas transgénicas que emplea el vector de expresión de *Agrobacterium tumefaciens* CECT 7054 caracterizado por comprender el plásmido pBIN2035S-GP-NOS. En la reivindicación 9 de la solicitud de patente se reivindica dicho vector y en las reivindicaciones 11, 12, 14 y 15 una célula transformada con el mismo.

Los documentos D01 y D02 muestran un procedimiento para la obtención de plantas transgénicas, con un vector de expresión de *Agrobacterium tumefaciens* que comprende un plásmido determinado. Las etapas de construcción de dicho plásmido (que se muestran tanto en la página 5 del documento D01 como en la página 18 del documento D02), son similares a las que se divulgan en la página 11 de la solicitud de patente (empleadas para la construcción del plásmido pBIN2035S-GP-NOS) . La diferencia fundamental entre el plásmido pBIN2035S-GP-NOS reivindicado en la solicitud de patente y los plásmidos divulgados en los documentos D01 y D02 reside en la secuencia de interés introducida en dichas construcciones.

El documento D03 divulga (con la secuencia 13 de la página 19) una secuencia nucleotídica del gen *glgP.* Es precisamente este gen el que comprende el plásmido pBIN2035S-GP-NOS divulgado en la solicitud de patente.

La construcción de un plásmido (pBIN2035S-GP-NOS) siguiendo las etapas divulgadas en el documento D01, o en el documento D02, que contenga la secuencia del gen *glgP*, divulgada en el documento D03, no presentaría dificultad técnica para un experto en la materia. Igualmente, el empleo de dicho plásmido para la transformación de células resultaría evidente para un experto en la materia. Por tanto, las reivindicaciones 1, 6, 7, 9, 11, 12, 14 y 15, presentan novedad pero no actividad inventiva, en el sentido de los Artículos 6 y 8 LP 11/1986.