

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 583**

51 Int. Cl.:
C12N 9/04 (2006.01)
C12N 9/08 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 5/04 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
A01H 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08151759 .1**
96 Fecha de presentación: **21.02.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2093283**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.08.2009**

54 Título: **Medios para mejorar los rasgos agrobiológicos en una planta, proporcionando una célula vegetal que comprende en sus cloroplastos actividades enzimáticas para convertir el glicolato en malato.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.08.2012

73 Titular/es:
**UNIVERSITÄT ZU KÖLN
ALBERTUS-MAGNUS-PLATZ
50923 KÖLN, DE**

72 Inventor/es:
**Maurino, Verónica G. y
Flügge, Ulf-Ingo**

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 386 583 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Medios para mejorar los rasgos agrobiológicos en una planta, proporcionando una célula vegetal que comprende en sus cloroplastos actividades enzimáticas para convertir el glicolato en malato.

5 La presente invención se refiere a la mejora de rasgos agrobiológicos en plantas. Más específicamente, se relaciona con una célula vegetal que comprende en sus cloroplastos actividades enzimáticas para convertir el glicolato en malato, en donde dicha célula vegetal comprende un primer polipéptido que tiene actividad de glicolato oxidasa, un segundo polipéptido que tiene actividad de malato sintasa y un tercer polipéptido que tiene actividad de catalasa. También se abarca una planta que comprende dichas células vegetales, así como semillas que se obtienen de las citadas plantas. La presente invención, además, se relaciona con un método para producir una
10 planta transgénica o una célula vegetal que tiene una mayor eficiencia en el uso del agua o un rendimiento mayor. La presente invención contempla los polinucleótidos que comprenden una combinación de ácidos nucleicos que codifica los polipéptidos mencionados anteriormente, así como vectores que comprenden los polinucleótidos y los usos de estos.

15 La asimilación de CO₂ fotosintético en plantas C₃ se limita por variables ambientales incluyendo temperatura, disponibilidad de agua y CO₂. Gran parte de esta limitación, se puede atribuir a las propiedades catalíticas de ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RubisCO). Ambos O₂ y O₂ atmosférico producido por el fotosistema II compiten con el CO₂ por el enlace con el sitio activo de RubisCO. La oxigenación de la ribulosa 1,5-bisfosfato (RuBP) produce solo una molécula de 3-P glicerato, y los restantes dos carbonos forman 2-P glicolato. Este 2-P glicolato es el sustrato inicial del ciclo fotosintético C₂-oxidativo (el ciclo fotorespiratorio) que conduce a la pérdida de
20 CO₂ [1].

La primera función del ciclo fotorespiratorio es salvar el 2-P glicolato (Figura 1). En el curso de esta ruta, dos moléculas de 2-P glicolato se metabolizan para formar una molécula de cada uno 3-P glicerato y CO₂, y estos compuestos de carbono se utilizan inmediatamente para la regeneración de RuBP vía el ciclo de Calvin-Benson (el ciclo fotosintético C₃- reductivo) sin la síntesis neta de triosas fosfatos [2, 3].

25 El 2-P glicolato se metaboliza en tres compartimientos celulares distintos a saber, cloroplastos, peroximas, y mitocondrias (el sitio de la liberación de CO₂ y NH₄⁺), involucrando numerosas reacciones enzimáticas y procesos de transporte (Figura 1). La vía de fotorespiración se basa en la estrecha integración del metabolismo de carbono y nitrógeno en la hoja, porque el NH₄⁺ se libera a la misma velocidad que el CO₂ [4]. Dado que el nitrógeno es un recurso más valioso que el carbono, la re asimilación del NH₄⁺ fotorespirado es esencial para mantener el estado del
30 nitrógeno en las plantas C₃ [5]. El amoníaco liberado en la matriz de mitocondrias durante el curso de la oxidación de la glicina se utiliza en el cloroplasto por la glutamina sintetasa (GS) que cataliza la conversión de ATP dependiente del glutamato a la glutamina. El glutamato sintasa dependiente de ferredoxina (GOGAT), localizado exclusivamente en los cloroplastos de células mesofílicas, cataliza la conversión de la glutamina y 2-oxoglutarato a dos moléculas de glutamato (Figura 1).

35 Uno de los enfoques para mejorar la actividad de carboxilación de RubisCO, sería alterar las constantes cinéticas de RubisCO para CO₂ y O₂. Sin embargo, la ingeniería genética de RubisCO mediante mutagénesis de sitio dirigido para disminuir su actividad oxigenasa o su reemplazo con formas más eficientes, como aquellas de las algas rhodophyte en las cuales el factor de especificidad CO₂/O₂ es superior que el de la planta RubisCO superior, era hasta ahora de éxito limitado [6]. Otro enfoque para mejorar la fijación del carbono C₃ sería reducir fotorespiración directamente mediante la manipulación de enzimas en esta vía. A partir del análisis de mutantes de inserción se demostró que el bloqueo del procesamiento en cadena del metabolismo de fotorespiración de oxigenación de
40 RubisCO es letal [7-13]. Estos resultados sugieren que la fotosíntesis es poco probable que se mejore por manipulación directa de niveles de enzimas en la vía de fotorespiración. Por otro lado, han evolucionado varios modos de aumentar la actividad de la carboxilasa de RubisCO, mejorando la concentración actual de CO₂ en su sitio de acción. Ejemplos son los mecanismos de concentración de CO₂ de cianobacterias y algas [14-15] o el ciclo fotosintético de plantas C₄ [16]. Este último proporciona una bomba de CO₂, que conduce a un aumento de la relación CO₂/O₂ en el sitio de RubisCO y por lo tanto da como resultado una disminución de la actividad de la oxigenasa relativa a la actividad de la carboxilasa. En las plantas C₃, RubisCO opera *in vivo* a aproximadamente 25% de su Vmax mientras se cree que operan en o cerca a su Vmax en plantas C₄ [16]. Además, las actividades específicas de RubisCO son mayores en las plantas C₄, en comparación con las plantas C₃; por lo tanto menos proteína de RubisCO se necesita para lograr altas tasas de fotosíntesis en las plantas C₄. En consecuencia y debido al hecho que RubisCO es una enzima que consume N (20-30% del N de hojas totales en las plantas C₃, pero solo 6% en las plantas C₄), las plantas C₄ muestran una mayor eficiencia del uso de nitrógeno sintético que las plantas C₃ [17]. Se realizaron intentos para transferir las ventajas de fotosíntesis de C₄ como alta capacidad fotosintética, crecimiento rápido, y aumento de las eficiencias del uso de agua y nitrógeno por sobreexpresión de enzimas del ciclo C₄ en las plantas C₃ tales como *A. thaliana*, patata, tabaco y arroz [18-21]. Häusler et al. [21], han demostrado que la sobreexpresión de los genes del ciclo C₄ en las plantas C₃ (patata y tabaco) conduce a una atenuación de la fotorespiración pero también a cambios en el patrón de enzimas endógenas y contenidos de protectores UV. Recientemente, se demostró una atenuación del flujo a través de la fotorespiración completando la vía con ambas la
55

glioxilato carboligasa y tartronato semialdehído reductasa a partir de *E. coli* [22]. El ciclo fotorespiratorio no solo es un proceso derrochador que resulta inevitablemente de las propiedades cinéticas de RubisCO. También se puede considerar como un mecanismo de protección para las plantas C₃ expuestas a altas temperaturas y sequía. Para mencionar están la generación de metabolitos, tales como glicina, serina o unidades de un carbono, que se pueden exportar de la hoja o utilizar en otras vías metabólicas, por ejemplo glicina para la síntesis de glutatión [23,24] y la prevención de la excesiva sobre-reducción de la cadena de transporte de electrones disipando la energía de la luz, en particular cuando las plantas C₃ se exponen a intensidades de luz altas o a estrés por sequía (fotoprotección; [25, 26]).

WO 03/100066 revela una célula vegetal que comprende en sus cloroplastos actividades enzimáticas para convertir el glicolato en glicerato. La célula vegetal mostró una fotorespiración disminuida, una mayor asimilación de CO₂, aumento de la biomasa y mayor eficiencia en el uso del agua. El documento no revela la conversión de glicolato a malato.

Existe una necesidad de mejorar la asimilación de CO₂ en plantas y, en particular en las plantas C₃, con el fin de mejorar los rasgos agrrobiológicos de plantas de cultivo. Sin embargo, al mismo tiempo los inconvenientes mencionados anteriormente serán evitados.

En consecuencia, el problema técnico fundamental de la presente invención podría considerarse como la provisión de medios y métodos para cumplir con las necesidades mencionados anteriormente. El problema técnico se resuelve mediante el objeto de las reivindicaciones 1 a 29.

De esta manera, la presente invención se relaciona con una célula vegetal que comprende en sus cloroplastos actividades enzimáticas para convertir el glicolato en malato, en donde dicha célula vegetal comprende en sus cloroplastos un primer polipéptido que tiene actividad de glicolato oxidasa, un segundo polipéptido que tiene actividad de malato sintasa y un tercer polipéptido que tiene actividad de catalasa.

El término "célula vegetal" como se utiliza en este documento abarca las células de todos los tipos del tejido de la planta, i.e. a partir de hojas, raíces, tallos, tejido vascular, tallos, callos, cotiledones, tallos, anteras, peciolo, semillas o tejido embrionario de la planta. La célula huésped de acuerdo con la presente invención se puede obtener a partir de cualquier planta monocotiledónea o dicotiledónea. Preferiblemente, se puede obtener a partir de una planta modelo, preferiblemente *Arabidopsis thaliana*, o una planta de cultivo seleccionada del grupo que consiste de colza, onagra, cáñamo, cardo, cacahuete, canola, linaza, soja, cártamo, girasol, borraja, maíz, trigo, centeno, avena, arroz, cebada, algodón, mandioca, pimienta, plantas solanáceas, preferiblemente, patata, tabaco, berenjena o tomate, especies de vicia, guisante, alfalfa, plantas arbustivas (café, cacao, té), especies de salix, árboles (palma de aceite, coco) y gramíneas perennes y cultivos forrajeros. Los métodos apropiados para obtener las células huésped a partir de las plantas mencionadas anteriormente, así como condiciones para el cultivo de estas células, son bien conocidos en el oficio. Preferiblemente, la célula vegetal es una célula de una planta C₃.

El término "actividades enzimáticas" se refiere, preferiblemente, a actividades enzimáticas que se introducen en los cloroplastos mediante la introducción de uno o más polipéptidos que confieren las citadas actividades, i.e. que son capaces de convertir el glicolato en malato, preferiblemente, vía glioxilato como un intermedio. Los polipéptidos referidos en este documento serán, por lo tanto, enzimas que muestran las actividades enzimáticas mencionadas anteriormente cuando se presentan en un cloroplasto. Los polipéptidos preferidos que confieren las actividades enzimáticas necesarias para la conversión se revelan en otra parte en esta especificación en detalle. Se debe entender que los polipéptidos mencionados en este documento también pueden mostrar otras actividades biológicas. Con el fin de salvaguardar la localización de los polipéptidos que confieren las actividades mencionadas anteriormente en el cloroplasto, el polipéptido, preferiblemente, comprende un péptido de tránsito del cloroplasto. Los apropiados péptidos de tránsito del cloroplasto se conocen en el oficio y se describen en Bruce 2000, Trends in Cell Biology 10, 440-447 o Kleffmann 2004, Curr. Biol. 14, 354-362.

La célula vegetal de la presente invención comprende un cloroplasto que tiene una actividad de la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa endógena (RubisCO). Debido a las propiedades enzimáticas de RubisCO y sus dependencias sobre las presiones parciales de CO₂/O₂, solamente una fijación de CO₂ limitada es posible en un cloroplasto sin modificar. El cloroplasto compuesto por la célula vegetal de la presente invención, sin embargo, se diseña para permitir la conversión del glicolato en malato en el cloroplasto mediante la introducción en el cloroplasto las actividades enzimáticas que sean capaces de convertir el glicolato en glioxilato y, posteriormente, convertir el glioxilato en malato. Mediante la introducción de estas actividades enzimáticas en el cloroplasto, se establece un ciclo catabólico del glicolato completo. Como resultado de este ciclo, una molécula de glicolato se convierte en dos moléculas de CO₂ y la reducción del polvo en la forma de NADPH y NADH (glicolato + O₂ + NAD + NADP → 2 CO₂ + NADH + NADPH + 2H⁺ + H₂O). De esta manera, el CO₂ se libera directamente dentro del cloroplasto, lo que aumenta la presión parcial de CO₂. Esto, a su vez, reduce la actividad de la oxigenasa de RubisCO, con lo cual se crea un ciclo autoregulador. Para este fin, la célula vegetal, preferiblemente, además comprende una enzima NADP-málica y una piruvato deshidrogenasa. Preferiblemente, la célula vegetal de la presente invención, por lo tanto, tiene

una mayor eficiencia de asimilación de CO₂ en comparación con una célula vegetal que carece de actividades enzimáticas para convertir el glicolato en malato.

5 Ventajosamente, como resultado de la sorprendentemente mayor asimilación de CO₂, la célula vegetal de la presente invención permite la generación de plantas y, en particular, las plantas de cultivo, teniendo un rendimiento mayor y una eficiencia mejorada en el uso del agua como se revelará con más detalle en otra parte de esta especificación. Mediante la introducción de las actividades enzimáticas mencionadas anteriormente y, por lo tanto, un ciclo catabólico del glicolato completo en los cloroplastos, el CO₂ será liberado directamente y se volverá a fijar dentro del cloroplasto y reduciendo así la actividad de la oxigenasa de RubisCO mediante el aumento de la relación CO₂/O₂ (Figura 1).

10 En una modalidad preferida de la célula vegetal de la presente invención, los cloroplastos de la célula vegetal comprenden un primer polipéptido que tiene actividad de glicolato oxidasa, un segundo polipéptido que tiene actividad de malato sintasa y un tercer polipéptido que tiene actividad de catalasa.

15 Como se hace referencia en este documento, una glicolato oxidasa será capaz de convertir el glicolato en glioxilato y peróxido de agua (E.C. 1.1.3.15). Una malato sintasa será capaz de sintetizar el malato mediante la introducción de dos unidades de C a partir de la Acetil-CoA en glioxilato (E.C. 4.1.3.2). Una catalasa se refiere a una enzima que es capaz de convertir el peróxido de agua en agua y oxígeno (E.C. 1.11.1.6). Cualquier enzima capaz de realizar estas conversiones y síntesis se puede introducir en el cloroplasto de acuerdo con la presente invención. Las actividades enzimáticas mencionadas anteriormente se pueden determinar mediante ensayos bien conocidos en el oficio y descritos, preferiblemente, en los Ejemplos acompañantes a continuación.

20 Preferiblemente, dicho primer polipéptido, sin embargo, se codifica por un primer polinucleótido que comprende un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste de:

a. un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótido como se muestra en SEQ ID No: 1;

b. un ácido nucleico que codifica un polipéptido, que tiene una secuencia de aminoácido como se muestra en SEQ ID No: 2;

25 c. un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótido, que es al menos 50% idéntica a la secuencia de nucleótido mostrada en SEQ ID No: 1, en donde dicho ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene actividad de glicolato oxidasa; y

30 d. un ácido nucleico que codifica un polipéptido, que tiene una secuencia de aminoácido que es al menos 50% idéntica a la secuencia de aminoácido mostrada en SEQ ID No:2, en donde dicho polipéptido tiene actividad de glicolato oxidasa.

Dicho segundo polipéptido, preferiblemente, se codifica por un segundo polinucleótido que comprende un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste de:

a. un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótido como se muestra en SEQ ID No: 3;

35 b. un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido como se muestra en SEQ ID No: 4;

c. un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótido que es al menos 40% idéntica a la secuencia de nucleótido mostrada en SEQ ID No: 3, en donde dicho ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene actividad de malato sintasa; y

40 d. un ácido nucleico que codifica un polipéptido, que tiene una secuencia de aminoácido que es al menos 40% idéntica a la secuencia de aminoácido mostrada en SEQ ID No: 4, en donde dicho polipéptido tiene actividad de malato sintasa.

El tercer polipéptido, preferiblemente, se codifica por un tercer polinucleótido que comprende un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste de:

a. un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótido como se muestra en SEQ ID No: 5;

45 b. un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido como se muestra en SEQ ID No: 6;

c. un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótido que es al menos 50% idéntica a la secuencia de nucleótido mostrada en SEQ ID No: 5, en donde dicho ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene actividad de catalasa; y

5 d. un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido que es al menos 50% idéntica a la secuencia de aminoácido mostrada en SEQ ID No: 6, en donde dicho polipéptido tiene actividad de catalasa.

10 El término "polinucleótido" como se utiliza en este documento se refiere a una molécula de ácido nucleico lineal o circular. Abarca moléculas de ADN, así como ARN. El polinucleótido de la presente invención será proporcionado, preferiblemente, ya sea como un polinucleótido aislado (i.e. aislado a partir de su contexto natural) o en la forma modificada genéticamente. El término abarca polinucleótidos de cadena sencilla así como doble. Además, también se comprenden los polinucleótidos químicamente modificados incluyendo polinucleótidos modificados que ocurren naturalmente tales como polinucleótidos glicosilados o metilados o modificados artificiales tales como polinucleótidos biotinilados. El polinucleótido de la presente invención se caracteriza en que codificará un polipéptido como se hace referencia anteriormente. El polinucleótido, preferiblemente, tiene una secuencia específica de nucleótido como se menciona anteriormente. Además, debido a la degeneración del código genético, los polinucleótidos que se abarcan, codifican una secuencia específica de aminoácido como se ha indicado anteriormente.

20 Además, el término "polinucleótido" como se utiliza de acuerdo con la presente invención, además abarca variantes de los polinucleótidos específicos mencionados anteriormente. Dichas variantes pueden representar ortólogos, parálogos u otros homólogos del polinucleótido de la presente invención. Las variantes del polinucleótido, preferiblemente, comprenden una secuencia del ácido nucleico caracterizada porque la secuencia se puede derivar de las secuencias del ácido nucleico específicas mencionadas anteriormente por al menos una sustitución, adición y/o delección de nucleótido con lo cual la secuencia del ácido nucleico variante todavía se codifica un polipéptido que tiene la actividad como se especifica anteriormente. Las variantes también abarcan los polinucleótidos que comprenden una secuencia del ácido nucleico que es capaz de hibridizar a las secuencias del ácido nucleico específicas mencionadas anteriormente, preferiblemente, bajo condiciones rigurosas de hibridación. Estas condiciones estrictas se conocen por el experto y se pueden encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Un ejemplo preferido de las condiciones rigurosas de hibridación son las condiciones de hibridación en 6 x cloruro de sodio/citrato de sodio (= SSC) a aproximadamente 45°C, seguido por una o más etapas de lavado en 0.2 x SSC, 0.1% de SDS entre 50 a 65°C. El experto sabe que estas condiciones de hibridación difieren dependiendo del tipo de ácido nucleico y, por ejemplo cuando los solventes orgánicos están presentes, con respecto a la temperatura y la concentración de la solución reguladora. Por ejemplo, bajo "condiciones de hibridación estándar" la temperatura difiere dependiendo del tipo de ácido nucleico entre 42°C y 58°C en solución reguladora acuosa con una concentración de 0.1 a 5 x SSC (pH 7.2). Si el solvente orgánico está presente en la solución reguladora mencionada anteriormente, por ejemplo 50% de formamida, la temperatura en condiciones estándar es aproximadamente 42°C. Las condiciones de hibridación para híbridos de ADN:ADN son preferiblemente por ejemplo 0.1 x SSC y 20°C a 45°C, preferiblemente entre 30°C y 45°C. Las condiciones de hibridación para híbridos de ADN:ARN son preferiblemente, por ejemplo, 0.1 x SSC y 30°C a 55°C, preferiblemente entre 45°C y 55°C. Las temperaturas de hibridación mencionadas anteriormente se determinan por ejemplo para un ácido nucleico con aproximadamente 100 bp (= pares de base) de longitud y un contenido G + C del 50% en la ausencia de formamida. El experto sabe cómo determinar las condiciones de hibridación requeridas por referencia a los libros de texto tales como el libro de texto mencionado anteriormente, o los siguientes libros de texto: Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; Hames and Higgins (Ed.) 1985, "Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (Ed.) 1991, "Essential Molecular Biology: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford. De manera alterna, las variantes del polinucleótido se obtienen por técnicas basadas en PCR, tales como amplificación de ADN basada en cebador oligonucleótido mezclado, i.e. utilizando cebadores degenerados contra dominios conservados de los polipéptidos de la presente invención. Los dominios conservados del polipéptido de la presente invención se pueden identificar mediante una comparación de secuencias de la secuencia del ácido nucleico del polinucleótido o la secuencia de aminoácido del polipéptido de la presente invención con las secuencias de otros miembros de las familias de la enzima mencionadas de acuerdo con esta invención. Los oligonucleótidos apropiados como cebadores de PCR así como las condiciones de PCR apropiadas se describen en los Ejemplos acompañantes. Como una plantilla, el ADN o cADN de las bacterias, hongos, plantas o animales se pueden utilizar. Otras, variantes incluyen polinucleótidos que comprenden las secuencias del ácido nucleico que son al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idénticas a las secuencias del ácido nucleico específicas. Además, también se abarcan los polinucleótidos que comprenden las secuencias del ácido nucleico que codifican las secuencias del aminoácido que son al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idénticas a las secuencias específicas del aminoácido que se hace referencia en este documento. Los valores del porcentaje de identidad, preferiblemente, se calculan sobre la región total de la secuencia del aminoácido o ácido nucleico. Una serie de programas basados en una variedad de algoritmos está disponible para el experto, para la comparación de las diferentes secuencias. En este contexto, los algoritmos de Needleman and Wunsch o Smith and Waterman dan resultados particularmente fiables. Para llevar a cabo las alineaciones de la secuencia, se van a utilizar el programa PileUp (Higgins 1989,

CABIOS, 5 1989: 151-153) o los programas Gap and BestFit (Needleman 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453 and Smith 198, Adv. Appl. Math. 2: 482-489), que son parte del paquete del software GCG de Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711, versión 1991. Los valores de identidad de la secuencia indicados anteriormente en porcentaje (%) se van a determinar, preferiblemente, utilizando el programa GAP sobre la región total de la secuencia con los siguientes parámetros: Peso de Gap: 50, Peso de Longitud: 3, Apareamiento Promedio: 10.000 y Apareamiento Erróneo Promedio: 0.000, lo cual, a menos que se especifique de otra manera, siempre se utilizarán como parámetros estándar para alineaciones de secuencia.

Un polinucleótido que comprende un fragmento de cualquiera de las secuencias del ácido nucleico mencionadas anteriormente, también se abarca como un polinucleótido de la presente invención. El fragmento codificará un polipéptido que tiene aún la actividad como se especifica anteriormente. En consecuencia, el polipéptido puede comprender o consistir de los dominios del polipéptido de la presente invención que confiere la citada actividad biológica. Un fragmento como se entiende en este documento, preferiblemente, comprende al menos 50, al menos 100, al menos 250 o al menos 500 nucleótidos consecutivos de cualquiera de las secuencias del ácido nucleico mencionados anteriormente o codifica una secuencia de aminoácido que comprende al menos 20, al menos 30, al menos 50, al menos 80, al menos 100 o al menos 150 aminoácidos consecutivos de cualquiera de las secuencias del aminoácido mencionadas anteriormente.

Los polinucleótidos de la presente invención consisten esencialmente de las secuencias del ácido nucleico mencionadas anteriormente o comprenden las secuencias del ácido nucleico mencionadas anteriormente. Por lo tanto, también pueden contener otras secuencias del ácido nucleico. Específicamente, los polinucleótidos de la presente invención pueden codificar las proteínas de fusión en donde un socio de la proteína de fusión es un polipéptido que se codifica por una secuencia del ácido nucleico indicada anteriormente. Tales proteínas de fusión pueden comprender como parte adicional secuencias del péptido para monitorear la expresión (por ejemplo, proteínas fluorescentes verdes, amarillas, azules o rojas, fosfatasa alcalina y similar) o las llamadas "etiquetas" que pueden servir como un marcador detectable o como un medidor auxiliar para propósitos de purificación. Las etiquetas para los diferentes propósitos son bien conocidas en el oficio y comprenden las etiquetas FLAG, etiquetas 6-histidina, etiquetas MYC y similares.

Más preferiblemente, el primer, segundo y/o tercer polipéptido(s) mencionados anteriormente se expresan de polinucleótidos heterólogos, i.e. a partir de polinucleótidos que han sido de forma transitoria, por ejemplo, utilizando un vector de expresión, o estable, por ejemplo, utilizando una inserción de ADN-T o -P, introducida en la célula vegetal. El término "heterólogo" como se utiliza en este documento significa que los polinucleótidos no ocurren naturalmente en la célula vegetal. El término, por lo tanto, abarca polinucleótidos modificados o no modificados que se derivan de diferentes organismos o polinucleótidos modificados derivados de la célula vegetal de la invención. Se debe entender que el polinucleótido heterólogo comprenderá la expresión de las secuencias control que permite la expresión en la célula vegetal o las secuencias que permiten la integración del polinucleótido heterólogo en un locus en el genoma de la célula vegetal donde la expresión del polinucleótido heterólogo será controlada por expresión endógena de las secuencias control de la célula vegetal. Preferiblemente, el polinucleótido heterólogo comprende un ácido nucleico que tiene una secuencia del ácido nucleico del primer, el segundo o el tercer polinucleótido como se menciona a continuación, i.e. un polinucleótido que codifica una glioxilato oxidasa, un polinucleótido que codifica malato sintasa o un polinucleótido que codifica una catalasa, dos de los citados ácidos nucleicos o los tres de estos. Mediante la introducción de los polinucleótidos heterólogos mencionados anteriormente, se generan las células vegetales transgénicas. Tales células vegetales transgénicas se pueden obtener mediante las técnicas de transformación tal como se publica, y se cita, en: Plant Molecular Biology and Biotechnology (CRC Press, Boca Raton, Florida), chapter 6/7, pp.71-119 (1993); F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; en: Transgenic Plants, vol. 1, Engineering and Utilization, Ed.: Kung and R. Wu, Academic Press, 1993, 15-38; B. Jené et al., Techniques for Gene Transfer, en: Transgenic Plants, vol. 1, Engineering and Utilization, Ed.: Kung and R. Wu, Academic Press (1993), 128-143; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225. Preferiblemente, las plantas transgénicas se pueden obtener por transformación mediada de ADN-T o ADN-P. Tales sistemas de vector son, por regla general, caracterizados porque contienen al menos los genes *vir*, que se requieren para la transformación mediada por el *Agrobacterium*, y las secuencias que delimitan el ADN-P o -T (borde ADN-T o borde ADN-P). Los vectores apropiados se describen con detalle, en otra parte en la especificación.

La presente invención también se relaciona con una planta, que comprende la célula vegetal de la presente invención.

La planta de la presente invención, preferiblemente, se desarrolla a partir de la célula vegetal de la presente invención. De esta manera, se prevé que todas las células vegetales de la planta son células vegetales de acuerdo con la presente invención, i.e., comprenden en sus cloroplastos actividades enzimáticas para convertir el glicolato en malato. Como se ha expuesto anteriormente para las células vegetales de la invención, las plantas de la presente invención preferidas, se seleccionan del grupo que consiste de: plantas modelo, preferiblemente *Arabidopsis thaliana*, o plantas de cultivo, preferiblemente, colza, onagra, cáñamo, cardo, cacahuete, canola, linaza, soja, cártamo, girasol, borraja, maíz, trigo, centeno, avena, arroz, cebada, algodón, mandioca, pimienta, plantas solanáceas, preferiblemente, patata, tabaco, berenjena o tomate, especies de vicia, guisante, alfalfa, plantas de

arbustos (café, cacao, té), especies de salix, árboles (palma de aceite, coco) y gramíneas perennes y cultivos forrajeros. Preferiblemente, la planta de la presente invención es una planta C₃.

Preferiblemente, la planta de la presente invención tiene una mayor asimilación de CO₂ en comparación con una planta que carece de una célula vegetal de la presente invención. La asimilación de CO₂ como se utiliza en este documento se refiere a la conversión de CO₂ y agua en las moléculas orgánicas durante la fotosíntesis. Las reacciones químicas en este contexto son bien conocidas en el oficio y se describen en libros de texto estándar de bioquímica. Un aumento en la asimilación de CO₂, se pueden determinar mediante técnicas bien conocidos en el oficio y se describen en, preferiblemente, en los siguientes Ejemplos acompañantes. Preferiblemente, el aumento es significativo estadísticamente. Sí el aumento es significativo estadísticamente se puede determinar mediante pruebas estadísticas bien conocidas incluyendo, por ejemplo, prueba t de Student, prueba Mann-Whitney etc.. Más preferiblemente, dicho aumento es un aumento de al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40% o al menos 50% en CO₂ asimilado. Una planta que carece de una célula vegetal de la presente invención como se entiende en este documento, preferiblemente, se refiere a una planta control sin modificar de la misma variedad como la planta de la presente invención.

También preferiblemente, la planta de la presente invención tiene una fotorespiración atenuada en comparación con una planta que carece de una célula vegetal de la presente invención. La atenuación de la actividad de la vía de fotorespiración se puede determinar mediante técnicas bien conocidas. Los ensayos apropiados se revelan preferiblemente, en los siguientes Ejemplos acompañantes. La atenuación como se hace referencia en este documento, preferiblemente, es una atenuación estadísticamente significativa.

La planta de la presente invención, preferiblemente, tiene una mayor eficiencia del uso del agua en comparación con una planta que carece de una célula vegetal de la presente invención. La eficiencia en el uso del agua se aumenta dado que las estomas en las hojas se pueden mantener más cerca como resultado de una mayor asimilación de CO₂. En consecuencia, la pérdida de agua por evaporación se reduce. Un aumento en la eficiencia en el uso del agua se puede determinar mediante técnicas bien conocidas en el oficio y se describen en, preferiblemente, en los siguientes Ejemplos acompañantes. Preferiblemente, el aumento es significativo estadísticamente.

Más preferiblemente, dicho aumento es un aumento de al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40% o al menos 50%.

Preferiblemente, la planta de la presente invención produce un número mayor de hojas en comparación con una planta que carece de una célula vegetal de la presente invención. El número de hojas se puede contar o determinar basándose en el peso fresco o seco de las hojas. Preferiblemente, el aumento en el número de hojas es significativo estadísticamente. Más preferiblemente, dicho aumento es un aumento en los números de hojas de al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40% o al menos 50%.

Adicionalmente, la planta de la presente invención tiene un rendimiento mayor en comparación con una planta que carece de una célula vegetal de la presente invención. El término "rendimiento" como se utiliza en este documento abarca un aumento en biomasa (peso fresco o seco) de una parte de la planta o la planta total, y en particular, las partes cosechables de la planta. El aumento en biomasa puede ser aéreo o subterráneo. Un aumento en la biomasa subterránea puede ser debido a un aumento en la biomasa de parte de las plantas, tales como tubérculos, rizomas, bulbos etc. Se prefiere particularmente un aumento en uno o más de los siguientes: aumento en la biomasa de las raíces, aumento en el volumen de la raíz, aumento en el número de raíces, aumento en el diámetro de las raíces y aumento en la longitud de las raíces. El término rendimiento mayor, también abarca un aumento en el rendimiento de las semillas. Un aumento en el rendimiento de las semillas incluye: (i) aumento del rendimiento total de las semillas, que incluye un aumento en la biomasa de la semilla (peso de la semilla) y que puede ser un aumento en el peso de la semilla por planta o sobre una base de semilla individual; (ii) aumento del número de flores ("florejillas") por panícula; (iii) aumento del número de semillas rellenas; (iv) aumento del tamaño de semilla; (v) aumento de volumen de semilla; (vi) aumento del área de semilla individual; (vii) aumento de longitud y/o peso de semilla individual; (viii) aumento del índice de cosecha, que se expresa como una relación del rendimiento de partes cosechables, tales como semillas, sobre la biomasa total; (ix) aumento de tasa de llenado, (que es el número de semillas rellenas dividido por el número total de semillas y multiplicado por 100); y (x) aumento del peso de mil granos (TKW), el cual se extrapola del número de semillas rellenas contadas y su peso total. Un aumento de TKW puede resultar de un aumento del tamaño de semilla y/o peso de la semilla. Un aumento de TKW puede resultar de un aumento en el tamaño del embrión y/o tamaño del endosperma. Preferiblemente, el aumento en rendimiento es significativo estadísticamente. Más preferiblemente, dicho aumento es un aumento de al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40% o al menos 50% en rendimiento.

Finalmente, debido a que esta vía diseñada se localiza en los cloroplastos, el CO₂ se puede volver a fijar directamente y se libera menos amoníaco. De esta manera, se necesita un menor grado de re-asimilación del amoníaco y una mejora en la eficiencia del uso del nitrato también ocurrirá en la planta de la presente invención.

La presente invención abarca, además, una semilla que se obtiene de una planta de la presente invención. La semilla de la presente invención es capaz de generar (i.e. desarrollo en) una planta de la presente invención y, específicamente, una planta que tiene las características según se definen anteriormente.

5 Las plantas o células vegetales de la presente invención son, preferiblemente, las plantas transgénicas o células vegetales. En consecuencia, la presente invención contempla un método para producir una planta transgénica o una célula vegetal que tiene una mayor eficiencia en el uso del agua en comparación con una planta no-transgénica o célula vegetal correspondiente, dicho método comprende la introducción en los cloroplastos de la planta transgénica o de la célula vegetal de un primer polipéptido que tiene actividad de glicolato oxidasa, un segundo polipéptido que tiene actividad de malato sintasa y un tercer polipéptido que tiene actividad de catalasa, según se definen anteriormente.

10 La introducción de los polipéptidos, preferiblemente, se logra mediante la introducción de polinucleótidos heterólogos que codifican los polipéptidos mencionados anteriormente, según se discute con más detalle, en otra parte en esta especificación. Esta incluye la introducción transitoria en los vectores de expresión o integración estable en el genoma de las células vegetales vía, por ejemplo, inserción de ADN-P o -T. Se debe entender que, se puede introducir un polinucleótido heterólogo que comprende los ácidos nucleicos que codifican todos los polipéptidos mencionados anteriormente. De manera alterna, se pueden introducir polinucleótidos heterólogos separados cada vez que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido de los polipéptidos mencionados anteriormente. De esta manera, el método, preferiblemente, comprende las etapas de:

15 a. la introducción de al menos un polinucleótido heterólogo que codifica los citados polipéptidos en la planta de célula vegetal; y

20 b. la expresión de dichos polipéptidos a partir del al menos un polinucleótido citado.

25 La presente invención, también contempla un método para producir una planta transgénica o célula vegetal que tiene un rendimiento mayor en comparación con una correspondiente planta no-transgénica o célula vegetal, dicho método comprende la introducción en los cloroplastos de la planta transgénica o de la célula vegetal un primer polipéptido que tiene actividad de glicolato oxidasa, un segundo polipéptido que tiene actividad de malato sintasa y un tercer polipéptido que tiene actividad de catalasa, según se definen anteriormente. También, preferiblemente, el método comprende las etapas de:

30 a. la introducción de al menos un polinucleótido heterólogo que codifica los citados polipéptidos en la planta o de la célula vegetal; y

b. la expresión de dichos polipéptidos a partir de al menos un polinucleótido citado.

La presente invención abarca un polinucleótido, que comprende en combinación un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste de:

35 a. un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótido como se muestra en SEQ ID No: 1;

b. un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido como se muestra en SEQ ID No: 2;

c. un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótido que es al menos 50% idéntica a la secuencia de nucleótido mostrada en SEQ ID No: 1, en donde dicho ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene actividad de glicolato oxidasa; y

40 d. un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido que es al menos 50% idéntica a la secuencia de aminoácido mostrada en SEQ ID No:2, en donde dicho polipéptido tiene actividad de glicolato oxidasa;

un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste de:

45 a. un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótido como se muestra en SEQ ID No: 3;

b. un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido como se muestra en SEQ ID No: 4;

c. un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótido que es al menos 40% idéntica a la secuencia de nucleótido mostrada en SEQ ID No: 3 en donde dicho ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene actividad de malato sintasa; y

5 d. un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido que es al menos 40% idéntica a la secuencia de aminoácido mostrada en SEQ ID No: 4, en donde dicho polipéptido tiene actividad de malato sintasa; y

un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste de:

a. un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótido como se muestra en SEQ ID No: 5;

10 b. un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido como se muestra en SEQ ID No: 6;

c. un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótido que es al menos 50% idéntica a la secuencia de nucleótido mostrada en SEQ ID No: 5, en donde dicho ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene actividad de catalasa; y

15 d. un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido que es al menos 50% idéntica a la secuencia de aminoácido mostrada en SEQ ID No: 6, en donde dicho polipéptido tiene actividad de catalasa.

Mediante la introducción de cualquiera de los polinucleótidos de la presente invención, mencionados anteriormente, como un polinucleótido heterólogo en una célula vegetal o planta, las características mencionadas de acuerdo con la presente invención serán conferidas a la citada planta o célula vegetal.

20 La presente invención también contempla un vector que comprende uno de los polinucleótidos de la presente invención, mencionados anteriormente.

El término "vector", preferiblemente, abarca vectores de fago, plásmido, viral o retroviral también como cromosomas artificiales, tales como cromosomas artificiales de bacterias o levaduras. Además, el término también se relaciona con construcciones dirigidas que permiten la integración aleatoria o de sitio dirigida de la construcción dirigida en ADN genómico. Tales construcciones dirigidas, preferiblemente, comprenden ADN de longitud suficiente para ya sea recombinación homóloga o heteróloga como se describe en detalle a continuación. El vector que abarca los polinucleótidos de la presente invención, preferiblemente, además comprende marcadores seleccionables para la propagación y/o selección en un huésped. El vector se puede incorporar en una célula huésped mediante diversas técnicas bien conocidas en el oficio. Si se introduce en una célula huésped, el vector puede residir en el citoplasma o se puede incorporar en el genoma. En el último caso, se debe entender que el vector además puede comprender las secuencias del ácido nucleico que permiten la recombinación homóloga o inserción heteróloga. Los vectores se pueden introducir en las células procariotas o eucariotas vía técnicas convencionales de transformación o transfección. Los términos "transformación" y "transfección", conjugación y transducción, como se utiliza en el presente contexto, tienen la intención de comprender una multiplicidad de procesos previos al oficio para la introducción del ácido nucleico foráneo (por ejemplo ADN) en una célula huésped, incluyendo co-precipitación de fosfato de calcio, cloruro de rubidio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, competencia natural, agrupaciones basadas en carbono, transferencia químicamente mediada, electroporación o bombardeo de partículas (por ejemplo, "pistola génica"). Los métodos apropiados para la transformación o transfección de células huésped, incluyendo células vegetales, se pueden encontrar en Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) y otros manuales de laboratorio, tales como Methods in Molecular Biology, 1995, Vol. 44, Agrobacterium protocols, Ed.: Gartland and Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey. De manera alterna, un vector plásmido se puede introducir mediante técnicas de electroporación o de choque térmico. Si el vector es un virus, se puede empacar in vitro utilizando una línea celular de empaque, apropiada, antes de la aplicación a las células huésped. Los vectores retrovirales pueden ser de replicación competente o replicación defectiva. En el último caso, la propagación viral generalmente ocurrirá solo en células huésped complementarias.

Preferiblemente, el vector al que se hace referencia en este documento es apropiado como un vector de clonación, i.e. replicable en sistemas microbiológicos. Tales vectores aseguran la clonación eficiente en bacterias y, preferiblemente, levaduras u hongos y hacen posible la transformación estable de las plantas. Aquellos que se deben mencionar son, en particular, diversos sistemas de vectores co-integrados y binarios que son apropiados para la transformación mediada por ADN-T o mediada por ADN-P. Tales sistemas de vector, por regla general, se caracterizan porque contienen al menos los genes vir, que se requieren para la transformación mediada por el Agrobacterium, y las secuencias que delimitan los ADN-T o ADN-P (bordes ADN-T o ADN-P). Estos sistemas de vector, preferiblemente, también comprenden otras regiones reguladoras cis tales como promotores y terminadores

y/o marcadores de selección con los que las células huésped transformadas u organismos apropiados se pueden identificar. Mientras que los sistemas de vector co-integrados tienen genes *vir* y secuencias de ADN-T dispuestos en el mismo vector, los sistemas binarios se basan en al menos dos vectores, uno de los cuales lleva genes *vir*, pero no ADN-T, mientras que un segundo lleva ADN-T, pero no genes *vir*. Como consecuencia, los vectores mencionados en último lugar son relativamente pequeños, fáciles de manipular y se pueden replicar tanto en *E. coli* como en *Agrobacterium*. Estos vectores binarios incluyen vectores a partir de la serie pBIB-HYG, pCAMBIA, pPZP, pBecks, pGreen. Preferiblemente se utiliza de acuerdo con la invención pGreen II.. Una visión de los vectores binarios y su uso se pueden encontrar en Hellens 2000, Trends in Plant Science 5, 446-451. Adicionalmente, utilizando apropiados vectores de clonación, el polinucleótido de la invención se puede introducir en células huésped u organismos tales como plantas o animales y, por lo tanto, se utilizan en la transformación de plantas, tales como aquellas que se publican, y citan, en: Plant Molecular Biology and Biotechnology (CRC Press, Boca Raton, Florida), chapter 6/7, pp. 71-119 (1993); F.F. White, F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; en: Transgenic Plants, vol. 1, Engineering and Utilization, Ed.: Kung and R. Wu, Academic Press, 1993, 15-38; B. Jenet et al., Techniques for Gene Transfer, en: Transgenic Plants, vol. 1, Engineering and Utilization, Ed.: Kung and R. Wu, Academic Press (1993), 128-143; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225..

Más preferiblemente, el vector de la presente invención es un vector de expresión. En tal vector de expresión, el polinucleótido comprende un casete de expresión como se especifica anteriormente permitiendo la expresión en células eucariotas o fracciones aisladas de estos. Un vector de expresión, además del polinucleótido de la invención, también puede comprender otros elementos reguladores incluyendo transcripcional así como potenciadores de traducción. Preferiblemente, el vector de expresión también es un vector dirigido o de transferencia génica. Los vectores de expresión derivados de virus tales como retrovirus, virus vaccinia, virus adenoasociados, virus herpes, o virus papiloma bovino, se pueden utilizar para la entrega de los polinucleótidos o del vector de la invención en una población de células dirigidas. Métodos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica, se pueden utilizar para construir vectores virales recombinantes; ver, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. and Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994).

Los esqueletos del vector de expresión apropiados, preferiblemente, se derivan de vectores de expresión conocidos en la técnica, tales como vector de expresión de cADN Okayama-Berg pcDV1 (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcADN1, pcADN3 (Invitrogen) o pSPORT1 (GIBCO BRL). Otros ejemplos de vectores de expresión de fusión típicos son pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B., and Johnson, K.S. (1988) Gene 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), donde el glutatión S-transferasa (GST), maltosa proteína de enlace-E y proteína A, respectivamente, se fusionan con el ácido nucleico de interés que codifica una proteína que se expresa. La expresión del gen dirigido del vector pTrc se basa en la transcripción de un promotor de fusión *trp-lac* híbrido mediante polimerasa de ARN huésped. La expresión del gen dirigido a partir del vector pET 11 d se basa en la transcripción de un promotor de fusión T7-gn10-lac, que se media por una polimerasa de ARN viral coexpresada (T7 gn1). Esta polimerasa viral se provee por las cepas huéspedes BL21 (DE3) o HMS174 (DE3) a partir de un λ -profago residente que hospeda un gen T7 gn1 bajo el control transcripcional del promotor lacUV 5. Ejemplos de vectores de expresión en las levaduras *S. cerevisiae* comprenden pYeDesaturated (Baldari et al. (1987) Embo J. 6:229-234), pMfa (Kurjan and Herskowitz (1982) Cell 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) Gene 54:113-123) y pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Los vectores y procesos para la construcción de vectores que son apropiados para utilizar en otros hongos, tales como los hongos filamentosos, comprenden aquellos que se describen en detalle en: van den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, en: Applied Molecular Genetics of hongos, J.F. Peberdy et al., Ed., pp. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge, o en: More Gene Manipulations in Fungi (J.W. Bennett & L.L. Lasure, Ed., pp. 396-428: Academic Press: San Diego). Otros vectores de levaduras apropiados son, por ejemplo, pAG-1, YEp6, YEp13 o pEMBLYe23. Como una alternativa, los polinucleótidos de la presente invención también se pueden expresar en células de insectos utilizando vectores de expresión de baculovirus. Los vectores de baculovirus que están disponibles para la expresión de proteínas en células de insecto cultivadas (por ejemplo células Sf9) comprenden la serie pAc (Smith et al. (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) y la serie pVL (Lucklow and Summers (1989) Virology 170:31-39).

Los vectores de expresión que permiten la expresión en células vegetales comprenden aquellos que se describen en detalle en: Becker, D., Kemper, E., Schell, J., and Masterson, R. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", Plant Mol. Biol. 20:1195-1197; and Bevan, M.W. (1984) "Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation", Nucl. Acids Res. 12:8711-8721; Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; en: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, Ed.: Kung and R. Wu, Academic Press, 1993, p. 15-38. Un casete de expresión de la planta, preferiblemente, comprende secuencias reguladoras que sean capaces de controlar la expresión del gen en células vegetales y que se unen funcionalmente de tal manera que cada secuencia puede cumplir su función, tales como terminación transcripcional, por ejemplo señales de poliadenilación. Las señales de poliadenilación preferidas son aquellas que se derivan a partir de ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens*, tales como el gen 3 del plásmido pTiACH5 Ti, que se conoce como octopina sintasa (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835 et seq.) o equivalentes funcionales de estos, pero todos los otros terminadores que son funcionalmente activos en plantas también son apropiados. Dado que la expresión del gen de la planta es muy

frecuente no se limita a niveles transcripcionales, un casete de expresión de la planta preferiblemente comprende otras secuencias ligadas funcionalmente tales como potenciadores de traducción, por ejemplo la secuencia de sobrecarga, que comprende la secuencia líder en 5'-no traducida del virus mosaico del tabaco, que aumenta la relación proteína/ARN (Gallie et al., 1987, Nucl. Acids Research 15:8693-8711). Otras secuencias preferidas para el uso en el ligamiento funcional en casetes de expresión del gen de la planta son secuencias diana que se requieren para dirigir el producto génico en su compartimiento celular relevante. En el presente caso, en particular, el compartimiento relevante son los cloroplastos.

La presente invención también se relaciona con una composición que comprende

un primer polinucleótido que comprende un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste de:

- 10 a. un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótido como se muestra en SEQ ID No: 1;
- b. un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido como se muestra en SEQ ID No: 2;
- 15 c. un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótido que es al menos 50% idéntica a la secuencia de nucleótido mostrada en SEQ ID No: 1, en donde dicho ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene actividad de glicolato oxidasa; y
- d. un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido que es al menos 50% idéntica a la secuencia de aminoácido mostrada en SEQ ID No:2, en donde dicho polipéptido tiene actividad de glicolato oxidasa;

un segundo polinucleótido que comprende un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste de:

- 20 a. un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótido como se muestra en SEQ ID No: 3;
- b. un ácido nucleico que codifica un polipéptido, que tiene una secuencia de aminoácido como se muestra en SEQ ID No: 4;
- 25 c. un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótido, que es al menos 40% idéntica a la secuencia de nucleótido mostrada en SEQ ID No: 3, en donde dicho ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene actividad de malato sintasa; y
- d. un ácido nucleico que codifica un polipéptido, que tiene una secuencia de aminoácido que es al menos 40% idéntica a la secuencia de aminoácido mostrada en SEQ ID No: 4, en donde dicho polipéptido tiene actividad de malato sintasa; y

un tercer polinucleótido que comprende un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste de:

- 30 a. un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótido como se muestra en SEQ ID No: 5;
- b. un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido como se muestra en SEQ ID No: 6;
- 35 c. un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótido, que es al menos 50% idéntica a la secuencia de nucleótido mostrada en SEQ ID No: 5, en donde dicho ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene actividad de catalasa; y
- d. un ácido nucleico que codifica un polipéptido, que tiene una secuencia de aminoácido que es al menos 50% idéntica a la secuencia de aminoácido mostrada en SEQ ID No: 6, en donde dicho polipéptido tiene actividad de catalasa.

40 Como se indica en otra parte de esta especificación, tales composiciones comprenden polinucleótidos heterólogos que se pueden utilizar para conferir las actividades enzimáticas a una planta o célula vegetal que se requiere para mejorar las características mencionados en este documento.

Se comprenderá que los polinucleótidos, vectores o composiciones de la presente invención mencionados anteriormente, preferiblemente, son para ser utilizados, para conferir mayor eficiencia en el uso del agua a una planta o célula vegetal o para conferir un rendimiento mayor a una planta o célula vegetal.

FIGURAS

Figura 1. El ciclo de nitrógeno y carbono de la fotorespiración (negro) de un cortocircuito de la planta C3, mediante la vía catabólica de glicolato novedoso (rojo). Las enzimas transgénicas introducidas en los cloroplastos de *A. thaliana* se destacan en verde. Kat: catalasa; GDC: glicina descarboxilasa; GGAT: glutamato-glioxilato aminotransferasa; GK: glicerato quinasa; GO: glicolato oxidasa; GOGAT: glutamato-oxoglutarato aminotransferasa; GS: glutamina sintetasa; HPR: hidroxipiruvato reductasa; MDH: NAD-malato deshidrogenasa; ME: enzima NADP-málica; MS: malato sintasa; PDH: piruvato deshidrogenasa; PGP: fosfoglicolato fosfatasa; SGAT: serina-glutamato aminotransferasa; SHMT: serina hidroximetil transferasa. Adaptada de [3].

Figura 2. Las actividades enzimáticas en los extractos de hojas de plantas transgénicas y de tipo salvaje. A) actividad de glicolato oxidasa. B) actividad de malato sintasa. C) actividad de catalasa. Las barras de error indican la SE de tres determinaciones diferentes.

Figura 3. Características de crecimiento de plantas de 6 semanas cultivadas en condiciones de día corto a concentraciones de CO₂ ambiente (380 ppm) y alto (2,000 ppm).

Figura 4. Diferencias en la acumulación de almidón en hojas de plantas de 6 semanas transgénicas y de tipo salvaje cultivadas en días cortos (A-C); A) a 380 ppm; B) a 2,000 ppm; C) plantas transferidas durante seis días a 600 μmol de quanta m⁻² s⁻¹, durante el periodo de luz. D) Fenotipo de las plantas tratadas como en C.

Los siguientes ejemplos solamente ilustran la invención. En absoluto, no se deben interpretar como limitantes del alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: amplificación PCR de los transgenes

Los cADNs correspondientes para la glicolato oxidasa 2, a partir de hojas de *A. thaliana* (GO, At3g14420) y la malato sintasa a partir de cotiledones de la calabaza (MS, X56948) y la secuencia genómica a partir de catalasa de *E. coli* (KatE; M55161) fueron amplificados utilizando Platinum Pfx ADN polimerasa (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) y se clonan en pGEMT-Easy (Promega, Mannheim, Germany) o alternativamente, pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen). En los casos de GO y MS, fueron omitidos los nucleótidos que codifican para los últimos aminoácidos (A/SRL), que presumiblemente representan la señal dirigida peroxisomal (31, 32). Las siguientes combinaciones de cebador fueron utilizadas: GO fow (5'- TACAATTGGAGATCACTAACGTTAC-CGAGT-3' SEQ ID NO: 9) y GO rev1 (5'- TGGGACACTCCACGTCCTTAGTCTAGACTAGTA-3' SEQ ID NO: 10), MS fow (5'- ACACCGTCCGCTGGGAATGTATTCTGAATCGGCA-3' SEQ ID NO: 11) y MS rev1 (5'- CACATAGGCATACATCATCCCAGGTGAGTCGACGTT- 3' SEQ ID NO: 12) KatE fow1 (5'- ACACCGTCCGCAACATAACGAAAAGAAC-CCA- 3' SEQ ID NO: 13) y KatE rev1 (5'- ACGTCGACTCAGGCAG-GAATTTTGTCAATCT-3' SEQ ID NO: 14). Para seguir la estrategia de clonación, los cebadores fueron diseñados para introducir sitios MnlI y SpeI únicos en los extremos 5' y 3' de los sitios GO y Agel y Sall en los extremos 5' y 3' de MS y KatE. Con el fin de dirigir GO a los cloroplastos, las pre-secuencias dirigidas estromales a partir de la *fosfoglucomutasa* de la *A. thaliana* (PGM; 225 bp) se amplificó mediante PCR utilizando los siguientes cebadores: PGM fow (5'-TAGGTACCCAATCAACAATGACGTCGACCTAC-3' SEQ ID NO: 15) y PGM rev (5'-GAGATTAATCGTTGCCGACGAAGCAATTGTA-3' SEQ ID NO: 16).

Los oligonucleótidos fueron diseñados para introducir sitios KpnI y MnlI únicos en los extremos 5' y 3'. El fragmento obtenido se clonó en dirección 5' el cADN de GO. Para dirigir MS y KatE al cloroplasto un fragmento que contiene el promotor (715 bp) de la *subunidad tomate-RubisCO-pequeña* (rbcS3C; X66072) y el péptido transitorio (172 bp) se amplificó mediante PCR, utilizando el ADN genómico y los siguientes cebadores: rbcS3C fow (5'-ACGAGCTCATCCAGAATTGGCGTTGGATTA-3' SEQ ID NO: 17) y rbcS3C rev (5'- AGCAACGGTGGAA-GAGTCAGTTGCAACCGGTAT-3' SEQ ID NO: 18). Los cebadores fueron diseñados para introducir los sitios SacI y Agel únicos en los extremos 5' y 3'. El fragmento obtenido se insertó en dirección 5' de las regiones codificantes MS y *KatE*. Todas las construcciones del plásmido fueron secuenciadas utilizando el sistema terminador- colorante fluorescente PRISM (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) para excluir cualquier mutación posible que podría ser creada mediante la acción de la polimerasa.

Ejemplo 2: Construcción de vectores binarios

Para dirigir la expresión en *A. thaliana*, los ADNs que codifican el precursor plastídico de las enzimas se clonaron en una versión modificada del vector binario pGreenII [33, 34]. Los ADNs codificantes de las enzimas se clonaron en el vector binario utilizando diferentes estrategias. En el caso de MS y *KatE*, el promotor CaMV35S se cortó del vector y el promotor tomate-rbcS3C se utilizó para dirigir la expresión. Los genes marcadores de selección nosKan (resistencia a la canamicina), nosHyg (resistencia a la higromicina) y nosBAR 18 (resistencia a BASTA) se clonaron

en el sitio *Stul* dentro del vector pGreenII básico. GO se clonó en el vector pGreenII 35S-nosKan, MS en el vector pGreenII *rbcS3C-nosHyg* y *KatE* en el vector pGreenII *rbcS3C-nosBAR*, los plásmidos resultantes fueron denominados 35S:GO, *rbcS3C:MS* y *rbcS3C:KatE*.

Ejemplo 3: Transformación de *A. thaliana* y selección de transformantes

5 Los vectores binarios 35S:GO, *rbcS3C:MS* y *rbcS3C:KatE* fueron sometidos a electroporación en GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* que lleva el plásmido auxiliar pSoup y se utiliza para transformar las plantas *A. thaliana* (ecotipo Colombia, Col-0) vía infiltración de vacío [35]. Las semillas transformadas fueron seleccionadas ya sea por resistencia a la canamicina, higromicina o BASTA. El material de hojas se recolectó a partir de plantas seleccionadas y el ADN fue extraído por análisis de PCR. Las plantas que contienen los transgenes se dejaron auto-
10 polinizar. Las líneas transgénicas fueron sometidas a dos rondas más de selección y caracterización por medio de ensayos de PCR y actividad enzimática.

Las plantas se cultivaron, en principio, bajo un régimen de 8h-luz/16h-oscuridad a densidades de flujo de fotón fotosintéticamente activo (PPFD) de 100 o 600 μmol quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (intensidades de luz normal y elevada, respectivamente) y ajustado a temperaturas de 22°C día/18°C noche. Para el cultivo a condiciones de no-
15 fotorespiración, las plantas de tres semanas cultivadas en condiciones normales fueron transferidas a una cámara con una concentración de CO_2 de $2,000 \pm 200$ ppm.

Ejemplo 4: producción de transformantes GO-MS y GMK

Las líneas GO-MS fueron producidas, mediante la transformación de GO (línea 5, GO5) con el vector *rbcS3C:MS*. Las líneas que contienen los tres genes, las líneas GMK, fueron producidas por la re transformación de GO-MS
20 (línea 6, GO-MS6) con el vector *rbcS3C:KatE*. En todos los casos, las líneas se seleccionaron tomando ventaja de las diferentes resistencias de los transgenes y se corroboran por PCR, Southern blot y la determinación de actividades enzimáticas.

Ejemplo 5: Aislamiento del cloroplasto, preparación de extractos y mediciones enzimáticas

25 Los cloroplastos intactos se aislaron, como se describe por Kebeish et al. [22]. Los cloroplastos pelotizados fueron resuspendidos en la solución reguladora de extracción correspondiente (ver a continuación) y se utilizan directamente para las mediciones enzimáticas. *Glicolato oxidasa*: El material de hojas se homogenizó en la presencia de N_2 y se vuelven a suspender en solución reguladora de extracción que consiste en Hepes 100 mM, pH 7.2, EDTA 1 mM y 2-mercaptoetanol 10 mM. El homogenato se clarificó por centrifugación y se utilizaron alícuotas de 10 μl para los ensayos enzimáticos siguiendo el método de Yamaguchi and Nishimura [36] con las siguientes modificaciones: el medio de reacción contenía trietanolamina 100 mM, pH 7.8, EDTA 3 mM, glutatión oxidado 0.75 mM y fenilhidrazina 4 mM. La reacción se inició por la adición de glicolato de sodio 2.3 mM y se siguió espectrofotométricamente a 320 nm. Una unidad se define como la cantidad de enzima que cataliza la producción de 1 μmol de glioxilatofenilhidrazona por minuto calculada del coeficiente de extinción para el fenilhidrazona a 324 nm de $16.8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. *Malato sintasa*: El material de hojas se homogenizó en la presencia de N_2 y se vuelve a suspender en solución reguladora de extracción que consiste de Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 y MgCl_2 1 mM. El homogenato 20 se clarificó por centrifugación y se utilizaron alícuotas de 10 μl para los ensayos enzimáticos. La actividad de MS se determinó siguiendo el procedimiento descrito por Smith et al. [37]. El medio de reacción contenía Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, MgCl_2 5 mM, acetil-CoA 3 mM, ácido 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoico (DTNB) 1,6 mM. La reacción se inició por la adición de glioxilato 4 mM y se siguió espectrofotométricamente a 410 nm a 25°C. Una
35 unidad se define como la cantidad de enzima que cataliza la producción de 4-nitrotiolato 1 μmol por minuto calculada a partir del coeficiente de extinción para 4-nitrotiolato a 410 nm de $13.7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. *Catalasa*: El material de hojas se homogenizó en la presencia de N_2 y se vuelven a suspender en solución reguladora de extracción que consiste de KH_2PO_4 50 mM, pH 7.0, 1 % (v/v) de polivinilpirrolidona (PVP)-40 y 0.1% (v/v) de Triton X-100. La actividad de la catalasa se determinó en KH_2PO_4 50 mM, pH 7.0 como se describe por Havir and McHale [38]. La reacción se inició por la adición de H_2O_2 10 mM y se siguió a 240 nm a 25°C. Una unidad se define como la cantidad de enzima que cataliza la descomposición de 1 μmol de H_2O_2 por minuto, calculada a partir del coeficiente de extinción para H_2O_2 a 240 nm de $43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.
40
45

Ejemplo 6: Determinaciones del contenido de H_2O_2 y glioxilato

50 *Peróxido de hidrógeno*: el contenido de H_2O_2 se determinó siguiendo una versión modificada del protocolo descrito por Okuda et al. [39]. Las hojas (50-100 mg) fueron homogenizadas en la presencia de N_2 y 500 μl de HClO_4 0.2 M y se centrifugaron a 20,000g durante 5 min a 4°C. Para retirar el HClO_4 , 300 μl del sobrenadante se neutralizó a pH 7.5 con KOH 4N y la solución se centrifugó a 1,000g durante 1 min a 4°C. 200 μl del sobrenadante se aplicaron a una columna de 1.2 ml de AG-1 (0.8 cm x 4 cm; BioRad, Hercules, USA), y la columna se lavó dos veces con 800 μl de agua destilada. El segundo eluato que contiene el H_2O_2 se utilizó para la prueba. La mezcla de reacción contenía
55 500 μl del eluato, 200 μl de p-dimetilaminobenzaldehído (DMAB), 12.5 mM en solución reguladora de fosfato 0.375 M,

pH 6.5), 40 μ l de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH, 0.05% peso/v) y 10 μ l de peroxidasa (12.5 U/ml) en un volumen total de 750 μ l. La reacción se inició por la adición de peroxidasa y después de 8 min de incubación a 25°C, se observó el aumento de la absorbancia a 590 nm. *Glioxilato*: La determinación del glioxilato se realizó utilizando una modificación del protocolo descrito por Häusler et al. [40]. El material de hojas (30-100 mg) se homogenizó en la presencia de N₂ y 500 μ l de HCl 100 mM y 0.1% de fenilhidrazina y se incubó a 80°C, durante 5 min. Después de enfriar con hielo, las muestras se centrifugaron a 10,000 g durante 2 min y 200 μ l del sobrenadante se mezclaron con 750 μ l de 18.5% de HCl y 50 μ l de 4% (peso/v) de K₃Fe(CN)₆. La mezcla se centrifugó a 10,000g durante 2 min y la absorbancia del sobrenadante se midió a 520 nm exactamente 8 min después de la adición de K₃Fe(CN)₆. Como control, se omitió el K₃Fe(CN)₆.

10 Ejemplo 7: Contenidos del metabolito

Se realizó un análisis GC-MS de los contenidos de carbohidratos y clorofila, como se describe por Fahnenstich et al. [33].

Ejemplo 8: Parámetros de fluorescencia de la clorofila

15 Las mediciones de la fluorescencia de la clorofila, se realizaron con un fluorómetro de clorofila de pulso de amplitud modulada PAM-2000 (Walz GmbH, Effeltrich, Germany). En el inicio de cada medida, una planta se adaptó a la oscuridad durante 10 min. La fluorescencia basal (F₀) se midió con luz roja débil modulada y la fluorescencia máxima (F_m) se indujo con una saturación de pulso de luz blanca (5000 μ mol m⁻² sec⁻¹; duración 0.8 s).

Ejemplo 9: Tasa de asimilación de CO₂ y análisis del isótopo de carbono

20 Las mediciones de la tasa fotosintética se realizaron en las plantas que se cultivaron bajo un régimen de 8h luz / 16h-oscuridad a densidades de flujo de foton activo fotosintéticamente (PPFD) de 100 y 300 μ mol quanta m⁻² s⁻¹ (intensidades de luz normal y elevada, respectivamente) a niveles de humedad relativa ambiente y a 24°C, siguiendo los procedimientos de Awada et al., (41). En resumen, la fotosíntesis neta máxima (A, μ mol m⁻² s⁻¹) a saturación de luz se realizó utilizando un sistema fotosintético portátil montado con una fuente de luz LED y una cámara de hoja específicamente construida para hojas de Arabidopsis (LI 6400-2B, LICOR Inc., Lincoln, NE, USA). Las mediciones de la relación del isótopo de carbono, se realizaron de acuerdo con los procedimientos de Madhavan et al. [42]. Para la determinación de las relaciones del isótopo de carbono, todas las rosetas se secaron a 60°C, durante 48 h y se molieron a un polvo fino. Una sub-muestra de este polvo de hoja (2-3 mg) se analizó para la relación del isótopo de carbono utilizando un analizador elemental (Heraeus, CHN-O Rapid) interconectado con un sistema de caja de captura automática y un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas Delta-S Finnigan. La relación isotópica de cada muestra se determinó mediante la comparación de un estándar de trabajo calibrado previamente con un valor conocido $\delta^{13}\text{C}$ relativo al PDB (estándar internacional Pee Dee Belemnite).

Ejemplo 10: Co-expresión de glicolato oxidasa, malato sintasa y catalasa en cloroplastos de *A. thaliana*

35 *A. thaliana* se transformó con un plásmido que codifica glicolato oxidasa (GO). Las líneas transgénicas resistentes a la canamicina con actividades GO mayores que el tipo salvaje (19 a 53%) y que contienen solo una inserción del transgen GO fueron sometidas a dos rondas más de selección para obtener las líneas transgénicas T3 no-segregantes. Una línea representativa de GO con una actividad de GO mayor del 30% en comparación con el tipo salvaje (Figura 2) se transformó con un plásmido que codifica malato sintasa (MS). Los transformantes de GO-MS resistentes a la higromicina se seleccionaron y analizaron por su actividad MS. Como todas las líneas transgénicas obtenidas mostraron similares actividades MS (9.8 \pm 2.2 a 17.9 \pm 0.5 mU/mg de proteína), una línea representativa (Figura 2) que lleva solo una inserción del transgen como se revela por Southern blot, se sometió a dos rondas más de selección para obtener una población T3 no-segregante. Esta línea de sobreexpresión homocigoto doble se transformó con un plásmido que codifica catalasa de *E. coli* (KatE) y once líneas independientes (líneas GMK) se seleccionaron mediante resistencia BASTA. Las líneas GMK que contienen actividades de catalasa mayores que el tipo salvaje fueron sometidas a dos rondas más de selección para obtener líneas T3 no-segregantes. Las líneas GMK3 y GMK9 se seleccionaron por otros análisis como representativos de las dos diferentes poblaciones obtenidas (ver a continuación; Figura 2). El análisis Southern blot indicó que la línea GMK3 contenía solo una inserción de transgen KatE mientras que GMK9 contenía tres inserciones (no se muestran). Las plantas GMK presentaron actividades GO y MS que se parecen a las líneas GO y GO-MS parentales (Figura 2), no indicaron pérdida de la expresión del transgen después de nueve generaciones. Para excluir cualquier alteración fenotípica causada por sola la expresión del transgen, MS y KatE también fueron expresadas en la base del tipo salvaje. En ambos casos, se obtuvieron líneas con actividades de MS o catalasa similares a aquellas encontradas en las líneas GMK (líneas representativas se incluyen en la Figura 2). Las mediciones enzimáticas realizadas con cloroplastos aislados de las hojas de plantas GMK3 de 5 semanas y las plantas del tipo salvaje demostraron que las enzimas del transgen se localizaron correctamente en los plástidos (no se muestran).

Ejemplo 11: Las plantas GMK transgénicas acumulan más biomasa

Las plantas GO homocigotas se caracterizaron por un diámetro de roseta reducido y el peso fresco y las hojas amarillentas durante las primeras siete semanas de crecimiento (Figura 3). Es interesante a partir de la séptima semana en, las diferencias en crecimiento en relación con el tipo salvaje se hicieron menos pronunciadas (no se muestran). Las determinaciones de los contenidos de glioxilato y peróxido de agua indicaron que ambos se aumentaron en las plantas GO (Figura S1). Las líneas GO-MS se asemejan a las GO, pero con un tamaño intermedio entre las plantas GO y las de tipo salvaje (Figura 3). Como las plantas GO-MS presentan el fenotipo GO cuando se exponen a condiciones de estrés (ver a continuación), el gen *KatE* se expresó en los plástidos de las plantas GO-MS para promover la desintoxicación del exceso de H_2O_2 producido por la actividad GO. Las líneas independientes que presentan las tres actividades transgénicas mostraron un aumento en biomasa estadísticamente significativo (por ejemplo GMK3) mientras que otras fueron más grandes que las plantas GO-MS parentales pero aún más pequeñas que el tipo salvaje (por ejemplo GMK9). Como se muestra en la tabla 1, las plantas GMK3 mostraron un aumento en el diámetro de la roseta acompañada por un número superior de hojas y un aumento en el peso seco de 35 a 40% en comparación con el tipo salvaje. Diferencias fenotípicas insignificantes se observaron cuando todas estas líneas se cultivaron bajo condiciones de no-fotorespiración (concentración de CO_2 de 2000 ppm (Figura 3 y Tabla 1). Obviamente, la inhibición de la reacción de oxigenasa de RubisCO conduce a una producción reducida del glicolato dentro del cloroplasto y, por consiguiente, también a niveles reducidos de glioxilato y H_2O_2 . Vale la pena mencionar que las líneas que sobreexpresan solo MS y *KatE* se comportan igual que las del tipo salvaje bajo todas las condiciones probadas (no se muestran). Nosotros evaluamos la capacidad de los transformantes para acumular los productos finales de fotosíntesis en el final del periodo de luz. La sacarosa y los monosacáridos glucosa y fructosa fueron determinados por GC-MS. A CO_2 ambiente y en la ausencia del estrés, las plantas GO-MS acumularon menos sacarosa, mientras que las líneas GMK mostraron niveles comparables a los del tipo salvaje. Mientras no se observaron diferencias en la acumulación de glucosa y fructosa en las plantas GO-MS en comparación con los del tipo salvaje, los niveles en líneas GMK fueron mayores que aquellos del tipo salvaje. Después de la exposición a seis horas de luz alta, todos estos metabolitos se disminuyeron en las plantas GO-MS, mientras que las líneas GMK acumularon estos fotoasimilados (Tabla 2). Así mismo, bajo condiciones de luz normal los transformantes GO-MS acumularon menos almidón transitorio (también se observó en la línea GO parental), mientras que las plantas GMK recuperaron la capacidad para acumular almidón como es el caso del tipo salvaje (Figura 4A). Niveles altos similares de la acumulación del almidón se observaron en todas las líneas cuando se cultivaron a concentración alta de CO_2 (Figura 4B). Curiosamente, cuando las líneas se cultivaron bajo condiciones normales y luego se transfirieron por siete días a condiciones altas de luz, las plantas GMK3 acumularon almidón como las del tipo salvaje, mientras que las líneas transgénicas GO, GO-MS y GMK9 han perdido esta capacidad (Figura 4D). En línea con estos resultados, las líneas GO, GO-MS y GMK9 mostraron lesiones intensas oxidativas y amarillentas en respuesta al tratamiento de luz alta (Figura 4D).

Ejemplo 12: Asimilación mejorada de CO_2 y fotorespiración reducida en plantas GMK

Para evaluar el desempeño fotosintético de las plantas transgénicas, se determinaron la fluorescencia de la clorofila, intercambio gaseoso y la discriminación contra ^{13}C (relación del isótopo de carbono, $\delta^{13}C$) en los diferentes genotipos. La tasa de transporte de electrones (ETR) de las plantas GO, se disminuyó en aproximadamente 25% en comparación con las del tipo salvaje, mientras que aquella de las plantas GO-MS y GMK9 fue similar a la del tipo salvaje (Tabla 3). En el caso de las plantas GMK3, la ETR se mejoró en un 26% en comparación con las de tipo salvaje (Tabla 3). La relación F_v/F_m indicó que la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II no se afectó en plantas GO-MS y GMK de 7 semanas cultivadas bajo condiciones normales, mientras que las plantas GO mostraron un efecto ligeramente negativo (Tabla 3). Vale la pena mencionar que las plantas GO más jóvenes siempre presentaron relaciones F_v/F_m mucho más bajas que las otras líneas, un hecho que se correlaciona bien con el fenotipo visual más pronunciado de estas plantas durante las primeras semanas de crecimiento (no se muestra). Por otro lado, cuando las plantas fueron expuestas a luz alta por seis horas, no se observaron diferencias en la relación F_v/F_m en las líneas GMK en comparación con el tipo salvaje, mientras que se observó una fotoinhibición fuerte en plantas GO y GO-MS (no se muestra). Las mediciones de la tasa fotosintética instantánea (A , $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$) se realizaron en el control y los transformantes que expresan las vías completas utilizando un medidor de fotosíntesis portátil LICOR. La Tabla 3 muestra que la tasa fotosintética de la línea GMK3 fue relativamente mayor que la del tipo salvaje, mientras que una de la línea GMK9 fue comparable con la del tipo salvaje. Para determinar si las plantas GMK3 son fotosintéticamente más eficientes que sus líneas parentales, se realizaron estudios de fraccionamiento de isótopos del carbono. Las mediciones de isótopos de carbono proporcionan una vista integrada de la función fotosintética desempeñada de las plantas a lo largo de toda su vida. Como se muestra en la Tabla 3, cuando las plantas se cultivaron bajo condiciones normales, el $\delta^{13}C$ fueron menos negativas para la línea GMK3 en comparación con el tipo salvaje (un resultado similar fue obtenido para la línea GMK1), indicando el aumento de la eficiencia de carboxilación y la eficiencia en el uso del agua en estas plantas. Como era de esperar, el $\delta^{13}C$ de todas las líneas no mostró ninguna tendencia diferencial cuando la plantas se cultivaron bajo condiciones de no-fotorespiración (2,000 ppm CO_2 , Tabla 3). Los niveles de glicina y serina se determinaron por GC-MS y la relación Gly/Ser se calculó como un indicador del flujo a través de la vía de fotorespiración. Las líneas GMK presentaron contenidos de glicina más bajos que las de tipo salvaje a concentraciones de CO_2 ambiente y bajo condiciones de luz normal o alta (Tabla 3). Las plantas GO-MS mostraron contenidos de glicina invariable, bajo condiciones de luz

normal pero mostraron niveles disminuidos bajo luz alta (Tabla 3). En el caso de la serina, las plantas GMK mostraron niveles inferiores que el tipo salvaje, bajo ambas intensidades de luz probadas, mientras que las plantas GO-MS mostraron niveles de tipo salvaje bajo luz normal y los niveles de serina aumentaron bajo luz alta (Tabla 3). La relación Gly/Ser de todas las líneas fue comparable bajo condiciones de luz normal pero mostraron relaciones significativamente más bajas determinadas para las líneas transgénicas después de seis horas a intensidades de luz altas en comparación con el tipo salvaje (Tabla 3). Después de la incubación de las plantas bajo esta condición de fotorespiración, la relación Gly/Ser del tipo salvaje se incrementó aproximadamente 150-veces en comparación con condiciones de luz normal debido a una alta acumulación de glicina (Tabla 3). Este aumento fue solo 33, 13- y 63-veces en el caso de GO-MS, GMK3 y GMK9, respectivamente (Tabla 3). Las plantas GMK3 presentaron la relación Gly/Ser más baja debido a una acumulación de glicina muy baja en estas plantas. No se observaron diferencias en la relación Gly/Ser entre las líneas cuando crecieron a concentraciones de CO₂ alto (Tabla 3).

Tabla 1. Parámetros de cultivo de 8 semanas líneas transgénicas y de tipo salvaje. Diámetro de Roseta (RD), número de hojas (NL) y peso seco (DW) de plantas cultivadas en días cortos a concentraciones de CO₂ ambiente (A, 380 ppm) o a concentraciones de CO₂ elevadas (E, 2,000 ppm). Los valores presentados son la media ± SE de dos réplicas de mezclas de al menos ocho plantas cada una. Los valores establecidos en el caso de negrilla indican diferencias significantes de los valores del tipo salvaje calculados mediante la prueba t de Student (P<0.05).

		tipo salvaje	GO-MS	GMK3	GMK9
RD (cm)	A	10.5 ± 0.2	9.4 ± 0.3	12.1 ± 0.2	9.4 ± 0.3
NL	A	33.3 ± 0.8	33.4 ± 0.5	39.5 ± 0.7	32.2 ± 0.9
	E	31.0 ± 0.4	32.0 ± 0.6	31.1 ± 0.6	32.1 ± 0.5
DW (mg)	A	106.9 ± 5.6	106.7 ± 6.0	146.6 ± 3.9	104.3 ± 8.3
	E	184.7 ± 16.1	185.4 ± 7.9	199.7 ± 8.4	199.6 ± 5.9

Tabla 2. Medición de los niveles de fotosíntesis mediante GC-MS de hojas de rosetas completas cosechadas después de 6 horas en la luz a diferentes intensidades de luz (L: luz baja (30 μmol m⁻² s⁻¹); H: luz alta (600 μmol m⁻² s⁻¹)). Los valores presentados son la media ± SE de dos réplicas de mezclas de al menos ocho plantas cada una. Los valores establecidos en el caso de negrilla indican diferencias significantes a los valores del tipo salvaje calculados mediante la prueba t de Student (P<0.05).

	tipo salvaje		GO-MS		GMK3		GMK9	
	L	H	L	H	L	H	L	H
Glucosa	8.43 ± 1.48	122.5 ± 4.6	11.49 ± 2.36	35.80 ± 0.50	12.13 ± 0.65	86.8 ± 8.6	10.87 ± 0.64	103.5 ± 2.5
Fructosa	1.65 ± 0.25	10.30 ± 0.51	1.63 ± 0.18	3.27 ± 0.05	3.11 ± 0.03	8.83 ± 0.64	2.28 ± 0.18	16.27 ± 0.90
Sacarosa	34.90 ± 1.90	338.7 ± 16.7	24.50 ± 2.30	160.9 ± 6.1	36.30 ± 2.70	173.5 ± 3.10	33.80 ± 0.70	236.2 ± 8.2
Glicina	0.67 ± 0.03	59.62 ± 7.20	0.68 ± 0.04	18.50 ± 0.90	0.51 ± 0.08	9.50 ± 1.90	0.35 ± 0.14	28.10 ± 5.10
Serina	16.80 ± 1.20	9.70 ± 1.40	18.80 ± 1.20	15.50 ± 0.40	6.70 ± 1.80	5.90 ± 0.50	9.00 ± 2.80	7.6 ± 1.50

Tabla 3. El desempeño fotosintético de las líneas transgénicas y del tipo salvaje. **A**, tasa de asimilación de CO₂ a 380 ppm de CO₂ **ETR**, Tasa de Transporte de Electrones determinada a 600 μmol m⁻² s⁻¹; **F_v/F_M**, eficiencia cuántica máxima del fotosistema II determinada después de seis horas a 600 μmol m⁻² s⁻¹; **Δδ¹³C**, Diferencias en la valores de δ¹³C de hoja total de los transformantes cuando se compara con el tipo salvaje; **Gly/Ser**, relación glicina con serina. Los valores presentados son la media ± SE de dos réplicas de mezclas de al menos ocho plantas cada una y los establecidos en el caso de negrilla indican las diferencias significantes con los valores de tipo salvaje calculados mediante la prueba de t de Student (P<0.05). Si no se indica de otra manera, las mediciones fueron realizadas con plantas cultivadas bajo intensidades de luz normal. n.d.: no determinado

	Tipo salvaje	GO	GO-MS	GMK3	GMK9
A (μmol m ⁻² s ⁻¹)	8.23 ± 0.21	n.d.	n.d.	9.16 ± 0.17	8.72 ± 0.18
ETR (μmol m ⁻² s ⁻¹)	70.5 ± 2,7	52.9 ± 9.8	74.6 ± 4.1	89.1 ± 3.4	75.8 ± 2.6
F _v /F _M	0.68 ± 0.02	0.54 ± 0.02	0.55 ± 0.01	0.69 ± 0.04	0.65 ± 0.05
Δδ ¹³ C					
a 380 ppm		n.d.	n.d.	0.87 ± 0.01	- 0.11 ± 0.07
a 2,000 ppm		n.d.	n.d.	- 0.04 ± 0.02	- 0.19 ± 0.08
Gly/Ser					
a 380 ppm (30 μmol m ⁻² s ⁻¹)	0.040 ± 0.001	0.05 ± 0.015	0.037 ± 0.001	0.050 ± 0.011	0.032 ± 0.009
a 380 ppm (600 μmol m ⁻² s ⁻¹)	6.238 ± 0.206	1.235 ± 0.049	1.189 ± 0.039	1.574 ± 0.235	3.807 ± 0.382
a 2,000 ppm	0.035 ± 0.001	0.032 ± 0.001	0.039 ± 0.003	0.043 ± 0.004	0.040 ± 0.004

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universität zu Köln, Zentrum für Molekularbiologische Medizin

5 <120> Medios para mejorar los rasgos agrobiológicos en una planta proporcionando una célula vegetal que comprende en sus cloroplastos actividades enzimáticas para convertir el glicolato en malato

<130> BPS65361EP

<160> 18

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

10 <211> 1104

<212> ADN

<213> A. thaliana

<400> 1

ES 2 386 583 T3

```

atggagatca ctaacgttac cgagtatgat gcaatcgcaa agcagaagct gcctaagatg      60
gtgtacgact actatgcatc tgggtcgaaa gaccaatgga ctcttcaaga gaacagaaac      120
gcttttgcaa ggatcctctt tcggcctcgg attctgattg atgtgagcaa gattgacatg      180
acaaccaccg tcttgggggt caagatctcg atgcccatca tggttgctcc aactgccatg      240
caaaagatgg ctcaccctga tggggaatat gctactgcta gagctgcatc tgcagctgga      300
actatcatga cactatcttc atgggctact tccagcgttg aagaagttgc gtctacaggg      360
ccagggatcc gattcttcca gctctatgta tacaagaaca ggaatgtggt tgagcagctc      420
gtgagaagag ctgagagggc tgggttcaaa gccattgctc tcaactgtaga cacccaagg      480
ctaggccgca gagagtctga tatcaagaac agattcactt tgcctcaaaa cctgacattg      540
aagaactttg aaggacttga cctcggaag atggacgagg ccaatgactc tggcttggt      600
tcatatgttg ctggtcaaat tgaccgtacc ttaagctgga aggatgtcca gtggctccag      660
acaatcacca agttgccat tcttgtcaaa ggtgttctta caggagagga tgcaaggata      720
gcgattcaag ctggtgcagc cggaatcatt gtatcaaacc atggagctcg ccagcttgac      780
tatgtcccag caaccatctc ggcccttgaa gaggttgta aagcgacaca aggacgaatt      840
cctgtcttct tggatggtgg tgttcgacgt ggcactgatg tcttcaaagc acttgcaatt      900
ggagcctccg ggatatttat tggaagacca gtggtattct cattggcagc tgaaggagag      960
gctggagtta gaaaggtgct tcaaagctc cgtgatgagt tcgagctgac catggcactg     1020
agtgggtgtc ggtccctaaa ggaaatctcc cgtaaccaca ttaccaccga atgggacact     1080
ccacgtcctt cagccagggt atag                                             1104

```

<210> 2

<211> 367

<212> PRT

5 <213> A. thaliana

<400> 2

```

Met Glu Ile Thr Asn Val Thr Glu Tyr Asp Ala Ile Ala Lys Gln Lys
 1           5           10          15

```

ES 2 386 583 T3

Leu Pro Lys Met Val Tyr Asp Tyr Tyr Ala Ser Gly Ala Glu Asp Gln
 20 25 30
 Trp Thr Leu Gln Glu Asn Arg Asn Ala Phe Ala Arg Ile Leu Phe Arg
 35 40 45
 Pro Arg Ile Leu Ile Asp Val Ser Lys Ile Asp Met Thr Thr Thr Val
 50 55 60
 Leu Gly Phe Lys Ile Ser Met Pro Ile Met Val Ala Pro Thr Ala Met
 65 70 75 80
 Gln Lys Met Ala His Pro Asp Gly Glu Tyr Ala Thr Ala Arg Ala Ala
 85 90 95
 Ser Ala Ala Gly Thr Ile Met Thr Leu Ser Ser Trp Ala Thr Ser Ser
 100 105 110
 Val Glu Glu Val Ala Ser Thr Gly Pro Gly Ile Arg Phe Phe Gln Leu
 115 120 125
 Tyr Val Tyr Lys Asn Arg Asn Val Val Glu Gln Leu Val Arg Arg Ala
 130 135 140
 Glu Arg Ala Gly Phe Lys Ala Ile Ala Leu Thr Val Asp Thr Pro Arg
 145 150 155 160
 Leu Gly Arg Arg Glu Ser Asp Ile Lys Asn Arg Phe Thr Leu Pro Pro
 165 170 175
 Asn Leu Thr Leu Lys Asn Phe Glu Gly Leu Asp Leu Gly Lys Met Asp
 180 185 190
 Glu Ala Asn Asp Ser Gly Leu Ala Ser Tyr Val Ala Gly Gln Ile Asp
 195 200 205
 Arg Thr Leu Ser Trp Lys Asp Val Gln Trp Leu Gln Thr Ile Thr Lys
 210 215 220
 Leu Pro Ile Leu Val Lys Gly Val Leu Thr Gly Glu Asp Ala Arg Ile
 225 230 235 240
 Ala Ile Gln Ala Gly Ala Ala Gly Ile Ile Val Ser Asn His Gly Ala
 245 250 255
 Arg Gln Leu Asp Tyr Val Pro Ala Thr Ile Ser Ala Leu Glu Glu Val
 260 265 270
 Val Lys Ala Thr Gln Gly Arg Ile Pro Val Phe Leu Asp Gly Gly Val
 275 280 285

ES 2 386 583 T3

Arg Arg Gly Thr Asp Val Phe Lys Ala Leu Ala Leu Gly Ala Ser Gly
290 295 300

Ile Phe Ile Gly Arg Pro Val Val Phe Ser Leu Ala Ala Glu Gly Glu
305 310 315 320

Ala Gly Val Arg Lys Val Leu Gln Met Leu Arg Asp Glu Phe Glu Leu
325 330 335

Thr Met Ala Leu Ser Gly Cys Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Arg Asn
340 345 350

His Ile Thr Thr Glu Trp Asp Thr Pro Arg Pro Ser Ala Arg Leu
355 360 365

<210> 3

<211> 1947

<212> ADN

5 <213> Cucurbita pepo

<400> 3

ES 2 386 583 T3

atgggatcgc tgggaatgta ttctgaatcg gcagtaagga agaaaagtag ccgaggctac	60
gatgttccag agggagtgga cattcgggga cgttatgatg aagaatttgc caggattctc	120
aacaaggaag ccttgctggt tgtggctgat ttacagagga ctttcagaaa ccacataagg	180
tattcgatgg aatgcccgag agaagccaaa aggaggtaca atgaaggggc ggtgccgggg	240
tttgatccgg cgaccaagta tataagggaa tctgagtgga catgtgcatc agtccccccg	300
gcagttgctg atcggagagt ggagatcacc ggacctgtgg agcgggaagat gatcatcaac	360
gcactcaatt ctggagctaa agttttcatg gcggactttg aagatgcaact atcaccaaac	420
tgggagaatt tgatgagggg gcaaattaat ctgaaggatg cagttgatgg gactataagc	480
ttccatgaca aagctagaaa caaggtttat aaactgaacg atcagacagc caagctcttt	540
gttcgccctc gaggttgcca ctctgctgag gctcatatct tcatcgacgg cgagcctgcc	600
accggctgtc ttgtggactt cgggctctac ttttttcaca accatgcca tttccggcgc	660
tctcaaggtc aaggttctgg ccctttcttt taccttccca aaatggagca ctccagggaa	720
gcaaaaatat ggaacagtgt atttgagaga gcagagaaga tggcagggat agagaggggc	780
agcatcaggg ccaactgtgct gattgaaaca cttccagcag tgtttcaaat ggatgaaata	840
ctctatgagc tgagggatca ttctgtggga ttgaactgtg gtagatggga ttacatattc	900
agctatgtca agaccttcca ggctcaccta gatcgcctgt taccgaccg agtccaagtc	960
ggtatggcac aacatttcat gaggagtat tctgatctcc ttatcaggac ttgtcacacg	1020
gtggtgtgcc acgtgggagg catggctgct caaattccaa ttagagacga cccgaaggca	1080
aatgagatgg cacttgagct agtgaggaag gacaaattga gagaggcaaa ggcaggacat	1140
gatggaacat gggcagcaca tccaggatta atcccagcat gtatggaagt cttaccaaac	1200
agcatgggaa atgccccca tcagatccga tctgcaagac gagacgatgc tgcaaaccta	1260
actgaagacg acctcttgca gcaaccgagg ggtgttcgta cattggaagg gctccggttg	1320
aacacccgag tcggaattca gtacctagca gcatggctaa ccgggacagg ctctgtgcct	1380
ctctacaacc ttatggaaga tgcagccaca gctgaaatca gcagggttca aaactggcaa	1440
tggctgaagt atggagtgga attggatgga gatgggcttg gagtgagagt gaacaaggaa	1500
ctgttcgcaa gagtgggtgga agaagaaatg gaaaggattg aaagagaagt ggggaaggag	1560
aaattcagga agggaatgta caaagaggct tgcaagatgt tcacaaggca atgcacagcg	1620
ccaaccttg atgattttct gaccttggat gcgtacaacc acatagtcac acatcatccc	1680
agggagctgt ccaggctctg aaaaccgcac caaattggcc ttctttcgac aggtaagagt	1740
tcttttgctt cccttctctt ctcttttctt ctcttccttg ttgctgagaa taacgtattt	1800
gtattgtaat ttaagactct gtttgtttgt ccgtttcttt ttttaagctg tttgtgtcgg	1860
ttatgtcaag aaattcagca attgcaagca aattggaact ctctccatga acctaaaaaa	1920
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa	1947

ES 2 386 583 T3

<210> 4

<211> 566

<212> PRT

<213> Cucurbita pepo

5 <400> 4

Met Gly Ser Leu Gly Met Tyr Ser Glu Ser Ala Val Arg Lys Lys Ser
 1 5 10 15
 Ser Arg Gly Tyr Asp Val Pro Glu Gly Val Asp Ile Arg Gly Arg Tyr
 20 25 30
 Asp Glu Glu Phe Ala Arg Ile Leu Asn Lys Glu Ala Leu Leu Phe Val
 35 40 45
 Ala Asp Leu Gln Arg Thr Phe Arg Asn His Ile Arg Tyr Ser Met Glu
 50 55 60
 Cys Arg Arg Glu Ala Lys Arg Arg Tyr Asn Glu Gly Ala Val Pro Gly
 65 70 75 80
 Phe Asp Pro Ala Thr Lys Tyr Ile Arg Glu Ser Glu Trp Thr Cys Ala
 85 90 95
 Ser Val Pro Pro Ala Val Ala Asp Arg Arg Val Glu Ile Thr Gly Pro
 100 105
 Val Glu Arg Lys Met Ile Ile Asn Ala Leu Asn Ser Gly Ala Lys Val
 115 120 125
 Phe Met Ala Asp Phe Glu Asp Ala Leu Ser Pro Asn Trp Glu Asn Leu
 130 135 140
 Met Arg Gly Gln Ile Asn Leu Lys Asp Ala Val Asp Gly Thr Ile Ser

ES 2 386 583 T3

Arg Thr Leu Glu Gly Leu Arg Leu Asn Thr Arg Val Gly Ile Gln Tyr
 435 440 445

Leu Ala Ala Trp Leu Thr Gly Thr Gly Ser Val Pro Leu Tyr Asn Leu
 450 455 460

Met Glu Asp Ala Ala Thr Ala Glu Ile Ser Arg Val Gln Asn Trp Gln
 465 470 475 480

Trp Leu Lys Tyr Gly Val Glu Leu Asp Gly Asp Gly Leu Gly Val Arg
 485 490 495

Val Asn Lys Glu Leu Phe Ala Arg Val Val Glu Glu Glu Met Glu Arg
 500 505 510

Ile Glu Arg Glu Val Gly Lys Glu Lys Phe Arg Lys Gly Met Tyr Lys
 515 520 525

Glu Ala Cys Lys Met Phe Thr Arg Gln Cys Thr Ala Pro Thr Leu Asp
 530 535 540

Asp Phe Leu Thr Leu Asp Ala Tyr Asn His Ile Val Ile His His Pro
 545 550 555 560

Arg Glu Leu Ser Arg Leu
 565

<210> 5

<211> 2262

<212> ADN

5 <213> Escherichia coli

<400> 5

ES 2 386 583 T3

atgtcgcaac	ataacgaaaa	gaaccacat	cagcaccagt	caccactaca	cgattccagc	60
gaagcgaaac	cggggatgga	ctcactggca	cctgaggacg	gctctcatcg	tccagcggct	120
gaaccaacac	cgccaggtgc	acaacctacc	gccccagggg	gcctgaaagc	ccctgatacg	180
cgtaacgaaa	aacttaattc	tctggaagac	gtacgcaaag	gcagtgaaaa	ttatgcgctg	240
accactaatc	agggcgtgcg	catcgccgac	gatcaaaact	cactgctgctg	cggtagccgt	300
ggtccaacgc	tgctggaaga	ttttattctg	cgcgagaaaa	tcacccactt	tgaccatgag	360
cgcattccgg	aacgtattgt	tcatgcacgc	ggatcagccg	ctcacggtta	tttccagcca	420
tataaaagct	taagcgatat	taccaaagcg	gatttcctct	cagatccgaa	caaaatcacc	480
ccagtatttg	tacgtttctc	taccgttcag	ggtggtgctg	gctctgctga	taccgtgctg	540
gatatccgtg	gctttgccac	caagttctat	accgaagagg	gtatTTTTga	cttcgttggc	600
aataacacgc	caatcttctt	tatccaggat	gcgataaat	tccccgattt	tgttcatgcg	660
gtaaaaccag	aaccgcactg	ggcaattcca	caagggcaaa	gtgcccacga	tactttctgg	720
gattatgttt	ctctgcaacc	tgaaactctg	cacaacgtga	tgtgggcat	gtcggatcgc	780

ES 2 386 583 T3

```

ggcatcccc gcagttaccg caccatggaa ggcttcggta ttcacacctt ccgcctgatt      840
aatgccgaag ggaaggcaac gtttgtacgt ttccactgga aaccactggc aggtaaagcc      900
tcaactcgttt gggatgaagc acaaaaactc accgggacgtg acccggactt ccaccgccgc      960
gagttgtggg aagccattga agcaggcgat tttccggaat acgaactggg cttccagttg     1020
attcctgaag aagatgaatt caagttcgac ttcgatcttc tcgatccaac caaacttatc     1080
ccggaagaac tggtgcccgt tcagcgtgtc ggcaaaaatgg tgctcaatcg caaccgggat     1140
aacttctttg ctgaaaacga acaggcggct ttccatcctg ggcatatcgt gccgggactg     1200
gacttcacca acgatccgct gttgcaggga cgtttgttct cctataccga tacacaaatc     1260
agtcgtcttg gtgggccgaa tttccatgag attccgatta accgtccgac ctgcccttac     1320
cataatttcc agcgtgacgg catgcatcgc atgggggatcg aactaaccg ggcgaattac     1380
gaaccgaact cgattaacga taactggccg cgcgaaacac cgccggggcc gaaacgcggc     1440
ggttttgaat cataccagga gcgcgtggaa ggcaataaag ttcgcgagcg cagcccatcg     1500
tttggcgaat attattccca tccgcgtctg ttctggctaa gtcagacgcc atttgagcag     1560
cgccatattg tcgatggttt cagttttgag ttaagcaaag tcgttcgtcc gtatattcgt     1620
gagcgcgttg ttgaccagct ggcgcatatt gatctcactc tggcccaggc ggtggcgaaa     1680
aatctcggta tcgaactgac tgacgaccag ctgaatatca cccacactcc ggacgtcaac     1740
ggtctgaaaa aggatccatc ctttaagtttg tacgccattc ctgacggtga tgtgaaaggt     1800
cgcgtggtag cgattttact taatgatgaa gtgagatcgg cagaccttct ggccattctc     1860
aaggcgctga aggccaaagg cgttcatgcc aaactgctct actcccgaat ggggtgaagtg     1920
actgcggatg acggtacggt gttgcctata gccgctacct ttgccggtgc accttcgctg     1980
acggtcgatg cggtcattgt cccttgccggc aatatcgcgg atatcgctga caacggcgat     2040
gccaactact acctgatgga agcctacaaa caccttaaac cgattgcgct ggcgggtgac     2100
gcgcgcaagt ttaaagcaac aatcaagatc gctgaccagg gtgaagaagg gattgtggaa     2160
gctgacagcg ctgacggtag ttttatggat gaactgctaa cgctgatggc agcacaccgc     2220
gtgtggtcac gcattcctaa gattgacaaa attcctgcct ga                          2262

```

<210> 6

<211> 753

<212> PRT

5 <213> Escherichia coli

<400> 6

ES 2 386 583 T3

Met Ser Gln His Asn Glu Lys Asn Pro His Gln His Gln Ser Pro Leu
1 5 10 15

His Asp Ser Ser Glu Ala Lys Pro Gly Met Asp Ser Leu Ala Pro Glu
20 25 30

Asp Gly Ser His Arg Pro Ala Ala Glu Pro Thr Pro Pro Gly Ala Gln
35 40 45

ES 2 386 583 T3

Pro Thr Ala Pro Gly Ser Leu Lys Ala Pro Asp Thr Arg Asn Glu Lys
 50 55 60
 Leu Asn Ser Leu Glu Asp Val Arg Lys Gly Ser Glu Asn Tyr Ala Leu
 65 70 75 80
 Thr Thr Asn Gln Gly Val Arg Ile Ala Asp Asp Gln Asn Ser Leu Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Gly Pro Thr Leu Leu Glu Asp Phe Ile Leu Arg Glu
 100 105 110
 Lys Ile Thr His Phe Asp His Glu Arg Ile Pro Glu Arg Ile Val His
 115 120 125
 Ala Arg Gly Ser Ala Ala His Gly Tyr Phe Gln Pro Tyr Lys Ser Leu
 130 135 140
 Ser Asp Ile Thr Lys Ala Asp Phe Leu Ser Asp Pro Asn Lys Ile Thr
 145 150 155 160
 Pro Val Phe Val Arg Phe Ser Thr Val Gln Gly Gly Ala Gly Ser Ala
 165 170 175
 Asp Thr Val Arg Asp Ile Arg Gly Phe Ala Thr Lys Phe Tyr Thr Glu
 180 185 190
 Glu Gly Ile Phe Asp Leu Val Gly Asn Asn Thr Pro Ile Phe Phe Ile
 195 200 205
 Gln Asp Ala His Lys Phe Pro Asp Phe Val His Ala Val Lys Pro Glu
 210 215 220
 Pro His Trp Ala Ile Pro Gln Gly Gln Ser Ala His Asp Thr Phe Trp
 225 230 235 240
 Asp Tyr Val Ser Leu Gln Pro Glu Thr Leu His Asn Val Met Trp Ala
 245 250 255
 Met Ser Asp Arg Gly Ile Pro Arg Ser Tyr Arg Thr Met Glu Gly Phe
 260 265 270
 Gly Ile His Thr Phe Arg Leu Ile Asn Ala Glu Gly Lys Ala Thr Phe
 275 280 285
 Val Arg Phe His Trp Lys Pro Leu Ala Gly Lys Ala Ser Leu Val Trp
 290 295 300
 Asp Glu Ala Gln Lys Leu Thr Gly Arg Asp Pro Asp Phe His Arg Arg
 305 310 315 320

ES 2 386 583 T3

Glu Leu Trp Glu Ala Ile Glu Ala Gly Asp Phe Pro Glu Tyr Glu Leu
 325 330 335
 Gly Phe Gln Leu Ile Pro Glu Glu Asp Glu Phe Lys Phe Asp Phe Asp
 340 345 350
 Leu Leu Asp Pro Thr Lys Leu Ile Pro Glu Glu Leu Val Pro Val Gln
 355 360 365
 Arg Val Gly Lys Met Val Leu Asn Arg Asn Pro Asp Asn Phe Phe Ala
 370 375 380
 Glu Asn Glu Gln Ala Ala Phe His Pro Gly His Ile Val Pro Gly Leu
 385 390 395
 Asp Phe Thr Asn Asp Pro Leu Leu Gln Gly Arg Leu Phe Ser Tyr Thr
 405 410 415
 Asp Thr Gln Ile Ser Arg Leu Gly Gly Pro Asn Phe His Glu Ile Pro
 420 425
 Ile Asn Arg Pro Thr Cys Pro Tyr His Asn Phe Gln Arg Asp Gly Met
 435 440 445
 His Arg Met Gly Ile Asp Thr Asn Pro Ala Asn Tyr Glu Pro Asn Ser
 450 455 460
 Ile Asn Asp Asn Trp Pro Arg Glu Thr Pro Pro Gly Pro Lys Arg Gly
 465 470 475 480
 Gly Phe Glu Ser Tyr Gln Glu Arg Val Glu Gly Asn Lys Val Arg Glu
 485 490 495
 Arg Ser Pro Ser Phe Gly Glu Tyr Tyr Ser His Pro Arg Leu Phe Trp
 500 505 510
 Leu Ser Gln Thr Pro Phe Glu Gln Arg His Ile Val Asp Gly Phe Ser
 515 520 525
 Phe Glu Leu Ser Lys Val Val Arg Pro Tyr Ile Arg Glu Arg Val Val
 530 535 540
 Asp Gln Leu Ala His Ile Asp Leu Thr Leu Ala Gln Ala Val Ala Lys
 545 550 555 560
 Asn Leu Gly Ile Glu Leu Thr Asp Asp Gln Leu Asn Ile Thr Pro Pro
 565 570 575
 Pro Asp Val Asn Gly Leu Lys Lys Asp Pro Ser Leu Ser Leu Tyr Ala
 580 585 590

Ile Pro Asp Gly Asp val Lys Gly Arg Val Val Ala Ile Leu Leu Asn
 595 600 605

Asp Glu Val Arg Ser Ala Asp Leu Leu Ala Ile Leu Lys Ala Leu Lys
 610 615 620

Ala Lys Gly Val His Ala Lys Leu Leu Tyr Ser Arg Met Gly Glu Val
 625 630 635 640

Thr Ala Asp Asp Gly Thr Val Leu Pro Ile Ala Ala Thr Phe Ala Gly
 645 650 655

Ala Pro Ser Leu Thr Val Asp Ala Val Ile Val Pro Cys Gly Asn Ile
 660 665 670

Ala Asp Ile Ala Asp Asn Gly Asp Ala Asn Tyr Tyr Leu Met Glu Ala
 675 680 685

Tyr Lys His Leu Lys Pro Ile Ala Leu Ala Gly Asp Ala Arg Lys Phe
 690 695 700

Lys Ala Thr Ile Lys Ile Ala Asp Gln Gly Glu Glu Gly Ile Val Glu
 705 710 715 720

Ala Asp Ser Ala Asp Gly Ser Phe Met Asp Glu Leu Leu Thr Leu Met
 725 730 735

Ala Ala His Arg Val Trp Ser Arg Ile Pro Lys Ile Asp Lys Ile Pro
 740 745 750

Ala

<210> 7

<211> 1704

<212> ADN

5 <213> A. thalia

<400> 7

ES 2 386 583 T3

atggcctttcg	cttcaaaatt	cgctcgttct	aaaactattc	tctcttttct	ccggccttgt	60
cgtcagctcc	actcgacgcc	caagtcaacc	ggtgacgtga	ccgtactttc	tccgggtgaag	120
ggacgccgga	gacttccaac	ttgctggctg	agctctctgt	tcccattggc	gatagctgcc	180
tccgccactt	ctttcgctta	cctgaatctg	tcgaatcctt	ctatcagtga	atcatcatcg	240
gctttggatt	caagagatat	aactgttggt	ggaaaagata	gactgaagc	tgttgttaaa	300
ggagaataca	aacaagtccc	taaggagcct	atcttcaat	tgaaaactat	cctcgaggat	360
aacttgacaa	ctgactacga	tgagaggtac	ttccatggga	agccccagaa	cagttttcac	420
aaggcagtca	acattcctga	tgctggtggt	ttccctaggt	ccgaagaaga	agtctccaag	480
attcttaaat	cctgcaatga	atataagggt	cctattgtac	catatggtgg	ggcaacatcg	540
atcgaggggc	atacccttgc	tccaaaagga	ggtgtgtgca	ttgacatgtc	attaatgaag	600
agggtgaaag	cattacatgt	ggaggatatg	gatgttattg	ttgagcctgg	aattggttgg	660
ctggagctta	atgaatattt	ggaagagtat	ggtctattct	ttcctcttga	tccaggacct	720
ggtgcctcca	taggaggcat	gtgtgctacg	cgttgctctg	gctctttagc	tgtaaggat	780
ggaactatgc	gtgacaatgt	tataagcctc	aagggtggtc	ttcctaattg	agatgttgtg	840
aagacagctt	cacgtgccag	aaagagtgct	gctggatacg	atctgactcg	cttgataatt	900
gggagtgagg	gtacttttagg	agtcattact	gagattactc	tccgacttca	gaaaatccca	960
cagcattcag	tggtggcagt	ttgcaatttc	cctacagtta	aggatgctgc	agacgtggcc	1020
attgccacta	tgatgtctgg	aatacaggtg	tcaagagtgg	aactccttga	cgaggttcaa	1080
atcagagcta	ttaatattggc	aaacgggaaa	aatttgactg	aagctccaac	tctgatgttc	1140
gagtttatag	gaacagaggc	atatacacgt	gagcagacgc	aaattgttca	gcaaattgct	1200
tccaaacaca	atggatcaga	ctttatgttc	gcagaagaac	ctgaagcaaa	aaaagaactc	1260
tggaagataa	gaaaagaggc	gctgtgggct	tgctatgcta	tggcgccagg	tcatgaagca	1320
atgattacag	atgtctgtgt	ccctttatct	caccttgacg	aactcatatc	aagatccaaa	1380
aaagagcttg	atgcatcatc	gttggtgtgt	accgttattg	ctcatgccgg	agatggaaac	1440
tttcacacat	gtattatggt	tgatccaagc	agtgaagagc	agagaagaga	agcagaaaga	1500
ctgaaccact	ttatggttca	cagtgcactg	tccatggatg	gaacatgtac	tggaagaacac	1560
ggtgttgaa	caggaaaaat	gaagtatctg	gagaaggaac	tggaataga	agcactgcaa	1620
actatgaaga	gaatcaagaa	aacgttggac	ccaaacgata	tcatgaacc	gggaaagtta	1680
attcctcctc	atgtatgttt	ctaa				1704

<210> 8

<211> 567

5 <212> PRT

ES 2 386 583 T3

<213> A. thalia

<400> 8

Met Ala Phe Ala Ser Lys Phe Ala Arg Ser Lys Thr Ile Leu Ser Phe
 1 5 10 15
 Leu Arg Pro Cys Arg Gln Leu His Ser Thr Pro Lys Ser Thr Gly Asp
 20 25 30
 Val Thr Val Leu Ser Pro Val Lys Gly Arg Arg Arg Leu Pro Thr Cys
 35 40 45
 Trp Ser Ser Ser Leu Phe Pro Leu Ala Ile Ala Ala Ser Ala Thr Ser
 50 55 60
 Phe Ala Tyr Leu Asn Leu Ser Asn Pro Ser Ile Ser Glu Ser Ser Ser
 65 70 75 80
 Ala Leu Asp Ser Arg Asp Ile Thr Val Gly Gly Lys Asp Ser Thr Glu
 85 90 95

ES 2 386 583 T3

Ala Val Val Lys Gly Glu Tyr Lys Gln Val Pro Lys Glu Leu Ile Ser
100 105 110

Gln Leu Lys Thr Ile Leu Glu Asp Asn Leu Thr Thr Asp Tyr Asp Glu
115 120 125

Arg Tyr Phe His Gly Lys Pro Gln Asn Ser Phe His Lys Ala Val Asn
130 135 140

Ile Pro Asp Val Val Val Phe Pro Arg Ser Glu Glu Glu Val Ser Lys
145 150 155 160

Ile Leu Lys Ser Cys Asn Glu Tyr Lys Val Pro Ile Val Pro Tyr Gly
165 170 175

Gly Ala Thr Ser Ile Glu Gly His Thr Leu Ala Pro Lys Gly Gly Val
180 185 190

Cys Ile Asp Met Ser Leu Met Lys Arg Val Lys Ala Leu His Val Glu
195 200 205

Asp Met Asp Val Ile Val Glu Pro Gly Ile Gly Trp Leu Glu Leu Asn
210 215 220

Glu Tyr Leu Glu Glu Tyr Gly Leu Phe Phe Pro Leu Asp Pro Gly Pro
225 230 235 240

Gly Ala Ser Ile Gly Gly Met Cys Ala Thr Arg Cys Ser Gly Ser Leu
245 250 255

Ala Val Arg Tyr Gly Thr Met Arg Asp Asn Val Ile Ser Leu Lys Val
260 265 270

Val Leu Pro Asn Gly Asp Val Val Lys Thr Ala Ser Arg Ala Arg Lys
275 280 285

Ser Ala Ala Gly Tyr Asp Leu Thr Arg Leu Ile Ile Gly Ser Glu Gly
290 295 300

Thr Leu Gly Val Ile Thr Glu Ile Thr Leu Arg Leu Gln Lys Ile Pro
305 310 315 320

Gln His Ser Val Val Ala Val Cys Asn Phe Pro Thr Val Lys Asp Ala
325 330 335

Ala Asp Val Ala Ile Ala Thr Met Met Ser Gly Ile Gln Val Ser Arg
340 345 350

Val Glu Leu Leu Asp Glu Val Gln Ile Arg Ala Ile Asn Met Ala Asn
355 360 365

ES 2 386 583 T3

Gly Lys Asn Leu Thr Glu Ala Pro Thr Leu Met Phe Glu Phe Ile Gly
 370 375 380

Thr Glu Ala Tyr Thr Arg Glu Gln Thr Gln Ile Val Gln Gln Ile Ala
 385 390 395 400

Ser Lys His Asn Gly Ser Asp Phe Met Phe Ala Glu Glu Pro Glu Ala
 405 410 415

Lys Lys Glu Leu Trp Lys Ile Arg Lys Glu Ala Leu Trp Ala Cys Tyr
 420 425 430

Ala Met Ala Pro Gly His Glu Ala Met Ile Thr Asp Val Cys Val Pro
 435 440 445

Leu Ser His Leu Ala Glu Leu Ile Ser Arg Ser Lys Lys Glu Leu Asp
 450 455 460

Ala Ser Ser Leu Leu Cys Thr Val Ile Ala His Ala Gly Asp Gly Asn
 465 470 475 480

Phe His Thr Cys Ile Met Phe Asp Pro Ser Ser Glu Glu Gln Arg Arg
 485 490 495

Glu Ala Glu Arg Leu Asn His Phe Met Val His Ser Ala Leu Ser Met
 500 505 510

Asp Gly Thr Cys Thr Gly Glu His Gly Val Gly Thr Gly Lys Met Lys
 515 520 525

Tyr Leu Glu Lys Glu Leu Gly Ile Glu Ala Leu Gln Thr Met Lys Arg
 530 535 540

Ile Lys Lys Thr Leu Asp Pro Asn Asp Ile Met Asn Pro Gly Lys Leu
 545 550 555 560

Ile Pro Pro His Val Cys Phe
 565

<210> 9

<211> 30

<212> ADN

5 <213> artificial

<220>

ES 2 386 583 T3

<223> cebador GO fow
<400> 9
tacaattgga gatcactaac gttaccgagt 30
<210> 10
5 <211> 33
<212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> cebador GO rev1
10 <400> 10
tgggacactc cacgtcctta gtctagacta gta 33
<210> 11
<211> 34
<212> ADN
15 <213> artificial
<220>
<223> cebador MS fow
<400> 11
acaccggtcg ctgggaatgt attctgaatc ggca 34
20 <210> 12
<211> 36
<212> ADN
<213> artificial
<220>
25 <223> cebador MS rev1
<400> 12
cacataggca tacatcatcc caggtgagtc gacgtt 36
<210> 13
<211> 31
30 <212> ADN
<213> artificial

<220>
 <223> cebador KatE fow1
 <400> 13
 acaccggtcg caacataacg aaaagaaccc a 31

5 <210> 14
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>

10 <223> cebador KatE rev1
 <400> 14
 acgtcgactc aggcaggaat tttgtcaatc t 31
 <210> 15
 <211> 32

15 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador PGM fow
 <400> 15

20 taggtacca atcaacaatg acgtcgacct ac 32
 <210> 16
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> artificial

25 <220>
 <223> cebador PGM rev
 <400> 16
 gagattaaat cgttgccgac gaagcaattg ta 32
 <210> 17

30 <211> 30
 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> cebador rbcS3C fow

<400> 17

5 acgagctcat ccagaattgg cgttgatta 30

<210> 18

<211> 33

<212> ADN

<213> artificial

10 <220>

<223> cebador rbcS3C rev

<400> 18

agcaacggtg gaagagtcag ttgcaaccgg tat 33

15 Las referencias siempre que no se mencione explícitamente en la descripción, se encuentran en la siguiente lista de referencias:

REFERENCIAS

1. Tolbert NE (1997) The C2 oxidative photosynthetic carbon cycle. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 1-25.
- 20 2. Douce R and Neuburger M (1999) Biochemical dissection of photorespiration. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 214-222.
3. Wingler A, Lea PJ, Quick WP, Leegood RC (2000) Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Phil. Trans. R. Soc. Lond B* 255: 1517- 1529.
4. Keys AJ, Bird IF, Cornelius MJ, Lea PJ, Wallsgrave RM, Mifflin BJ (1978) Photorespiratory nitrogen cycle. *Nature* 275: 741-743.
- 25 5. Leegood RC, Lea PJ, Adcock MD, Häusler RE (1995) The regulation and control of photorespiration. *J. Exp. Bot.* 46: 1397-1414.
6. Parry M, Andralojc PC, Mitchell RAC, Madgwick P, Keys A (2003) Manipulation of RubisCO: the amount, activity, function and regulation. *J. Exp. Bot.* 54: 132-1333.
- 30 7. Somerville CR, Ogren WL (1980) Photorespiration mutants of *Arabidopsis thaliana* deficient in serine-glycolate aminotransferase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2684-2687.
8. Somerville CR, Ogren WL (1980) Inhibition of photosynthesis in *Arabidopsis* mutants lacking leaf glutamate synthase activity. *Nature* 286: 257-259.
9. Somerville CR, Ogren WL (1981) Photorespiration-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* lacking mitochondrial serine transhydroxymethylase activity. *Plant Physiol.* 67: 666-671.
- 35 10. Somerville CR, Ogren WL (1982) Mutants of the cruciferous plant *Arabidopsis thaliana* lacking glycine decarboxylase activity. *Biochem. J.* 202: 373-380. 25

11. Sommerville S, Somerville CR (1985) Mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in chloroplast dicarboxylate transport is missing an envelope protein. *Plant Sci. Lett.* 37: 217-220.
12. Bauwe H. and Kolukisaoglu U. (2003) Genetic manipulation of glycine decarboxylation. *J Exp. Bot.* 54: 1523-1535.
- 5 13. Bold R, Edner C, Kolukisaoglu U, Hagemann M, Weckwerth W, et al. (2005) DGlycerate 3-kinase the last unknown enzyme in the photorespiratory cycle in *Arabidopsis*, belongs to a novel kinase family. *Plant Cell* 17: 2413-2420.
14. Bagder MR, Price GD (2003) CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *J. Exp. Bot.* 54: 609-622.
- 10 15. Giordano M, Beardall J, Raven JA (2005) CO₂ concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation and evolution. *Ann. Rev. Plant Biol.* 56, 99- 131.
16. Hatch MD (1987) C₄ photosynthesis: A unique bend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochim. Biophys. Acta* 895: 8-16.
- 15 17. Sage RF, Pearcy RW, Seemann JR (1987) The nitrogen use efficiency of C₃ and C₄ plants. *Plant Physiol.* 85: 355-359.
18. Ishimaru K, Ichikawa H, Matsuoka M, Oshugi R (1997) Analysis of a C₄ pyruvate, orthophosphate dikinase expressed in C₃ transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Sci.* 129: 57-64.
19. Ishimaru K, Ohkawa Y, Ishige T, Tobias DJ, Oshugi R (1998) Elevated pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK) activity alters carbon metabolism in C₃-transgenic potatoes with a C₄ maize PPDK gene. *Physiol. Plant.* 103: 340-346.
- 20 20. Matsuoka M, Furbank RT, Fukayama H, Miyao M (2001) Molecular engineering of C₄ photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 297-314.
21. Häusler RE, Rademacher T, Li J, Lipka V, Fischer KL, et al. (2001) Single and double overexpression of C₄-cycle genes had differential effects on the pattern of endogenous enzymes, attenuation of photorespiration and on contents of UV protectants in transgenic potato and tobacco plants. *J. Exp. Bot.* 52: 1785-1803.
- 25 22. Kebeish R, Niessen N, Thiruveedhi K, Bari R, Hirsch J-H, et al. (2007) Chloroplastic photorespiratory bypass increases photosynthesis and biomass production in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotech.* 25: 593-599.
23. Keys AJ (1999) Biochemistry of photorespiration and the consequences for plant performance. In *Plant Carbohydrate Biochemistry* (eds. JA Bryant, MM Burrell, NJ Kruger), pp. 147-162. Oxford: BIOS Scientific Publishers.
- 30 24. Noctor G, Arisi A-CM, Jouanin L, Foyer CH (1999) Photorespiratory glycine enhances glutathione accumulation in both the chloroplastic and cytosolic compartments. *J. Exp. Bot.* 50: 1157-1167.
25. Heber U, Bligny R, Streb P, Douce R (1996) Photorespiration is essential for protection of the photosynthetic apparatus of C₃-plants against photoinactivation under sunlight. *Bot. Acta.* 109: 307-315.
26. Kozaki A, Takeba G (1996) Photorespiration protects C₃-plants from photooxidation. *Nature* 384, 557-560.
- 35 27. Farquhar GD, Ehleringer JR, Hubick KT (1989) Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 40: 503-537.
28. Gillon JS, Griffiths H (1997) The influence of (photo)respiration on carbon isotope discrimination in plants. *Plant Cell Environ.* 20:1217-1230.
29. Igamberdiev AU, Mikkelsen T, Ambus P, Bauwe H, Lea P, et al. (2004) Photorespiration contributes to stomatal regulation and carbon isotope fractionation: a study with barley, potato and *Arabidopsis* plant deficient in glycine decarboxylase. *Photos Res.* 81: 139-152.
- 40 30. von Cammerer S (2003) C₄ photosynthesis in a single cell is theoretically inefficient but may ameliorate internal CO₂ diffusion limitations of C₃ leaves. *Plant Cell Environm.* 26: 1191-1197.

31. Horng J-T, Behari R, Burke C-A, Baker A (1995) Investigation of the Energy Requirement and Targeting Signal for the Import of Glycolate Oxidase into Glyoxysomes. *Eur. J. Biochem.* 230: 157-163.
32. Mori H, Takeda-Yoshikawa Y, Hara-Nishimura I, Nishimura M (1991) Pumpkin malate synthase Cloning and sequencing of the cDNA and Northern blot analysis. *Eur. J. Biochem.* 197: 331-336.
- 5 33. Fahnenstich H, Saigo M, Niessen M, Zanor MI, et al. (2007) Alteration of organic acid metabolism in *Arabidopsis thaliana* overexpressing the maize C4-NADP-malic enzyme causes accelerated senescence during extended darkness. *Plant Physiol.* 145: 640-652.
34. Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, Bean S, Mullineaux PM (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 42: 819-832.
- 10 35. Bechtold, N, Ellis J and Pelletier, G (1993) In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C R Acad Sci Paris, Life Sci.* 316: 1194-1199.
36. Yamaguchi K and Nishimura M (2000) reduction to below threshold levels of glycolate oxidase activities in transgenic tobacco enhances photoinhibition during irradiation. *Plant Cell Physiol.* 41: 1397-1406.
- 15 37. Smith CV, Huang C-C, Miczak A, Russell DG, Sacchettini JC, et al. (2003) Biochemical and Structural Studies of Malate Synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 278: 1735-1743.
38. Havar E, McHale N (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol.* 84: 450-455.
39. Okuda T, Matsuda Y, Yamanaka A, Sagisaka S (1991) Abrupt increase in the level of hydrogen peroxide in leaves of winter wheat is caused by cold treatment. *Plant Physiol.* 97: 1265-1267.
- 20 40. Häusler RE, Bailey KJ, Lea PJ, Leegood RC (1996) Control of photosynthesis in barley mutants with reduced activities of glutamine synthetase and glutamate synthase. *Planta* 200: 388-396.
41. Awada T, Dunigan DD, Dickman MB (2004) Animal anti-apoptotic genes enhance recovery from drought stress in tobacco. *Int. J. Agri & Biol.* 6: 943-949.
- 25 42. Madhavan S, Treichel I, O'Leary MH (1991) Effects of relative humidity on carbon isotope fractionation in plants. *Bot. Acta* 104: 292-294.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula vegetal que comprende en sus cloroplastos actividades enzimáticas para convertir el glicolato en malato, en donde dicha célula vegetal comprende en sus cloroplastos un primer polipéptido que tiene actividad de glicolato oxidasa, un segundo polipéptido que tiene actividad de malato sintasa y un tercer polipéptido que tiene actividad de catalasa.
2. La célula vegetal de la reivindicación 1, en donde dicho primer polipéptido se codifica por un primer polinucleótido que comprende un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste de:
- a. un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótido como se muestra en SEQ ID No: 1;
- 10 b. un ácido nucleico que codifica un polipéptido, que tiene una secuencia de aminoácido como se muestra en SEQ ID No: 2;
- c. un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótido, que es al menos 50% idéntica a la secuencia de nucleótido mostrada en SEQ ID No: 1, en donde dicho ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene actividad de glicolato oxidasa; y
- 15 d. un ácido nucleico que codifica un polipéptido, que tiene una secuencia de aminoácido que es al menos 50% idéntica a la secuencia de aminoácido mostrada en SEQ ID No: 2, en donde dicho polipéptido tiene actividad de glicolato oxidasa.
3. La célula vegetal de la reivindicación 1 o 2, en donde dicho segundo polipéptido se codifica por un segundo polinucleótido que comprende un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste de:
- a. un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótido como se muestra en SEQ ID No: 3;
- 20 b. un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido como se muestra en SEQ ID No: 4;
- c. un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótido, que es al menos 40% idéntica a la secuencia de nucleótido mostrada en SEQ ID No: 3, en donde dicho ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene actividad de malato sintasa; y
- 25 d. un ácido nucleico que codifica un polipéptido, que tiene una secuencia de aminoácido que es al menos 40% idéntica a la secuencia de aminoácido mostrada en SEQ ID No: 4, en donde dicho polipéptido tiene actividad de malato sintasa.
4. La célula vegetal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el tercer polipéptido se codifica por un tercer polinucleótido que comprende un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste de:
- 30 a. un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótido como se muestra en SEQ ID No: 5;
- b. un ácido nucleico que codifica un polipéptido, que tiene una secuencia de aminoácido como se muestra en SEQ ID No: 6;
- c. un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótido, que es al menos 70% idéntica a la secuencia de nucleótido mostrada en SEQ ID No: 5, en donde dicho ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene actividad de catalasa; y
- 35 d. un ácido nucleico que codifica un polipéptido, que tiene una secuencia de aminoácido que es al menos 50% idéntica a la secuencia de aminoácido mostrada en SEQ ID No: 6, en donde dicho polipéptido tiene actividad de catalasa.
5. La célula vegetal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho primer polipéptido se expresa a partir de un polinucleótido heterólogo.
- 40 6. La célula vegetal de la reivindicación 5, en donde dicho polinucleótido heterólogo comprende un ácido nucleico según se define en la reivindicación 2.
7. La célula vegetal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho segundo polipéptido se expresa a partir de un polinucleótido heterólogo.

8. La célula vegetal de la reivindicación 7, en donde dicho polinucleótido heterólogo comprende un ácido nucleico según se define en la reivindicación 3.
9. La célula vegetal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho tercer polipéptido se expresa a partir de un polinucleótido heterólogo.
- 5 10. La célula vegetal de la reivindicación 9, en donde dicho polinucleótido heterólogo comprende un ácido nucleico según se define en la reivindicación 4.
11. La célula vegetal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicha célula vegetal además comprende una enzima NADP-málica y una piruvato deshidrogenasa.
- 10 12. La célula vegetal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicha célula vegetal tiene una mayor eficiencia de asimilación de CO₂ en comparación con una célula vegetal que carece de actividades enzimáticas para convertir el glicolato en malato.
13. La célula vegetal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde dicha célula vegetal es una célula de una planta C₃.
14. Una planta que comprende la célula vegetal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
- 15 15. La planta de la reivindicación 14, en donde dicha planta tiene una mayor asimilación de CO₂ en comparación con una planta que carece de una célula vegetal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
16. La planta de la reivindicación 14 o 15, en donde dicha planta tiene una fotorespiración atenuada en comparación con una planta que carece de una célula vegetal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
- 20 17. La planta de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en donde dicha planta tiene una mayor eficiencia del uso del agua en comparación con una planta que carece de una célula vegetal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
18. La planta de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en donde dicha planta produce un número mayor de hojas en comparación con una planta que carece de una célula vegetal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
- 25 19. La planta de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, en donde dicha planta tiene un rendimiento mayor en comparación con una planta que carece de una célula vegetal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
20. Una semilla que se obtiene de una planta de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, en donde dicha semilla es capaz de generar una planta de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19.
- 30 21. Un método para producir una planta transgénica o una célula vegetal que tiene una mayor eficiencia en el uso del agua en comparación con una planta no-transgénica o célula vegetal correspondiente, dicho método comprende la introducción en los cloroplastos de la planta transgénica o célula vegetal de un primer polipéptido, un segundo polipéptido y un tercer polipéptido, según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicha planta transgénica o célula vegetal se produce por transformación.
- 35 22. Un método para producir una planta transgénica o célula vegetal que tiene un rendimiento mayor en comparación con una planta no-transgénica o célula vegetal correspondiente, dicho método comprende la introducción en los cloroplastos de la planta transgénica o célula vegetal de un primer polipéptido, un segundo polipéptido y un tercer polipéptido, según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicha planta transgénica o célula vegetal se produce por transformación.
23. El método de las reivindicaciones 21 o 22, en donde dicho método comprende las etapas de:
- 40 a. la introducción de al menos un polinucleótido heterólogo que codifica los citados polipéptidos en la planta o la célula vegetal; y
- b. la expresión de dichos polipéptidos a partir de al menos un polinucleótido citado.
24. Un polinucleótido que comprende en combinación un ácido nucleico según se define en la reivindicación 2, un ácido nucleico según se define en la reivindicación 3 y un ácido nucleico según se define en la reivindicación 4.
25. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 24.

26. El vector de la reivindicación 25, en donde dicho vector es un vector de expresión.

27. Una composición que comprende un primer polinucleótido según se define en la reivindicación 2, un segundo polinucleótido según se define en la reivindicación 3 y un tercer polinucleótido según se define en la reivindicación 4.

5 28. Uso del polinucleótido de la reivindicación 24, el vector de la reivindicación 25 o la composición de la reivindicación 27, para conferir mayor eficiencia en el uso del agua a una planta o célula vegetal.

29. Uso del polinucleótido de la reivindicación 24, el vector de la reivindicación 25 o la composición de la reivindicación 27 para conferir un rendimiento mayor a una planta o célula vegetal.

Figura 1.

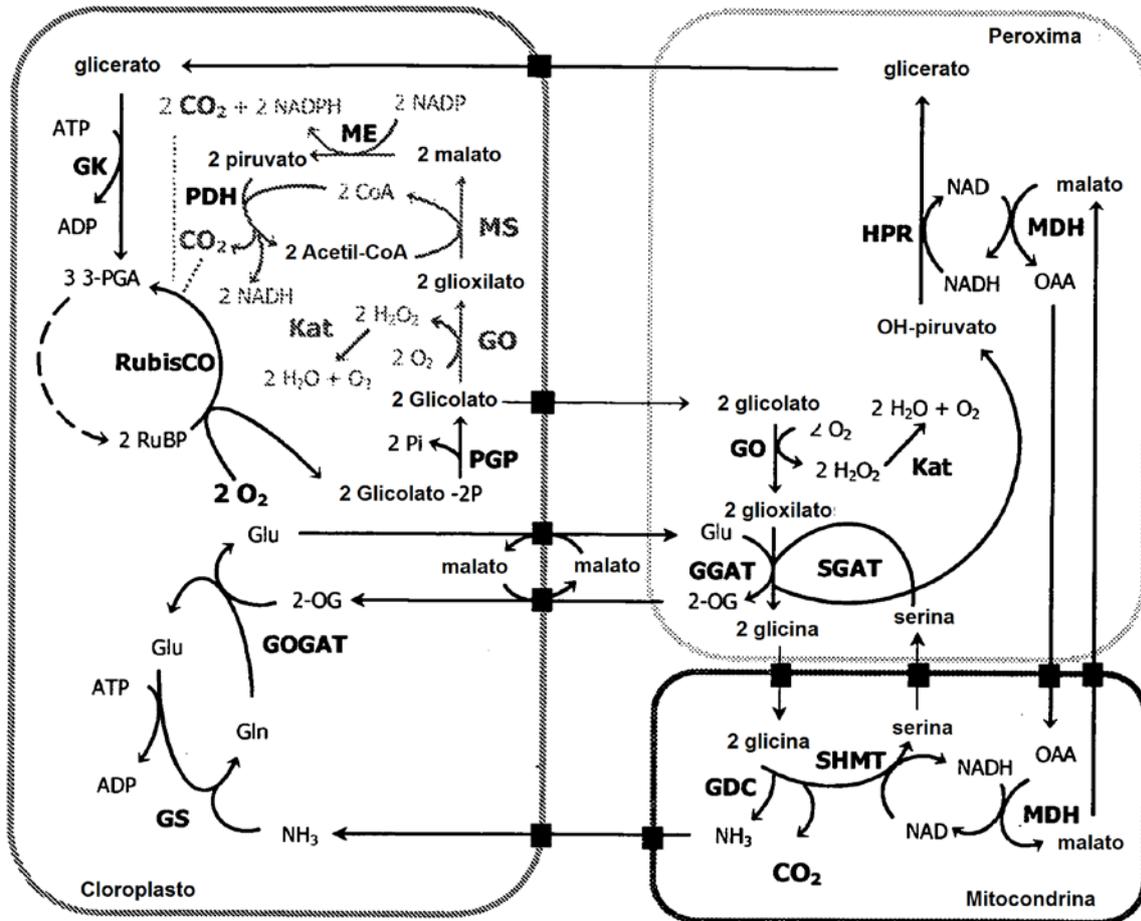


Figura 2.

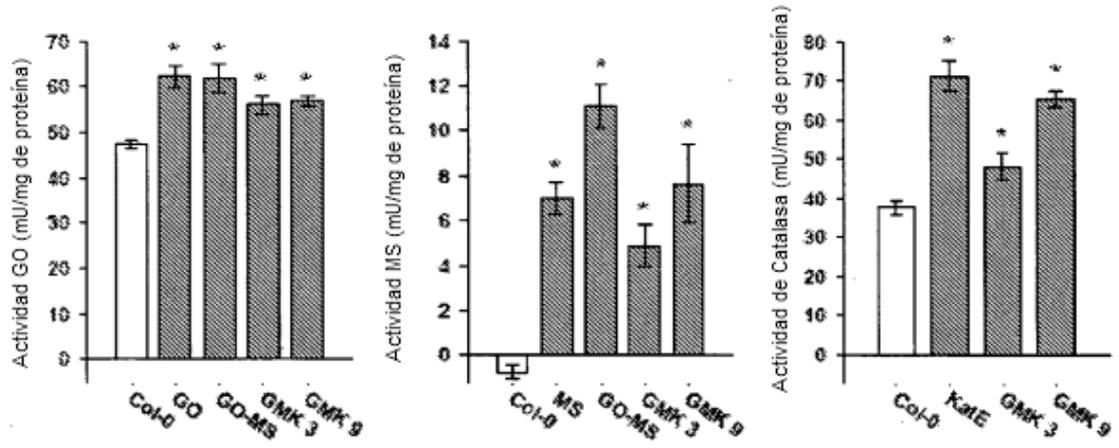


Figura 3.

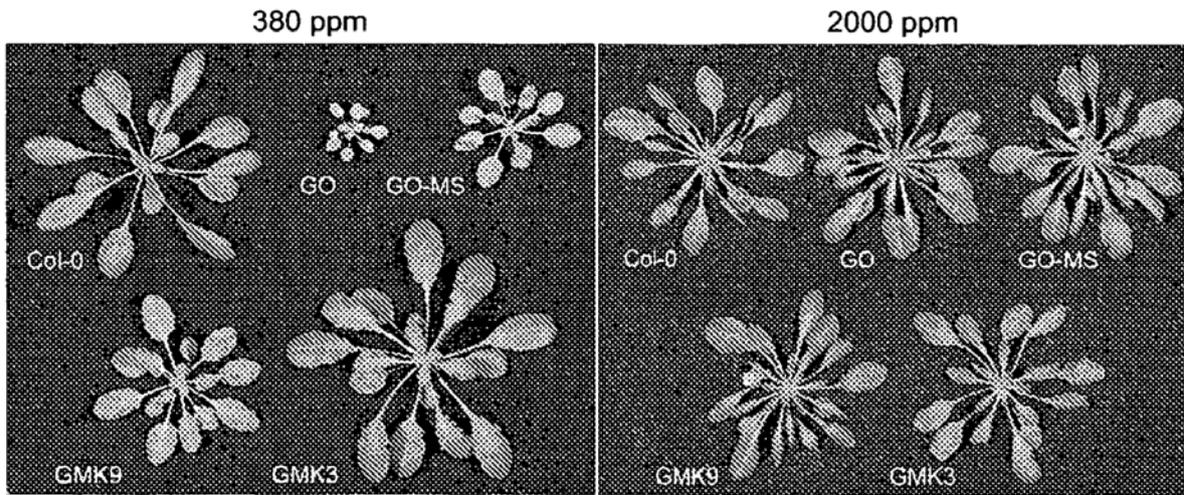


Figura 4.

