



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 372 071**

② Número de solicitud: 201000499

⑤ Int. Cl.:  
**A01N 63/02** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **19.04.2010**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **13.01.2012**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**13.01.2012**

⑰ Solicitante/s: **IDEN BIOTECHNOLOGY, S.L.**  
**c/ Conde Oliveto, nº 2 - 3º Izda.**  
**31002 Pamplona, Navarra, ES**

⑱ Inventor/es: **Baroja Fernández, Miren Edurne;**  
**Li, Jun;**  
**Muñoz Pérez, Francisco José;**  
**Ovecka, Miroslav;**  
**Pozueta Romero, Javier;**  
**Ezquer Garín, Ignacio y**  
**Abdellatif, Bahaji**

⑳ Agente: **Buceta Facorro, Luis**

㉔ Título: **Procedimiento para alterar el patrón de desarrollo y aumentar el crecimiento en plantas.**

㉖ Resumen:

Procedimiento para alterar el patrón de desarrollo y aumentar el crecimiento en plantas.

El procedimiento consiste en hacer crecer plantas en una atmósfera en la que estén presentes volátiles emitidos por un microorganismo, sin que exista contacto físico entre el microorganismos y la planta, sólo que la planta entre en contacto con los volátiles emitidos por el microorganismo. Se basa en el descubrimiento de que los volátiles emitidos por bacterias Gram positivas o negativas, levaduras y hongos microscópicos promueven un incremento del crecimiento de las plantas en general, con aumento de longitud, el número de hojas y/o el número de ramas de la planta, así como un incremento de la biomasa.

ES 2 372 071 A1

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para alterar el patrón de desarrollo y aumentar el crecimiento en plantas.

5 **Campo técnico**

La invención se refiere a un procedimiento para incrementar el crecimiento de plantas, provocando un aumento de su biomasa, su robustez y el número de flores y ramificaciones respecto a las plantas crecidas en condiciones normales. Este procedimiento además permite inducir la floración.

10

**Antecedentes de la invención**

Las plantas perciben estímulos bióticos reconociendo multitud de diferentes compuestos señalizadores que se originan en los organismos con los que interactúan. Algunas de estas sustancias representan patrones moleculares asociados a patógenos, que generalmente actúan como desencadenantes de reacciones de defensa. Se perciben a bajas concentraciones y comprenden diversas estructuras, incluidas las de hidratos de carbono, proteínas, glicoproteínas, péptidos, lípidos y esteroides (Hahlbrock *et al.* 2003: Nonsel self recognition, transcriptional reprogramming, and secondary metabolite accumulation during plant/pathogen interactions, Proc Natl. Acad. Sci USA 100 (supl 2), 14569-14576).

20

Los microorganismos también sintetizan y emiten muchos compuestos volátiles con masas moleculares menores que 300 Da, polaridad baja, y una elevada presión de vapor (Schöller *et al.* 2002: Volatile metabolites from actinomycetes, J. Agric. Food Chem. 50, 2615-2621; Schultz and Dickschat 2007: Bacterial volátiles: the smell of small organisms, Nat. Prod. Rep. 24, 814-842; Splivallo *et al.* 2007a: Discrimination of truffle fruiting body versus mycelial aromas by stir bar sorptive extraction, Phytochemistry 68, 2584-2598). El contacto con microorganismos o agentes desencadenantes de reacciones de defensa de plantas no sólo afecta a dichas reacciones de defensa, sino que, muy a menudo, conducen a una disminución en la fotosíntesis, y a una transición del estado de fuente (en el que se producen compuestos orgánicos asimilables) al de sumidero (en el que se importan dichos compuestos asimilables de tejidos en los que están almacenados) (como revisión, véase Berger *et al.* 2007: Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions, J. Exp. Bot. 58, 4019-4026). Una indicación del estado de sumidero en hojas infectadas es la regulación al alza de la invertasa de la pared celular, que da como resultado la reducción de la exportación de sacarosa de la hoja infectada a otras partes de la planta. En algunos casos, la enzima sacarolítica sacarosa sintasa (SuSy) se regula al alza tras el contacto con microorganismos, lo que puede servir para repartir sacarosa a la deposición callosa y promover la biosíntesis de polisacáridos de pared celular en los sitios de infección (Essmann *et al.* 2008: Leaf carbohydrate metabolism during defense, Plant Signaling & Behavior 3, 885-887). El contacto con patógenos también puede dar como resultado la regulación a la baja de genes implicados en el metabolismo del almidón (Cartieaux *et al.* 2008: Simultaneous interaction of *Arabidopsis thaliana* with *Bradyrhizobium sp.* Strain ORS278 and *Pseudomonas syringae* pv. Tomato DC3000 leads to complex transcriptome changes, Mol. Plant-Microbe Interact. 21, 244-259; Fabro *et al.* 2008: Genome-wide expression profiling *Arabidopsis* at the stage of *Golovinomyces cichoracearum* haustorium formation, Plant Physiol. 146, 1421-1439), lo que puede facilitar la disponibilidad para el patógeno de azúcares simples en los sitios de infección. Estos homopolisacáridos ramificados son sintetizados por la almidón/glucógeno sintasa utilizando ADPglucosa (ADPG) como molécula donadora de azúcar.

35

40

45

50

55

60

65

El almidón y el glucógeno son los principales hidratos de carbono de almacenamiento en plantas y bacterias, respectivamente, estando su metabolismo estrechamente conectado con el de los aminoácidos por mecanismos todavía poco comprendidos. En *Escherichia coli*, la privación de aminoácidos desencadena la respuesta a condiciones estrictas, un cambio fisiológico pleiotrópico que hace pasar la célula de un modo relacionado con el crecimiento a un modo de mantenimiento/supervivencia/biosíntesis. En condiciones de limitada provisión de nutrientes (aminoácidos) se para la división celular, y tiene lugar una disminución en la demanda en proteínas dependientes de ATP y en la síntesis y degradación de ácidos nucleicos. El exceso de ATP se desvía entonces desde el metabolismo de ácidos nucleicos/proteínas hacia la biosíntesis de glucógeno si está presente en el medio un exceso de fuentes de carbono (Eydallin *et al.*, 2007b: Genome-wide screening of genes affecting glycogen metabolism in *Escherichia coli* K-12, FEBS Lett 581, 2947-2953; Montero *et al.* 2009: *Escherichia coli* glycogen metabolism is controlled by the PhoP-PhoQ regulatory system at submillimolar environmental  $Mg^{2+}$  concentrations, and is highly interconnected with a wide variety of cellular processes, Biochem. J. 424, 129-141). El signo característico de esta respuesta fisiológica pleiotrópica es la acumulación de la alarmona guanosina 5'-difosfato 3'-difosfato (ppGpp), un nucleótido que se une a la RNA polimerasa bacteriana para potenciar la expresión de genes (incluidos los implicados en el metabolismo del glucógeno) expresados al comienzo de la fase estacionaria. Los niveles de ppGpp están controlados por RelA (una ppGpp sintasa) y SpoT (una enzima bifuncional que muestra actividades de ppGpp sintasa e hidrolasa) (Potrykus and Cashel 2008: (p)ppGpp: still magical?, Annu. Rev. Microbiol. 62, 35-51). Los mutantes de *E. coli* que tienen dañada la función relA, y las células que sobreexpresan spoT muestran un fenotipo deficiente en glucógeno (Montero *et al.* 2009: *Escherichia coli* glycogen metabolism is controlled by the PhoP-PhoQ regulatory system at submillimolar environmental  $Mg^{2+}$  concentrations, and is highly interconnected with a wide variety of cellular processes, Biochem. J. 424, 129-141). Por el contrario, los mutantes de *E. coli* que tienen dañada la síntesis de aminoácidos tales como la cisteína muestran un fenotipo de glucógeno en exceso como resultado de la respuesta estricta (Eydallin *et al.*, 2007b: Genome-wide screening of genes affecting glycogen metabolism in *Escherichia coli* K-12, FEBS Lett 581, 2947-2953). Estos mutantes muestran un fenotipo de glucógeno normal cuando se cultivan en medio suplementado con cisteína, lo que apunta a la existencia de conexiones estrechas entre los metabolismos del azufre, el nitrógeno y el carbono.

Estudios recientes han demostrado que las plantas poseen un sistema regulador mediado por ppGpp similar al que se da en las bacterias, lo cual se ha demostrado que juega un papel crucial en aspectos tales como la fertilidad de las plantas. El ppGpp se acumula en el cloroplasto de hojas estresadas a través de la regulación de la expresión de homólogos de RelA/SpoT (RSH) (Takahashi *et al.* 2004, Identification of the bacterial alarmone guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp) in plants, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 4320-4324).

Al contrario que en las bacterias, donde la degradación del glucógeno tiene lugar a través de la ruta fosforolítica, la degradación del almidón en las plantas es principalmente hidrolítica, jugando papeles importantes en la degradación del almidón de endospermos y cereales de hojas las  $\alpha$ -amilasas y las  $\beta$ -amilasas, respectivamente (Scheidig *et al.* 2002: Downregulation of a chloroplast-targeted  $\beta$ -amylase leads to a starch-excess phenotype in leaves, Plant J. 30, 581-591; Fulton *et al.* 2008:  $\beta$ -amylase4, a noncatalytic protein required for starch breakdown, acts upstream of three active  $\beta$ -amylases in *Arabidopsis* chloroplasts, Plant Cell 20, 1040-1058). Desde la demostración inicial de que ADPG sirve como molécula precursora para la biosíntesis tanto del glucógeno de las bacterias como del almidón de las plantas, ha estado bastante extendida la consideración de que la ADPG pirofosforilasa (AGP) es la única enzima que cataliza la producción de ADPG. La evidencia genética de que la biosíntesis de glucógeno bacteriano ocurre solamente por la ruta de AGP (GlgC) se ha obtenido con mutantes *glgC*. Sin embargo, recientes estudios han demostrado que estos mutantes acumulan cantidades sustanciales de glucógeno y un contenido normal de ADPG. Además, se han aportado evidencias que demuestran la existencia de diversas fuentes importantes, diferentes de GlgC, de ADPG ligadas a la biosíntesis del glucógeno en diferentes especies bacterianas.

Generalmente, la biosíntesis de almidón en hojas se ha considerado que tiene lugar exclusivamente en el cloroplasto, y está segregada del proceso biosintético de sacarosa que tiene lugar en el citosol (Fig. 1A). De acuerdo con esta visión clásica, se considera al almidón el producto final de una ruta unidireccional en la que AGP cataliza exclusivamente la síntesis de ADPG, y funciona como la principal etapa reguladora del proceso biosintético del almidón (Neuhaus *et al.* 2005: No need to shift the paradigm on the metabolic pathway to transitory starch in leaves, Trends Plant Sci. 10, 154-156; Streb *et al.* 2009: The debate on the pathway of starch synthesis: a closer look at low-starch mutants lacking plastidial phosphoglucomutase supports the chloroplast-localised pathway, Plant Physiol. 151, 1769-1772). Sin embargo, recientes evidencias han indicado la existencia de una ruta adicional en la que se produce *de novo* en el citosol, mediante SuSy, ADPG ligado a la biosíntesis del almidón. La enzima sacarolítica SuSy es el principal determinante de la fuerza de sumidero que controla intensamente la canalización de la sacarosa entrante hacia almidón y polisacáridos de la pared celular (Amor *et al.* 1995: A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 9353-9357). Cataliza la conversión reversible de sacarosa y un nucleósido difosfato en las correspondientes glucosa y fructosa nucleósido difosfato. Aunque UDP es el sustrato nucleósido difosfato preferido para que SuSy produzca UDPG, ADP también actúa como una molécula aceptora efectiva para producir ADPG.

Según esta visión alternativa, tanto las rutas biosintéticas de la sacarosa como la del almidón están estrechamente interconectadas mediante la actividad productora de ADPG de SuSy (Muñoz *et al.*, 2006: New enzymes, new pathways and an alternative view on starch biosynthesis in both photosynthetic and heterotrophic tissues of plants, Plant Cell Physiol. 46, 1366-1376; Baroja-Fernández *et al.*, 2009: Enhancing sucrose synthase activity in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers results in increased levels of starch, ADPglucose and UDPglucose and total yield, Plant Cell Physiol. 50, 1651-1662), y mediante la acción de un translocador de ADPG todavía sin identificar localizado en las membranas de la envuelta de los cloroplastos. La visión "alternativa" de la biosíntesis de almidón en las hojas ilustrada en la Fig. 1B asume también que tanto la AGP como la fosfoglucomutasa plastidial juegan un papel importante en la retirada de unidades de glucosa derivadas de la degradación del almidón.

La mayor parte de los estudios sobre las interacciones planta-microorganismo se han llevado a cabo en condiciones de contacto físico entre la planta hospedadora y el microorganismo. Sin embargo, se sabe poco sobre cómo pueden afectar las emisiones de volátiles microbianos a la fisiología de la planta en ausencia de contacto físico. Sí se conoce, sin embargo, que microorganismos tales como *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp., *Botrytis cinerea* y distintas trufas producen etileno (Splivallo *et al.* 2007b: Trafile volátiles inhibit growth and induce an oxidative burst in *Arabidopsis thaliana*, New Phytologist 175, 417-424), una hormona gaseosa de plantas que juega importantes papeles en múltiples aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, incluidos la germinación de semillas, alargamiento del hipocótilo, iniciación de las pilosidades radiculares, la senescencia de hojas y flores, la maduración de los frutos, la acumulación de almidón, etc. Sólo recientemente Splivallo *et al.* (Splivallo *et al.* 2009: Trafiles regulate plant root morphogenesis via the production of auxin and ethylene, Plant Physiol. 150, 2018-2029) aportaron evidencias de que el etileno producido por las trufas induce alteraciones en el desarrollo de plantas de *Arabidopsis*, que presumiblemente van acompañadas por importantes cambios en el metabolismo.

En lo que se refiere a las bacterias, los escasos trabajos en los que se describe el efecto de volátiles microbianos sobre el crecimiento de plantas giran en torno a un número limitado de cepas especializadas de rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR: *plant growth promoting rhizobacteria*). Se denomina rizobacterias a ciertas bacterias simbiotas que existen en el suelo y que colonizan las raíces de las plantas. La mayor parte de las cepas cuyo cultivo da lugar a un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas cultivadas en su presencia, sin necesidad de contacto físico, pertenecen al género *Bacillus* o un género estrechamente relacionado con éste, *Paenibacillus*, al cual pertenecen bacterias que en el pasado fueron clasificadas como pertenecientes al género *Bacillus*. Así, por ejemplo, se ha demostrado que volátiles emitidos por rizobacterias de cepas pertenecientes a las especies *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* o *Bacillus cepacia* promueven el crecimiento de plantas de *Arabidopsis*, facilitando la toma de

nutrientes, la fotosíntesis y la respuesta de defensa, y disminuyendo la sensibilidad a la glucosa y los niveles de ácido abscísico (Ryu *et al.* 2003: Bacterial volátiles promote growth in Arabidopsis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 4927-4932; Ryu *et al.* 2004: Bacterial volátiles induce systemic resistance in Arabidopsis, Plant Physiol 134, 1017-1026; Vespermann *et al.* 2007: Rhizobacterial volátiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*, Appl. Environ. Microbiol. 73, 5639-5641, Xie *et al.* 2009: Sustained growth promotion in Arabidopsis with long-term exposure to the beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GB03), Plant Signal. Behav. 10, 948-953). En concreto, Ryu *et al.* (Ryu *et al.* 2003: Bacterial volátiles promote growth in Arabidopsis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 4927-4932) describen un incremento del crecimiento de plántulas de *Arabidopsis thaliana* desencadenado por los volátiles orgánicos liberados por cepas específicas de PGPR, concretamente *Bacillus subtilis* GB03 y *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a, comentando además que sus datos demuestran que la liberación de compuestos volátiles orgánicos no es el mecanismo común de estimulación del crecimiento de todas las rizobacterias. Al ser cultivadas en el medio rico en aminoácidos agar con tripticasa de soja, ambas bacterias liberan 3-hidroxi-2-butanona (acetoína) y 2,3-butanediol, compuestos no emitidos por las otras PGPR ensayadas cuyos volátiles no afectaban al crecimiento de *Arabidopsis*, pero que también son liberados por otras cepas bacterianas para las que se ha detectado capacidad de incrementar la germinación y el crecimiento de plantas tales como *Brassica oleracea* sin existir contacto físico entre planta y bacteria, como es el caso de la cepa de *Bacillus subtilis* WG6-14 objeto de la solicitud de patente US 2008/0152684 A1. Sin embargo, existen muchas bacterias liberadoras de estas sustancias (algunas pertenecientes al género *Bacillus*) que no promueven el crecimiento de la planta. Además de las citadas cepas del género *Bacillus* GB03 e IN937a, Ryu *et al.* sólo mencionan que el efecto de incremento del crecimiento por la liberación de volátiles se detectara para otra de las bacterias ensayadas, *Enterobacter cloacae* JM22, aunque no se muestra ningún dato que corrobore este último resultado ni se hace ninguna mención sobre el perfil de volátiles emitido por esta última bacteria. Además, un artículo posterior del mismo grupo investigador (Ryu *et al.* 2004: Bacterial volátiles induce systemic resistance in Arabidopsis, Plant Physiol 134, 1017-1026) muestra marcadas diferencias entre la elevada capacidad de los volátiles emitidos por las dos cepas de *Bacillus* para proteger las plantas de *Arabidopsis thaliana* del efecto del patógeno *Erwinia carotovora* y el escaso efecto protector de los volátiles emitidos por *Enterobacter cloacae* JM22.

Se han descrito también otras cepas de los géneros *Bacillus* o *Paenibacillus* que emiten volátiles capaces de promover el crecimiento de distintas plantas pero, en estos casos, el efecto parece estar ligado principalmente a la capacidad de controlar el crecimiento de patógenos que están afectando a la planta. Tal es el caso, por ejemplo, del bacilo Kyu-W63 descrito en la patente japonesa JP10033064, cuyos volátiles son capaces de controlar la patopoyesis debida a la presencia de hongos del género *Cercospora* en hojas de pepino, facilitando con ello el crecimiento de la planta. La descripción sugiere que el efecto podría ser similar utilizando otras bacterias filamentosas, siempre y cuando el cultivo se produzca en un medio rico en azúcares tal como el agar PDA, medio que no se define con más detalle; tampoco se dan pruebas que demuestren la influencia del medio sugerido o la aplicabilidad del método para cualquier otra bacteria filamentosas.

También el método para incrementar el crecimiento de plantas, basado en composiciones que comprenden un metabolito volátil producido por una bacteria, que se reivindica en la solicitud de patente coreana KR20090066412, alude de forma combinada a la inducción de protección contra enfermedades y el ataque de insectos y a la promoción del crecimiento de distintas plantas, monocotiledóneas y dicotiledóneas. Como ejemplos de posibles metabolitos útiles se citan 3-acetil-1-propanol, 3-metil-1-butanol, indol, acetato de isoamilol y acetato de butilol. El resumen menciona que los posibles microorganismos que dan lugar a un metabolito volátil con el efecto buscado comprenden bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus* o *Paenibacillus*, siendo una cepa de la especie *Paenibacillus polymyxa* el microorganismo preferido.

Tal como se ha mencionado previamente, se ha detectado también que los compuestos volátiles emitidos por algunas bacterias tienen otros efectos en las plantas, además de la activación del sistema de defensa y la promoción del crecimiento. Así, Zhang *et al.* (Zhang *et al.* 2008: Soil bacteria augment Arabidopsis photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels in planta, The Plant Journal 56, 264-273), describen cómo la exposición de plantas de *Arabidopsis thaliana* a los volátiles emitidos por *Bacillus subtilis* GB03, cultivado de nuevo en el medio de cultivo agar con tripticasa de soja, reprimen la sensibilidad a la glucosa de las plantas, provocando simultáneamente un ligero aumento de la acumulación de azúcar y un incremento de la fotosíntesis, proceso este último que normalmente se ve inhibido cuando se incrementan los niveles de azúcares solubles acumulados en las plantas. Las plantas que entran en contacto con los volátiles emitidos por *B. subtilis* GB03 muestran incrementos de 50-62% del contenido de azúcares solubles sobre las plantas control que, aproximadamente, acumulan 2 micromoles de hexosa por gramo de peso fresco (cf. Fig. 2, Zhang *et al.* 2008: Soil bacteria augment Arabidopsis photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels in planta, The Plant Journal 56, 264-273). El incremento del contenido de azúcares solubles generalmente está asociado con una disminución de los niveles intracelulares de almidón (Caspar *et al.* (1985): Alterations in growth, photosynthesis and respiration in a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L) deficient in chloroplast phosphoglucomutase, *Plant Physiol.* 79: 11-17; Jones *et al.* (1986): Reduced enzyme activity and starch level in an induced mutant of chloroplast phosphoglucomutase, *Plant Physiol.* 81: 367-371; Lin *et al.* (1988): A starch deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* with low ADP-glucose phosphorylase activity lack one of the subunits of the enzyme, *Plant Physiol.* 86: 1131-1135; Neuhaus and Stitt (1990): Control analysis of phosphosynthate partitioning. Impact of reduced activity of ADP-glucose pyrophosphorylase or plastid phosphoglucomutase on the fluxes to starch and sucrose in *Arabidopsis thaliana*, *Planta* 182: 445-454; Szydlowski *et al.* (2009): Starch granule initiation in Arabidopsis requires the presence of either class IV or class III starch synthase, *Plant Cell* 21, 2443-2457). Por lo tanto, es esperable que, en las condiciones empleadas por Zhang *et al.*, las plantas que entran en contacto con los volátiles emitidos por *B. subtilis* GB03 acumulen poco almidón. El método utilizado por el grupo de Zhang *et al.*

sólo permite medir el contenido de glucosa, fructosa, fructosa-6-fosfato y glucosa-6-fosfato, aunque no el almidón acumulado, aunque la ausencia de variaciones en los niveles de expresión de genes implicados en el metabolismo de almidón tales como la almidón sintasa o enzimas degradadoras del almidón revelada por el análisis transcriptómico de proteínas de cloroplasto en plantas expuestas a los volátiles mostrado en la Tabla Suplementaria 1 no parece indicar que fuera esperable una elevación de este polisacárido de reserva al ser sometida la planta a los efectos de los volátiles emitidos por *B. subtilis* GB03. Esta interpretación se ve apoyada por el hecho de que los ensayos referidos a la inhibición de la longitud del hipocótilo y la germinación de semillas indican que los volátiles de *B. subtilis* GB03 no provocan una respuesta metabólica al tratamiento, puesto no parecen afectar al metabolismo de los azúcares, sino a la sensibilidad a dichos compuestos.

De acuerdo con lo que se sabía hasta ahora, todos estos efectos sobre las plantas no son comunes a los volátiles emitidos por cualquier bacteria. Así, por ejemplo, tal como se comentaba más arriba, los ensayos realizados por Ryu *et al.* (Ryu *et al.* 2003: Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 4927-4932) demuestran que varias cepas de especies pertenecientes *Bacillus*, tales como *Bacillus pumilus* T4 o *Bacillus pasteurii* C-9, así como bacterias pertenecientes a otros géneros tales como *Pseudomonas fluorescens* 89B-61 o *Serratia marcescens* 90-166, no fueron capaces de incrementar el crecimiento de plantas de *Arabidopsis thaliana* sometidas al efecto de los volátiles emitidos por dichas bacterias, a pesar de haber sido cultivadas igualmente en el mismo medio de cultivo, rico en azúcares y aminoácidos: el agar con tripticasa de soja. Otra de las bacterias incluidas en el mismo ensayo, *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , se utilizó en el mismo ensayo como control, por estar reconocida como una cepa que no incrementa el crecimiento de las plantas sometidas a la acción de los volátiles emitidos por ella.

Además, se ha visto también que los volátiles de bacterias tales como *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp. y *Stenotrophomonas* spp., y de algunas especies de hongos ejercen efectos inhibitorios sobre el crecimiento de plantas de *Arabidopsis* (Splivallo *et al.* 2007b: Trifile volatiles inhibit growth and induce oxidative burst in *Arabidopsis thaliana*, New Phytologist 175, 417-424, Tarkka and Piechulla, 2007: Aromatic weapons: truffles attack plants by the production of volatiles, New Phytologist 175,381-383).

Debido a la falta de conocimiento acerca de cómo los volátiles microbianos pueden afectar a la reprogramación del metabolismo celular, en particular al metabolismo primario de hidratos de carbono, en la actualidad no es posible actuar sobre el metabolismo de las plantas para promover su crecimiento con volátiles microbianos, pues no están claros los mecanismos implicados en promover o en inhibir el crecimiento activados por los microorganismos anteriormente citados, ni en las condiciones en las que se activan unos u otros o las posibles diferencias entre microorganismos que dan lugar a uno u otro efecto. Sin embargo, sería interesante conocer estos mecanismos para poder diseñar un procedimiento para activar el crecimiento y/o la floración de las plantas, e incrementar su crecimiento, resistencia biológica y mecánica mediante el uso de volátiles microbianos y, preferiblemente, para incrementar la síntesis de almidón en las plantas, por ser éste en la actualidad un producto de gran interés en algunas industrias. La presente invención proporciona una solución a este problema.

### Descripción de la invención

La invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que, al crecer plantas en presencia de cualquier tipo de microorganismo (bacterias Gram-positiva o Gram-negativas, levaduras u hongos), sin que exista contacto entre la planta y el microorganismo, los volátiles emitidos por el microorganismo dan lugar a que se produzca una alteración en el patrón de desarrollo y un aumento en el crecimiento, la fertilidad, el peso seco y la acumulación de almidón de las plantas. Además, la exposición a tales volátiles induce a la acumulación de un almidón con características estructurales diferentes a las del almidón acumulado por plantas no expuestas a volátiles, tanto en lo que se refiere a la propia estructura de la molécula del almidón como al tamaño de los gránulos de acumulación. Estos efectos se observan tanto con plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas (*Arabidopsis*, maíz, cebada, tabaco, patata...), y son independientes de que el microorganismo sea o no patógeno para la planta y de que pertenezca o no a una especie que no convive con la planta en condiciones naturales. Estos efectos se observan tanto si las plantas se cultivan *in vitro* como en tierra, siempre y cuando la planta se cultive en presencia de un cultivo de un microorganismo que emita volátiles o bien en presencia de los volátiles microbianos emitidos por el microorganismo. Éstos parecen ser los responsables de los efectos observados. Por tanto, aunque no exista contacto físico entre la planta y el microorganismo, este último debe estar lo suficientemente próximo a la planta, como para que los compuestos volátiles emitidos por el microorganismo sí entren en contacto con la planta y puedan ejercer su efecto sobre ella.

La alteración del patrón de desarrollo de la planta se manifiesta aumentando el número de hojas, el número de ramas, el número de flores y semillas e induciendo la floración.

Este efecto se ha observado con todo tipo de microorganismos y, particularmente en el caso de los estudios realizados en hojas, parece ser la consecuencia de una transición del estatus de fuente al de sumidero. Así, los resultados presentados en la presente solicitud muestran que las emisiones de volátiles de todas las especies microbianas analizadas promovieron un aumento de la biomasa en las plantas y condujeron a la acumulación de un alto contenido de almidón, en comparación con las plantas control crecidas en las mismas condiciones, salvo por la ausencia del cultivo del microorganismo. El efecto observado es independiente de la presencia de sacarosa en el medio de cultivo y es fuertemente reprimido por la suplementación con cisteína. El efecto sucede tanto en plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas. Esto es así no sólo para volátiles emitidos por rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas tales como ciertos aislados de *Bacillus subtilis*, sino también, sorprendentemente, para los volátiles emitidos para diferentes patógenos vegetales fúngicos y bacterias de especies como *E. coli* o *Pseudomonas* spp., y contradicen

resultados previos encontrados con dichas especies y algunas especies de hongos, en las que se había observado el efecto contrario, dando lugar sus volátiles a una inhibición del crecimiento de las plantas cultivadas en su presencia). De esta manera, la presente invención demuestra que la capacidad de emitir volátiles que influyen positivamente sobre la biomasa de las plantas en general y sobre su crecimiento en particular no se restringe a las rizobacterias, siempre que el microorganismo se cultive en el medio adecuado.

El efecto positivo sobre el crecimiento y la acumulación del almidón se observa muy especialmente cuando el microorganismo se cultiva en medio mínimo (entendiendo como tal un medio que carece de aminoácidos pero que contiene diversas sales, que pueden variar según la especie de microorganismo y las condiciones de crecimiento, que son las que proporcionan elementos esenciales tales como magnesio, nitrógeno, fósforo y azufre para que el microorganismo puede sintetizar proteínas y ácidos nucleicos) suplementado con una fuente de carbono orgánico (generalmente, un azúcar, tal como glucosa o sacarosa). Parece que la utilización de este tipo de medio evita que los microorganismos generen amonio volátil a partir de aminoácidos u otras fuentes de nitrógeno orgánico presentes en medios ricos en aminoácidos como los utilizados en los ensayos en los que otros autores habían observado inhibición del crecimiento por volátiles microbianos (tales como el medio LB o el medio de Kornberg), y esta diferencia parece ser la causa que da lugar a que el cultivo de plantas en presencia de microorganismos con los que no tienen contacto dé lugar a un aumento del crecimiento, floración, ramificación, fertilidad, robustez, biomasa en general y de la acumulación de almidón en particular.

Es ésta la primera ocasión en la que se informa de que los volátiles microbianos sean capaces de inducir tanto el crecimiento como la floración, la ramificación y la acumulación de almidón, así como la alteración estructural de este polímero en las plantas que crecen bajo su efecto. Así, los autores de la invención parecen haber encontrado las condiciones de cultivo que permiten que cualquier tipo de microorganismo (patógeno o no para la planta) libere una mezcla de volátiles capaz de ejercer un efecto positivo tanto sobre el crecimiento como sobre la floración, la ramificación y sobre la acumulación de almidón.

Los resultados obtenidos por los autores de la invención contradicen, además, algunas ideas previas respecto al medio de cultivo a utilizar para que una bacteria produzca los volátiles adecuados para promover el crecimiento de plantas cultivadas en presencia de dichos volátiles, tal como la idea que parece sugerirse en la patente japonesa JP10033064 de que el cultivo en un medio rico en azúcar pudiera ser suficiente para que algunas bacterias emitieran una mezcla de volátiles capaz de inducir el crecimiento de plantas y protegerlas frente a patógenos. Así, los ensayos descritos más adelante en los Ejemplos de la presente solicitud muestran que volátiles emitidos por bacterias y otros microorganismos, crecidos en LB con glucosa 50 mM, ejercen un efecto negativo no sólo sobre el crecimiento, sino también sobre la acumulación de almidón en las plantas que entran en contacto con dichos volátiles.

En cuanto al incremento de la cantidad de almidón acumulada, se observa en distintos órganos de la planta: hojas (no sólo cuando están unidas a la planta completa, sino también en hojas desprendidas de la planta, colocadas en presencia de volátiles emitidos por microorganismos de distintas especies); raíces; tallos; tubérculos (en los que la cantidad de almidón acumulada, por ejemplo en plantas de patata, es superior a la acumulada en plantas control ...).

El descubrimiento de que los volátiles microbianos inducen la sobreacumulación de almidón en hojas y otros órganos de la planta constituye un mecanismo del que no se había informado previamente, que establece una función adicional para los volátiles como moléculas señalizadoras que median en las interacciones planta-microorganismo y que ayuda en la dilucidación del proceso de inducción del metabolismo de hidratos de carbono en las plantas mediante microorganismos. El incremento en la cantidad de almidón acumulado parece ir acompañado, además, por cambios estructurales en el almidón, tanto en lo que se refiere a la estructura del biopolímero, como a la de los gránulos. Así, se observa, por una parte, que los gránulos de almidón son de tamaño superior al de las plantas control cultivadas en ausencia de volátiles. Es esta una característica bastante importante, pues el tamaño del gránulo de almidón tiene una gran importancia a nivel industrial, por ser un determinante importante de las propiedades físico-químicas de las suspensiones de los gránulos de almidón, de manera la diferencia del tamaño y forma de los gránulos de almidón de especies tales como patata, trigo, maíz, etc., es lo que, en gran medida, determina que estos almidones tengan aplicaciones industriales diferentes. Además, se observa que el almidón acumulado por las plantas que crecen en atmósferas que contienen volátiles microbianos presentan una importante reducción en el contenido relativo de amilosa, con lo que la relación amilosa/amilopeptina es inferior a la de las plantas control. Esta modificación en la estructura de la molécula del almidón se ve acompañada por cambios en el grado de polimerización de las cadenas de amilopectina, que es menor en las plantas tratadas con volátiles microbianas. Así, el cultivo de plantas en atmósferas que contienen volátiles emitidos por microorganismos permite obtener plantas que no sólo tienen una producción superior de almidón sino que, además, dan lugar a un almidón cuyas características permiten aplicaciones industriales diferentes a las del almidón sintetizado por las plantas cultivadas en ausencia de volátiles.

Los análisis de transcriptomas de, entre otros, hojas de plantas de patata expuestas a volátiles de origen fúngico (concretamente, producidos por hongos del género *Alternaria*) han revelado que los cambios en el metabolismo del almidón están acompañados por cambios en múltiples procesos biológicos y en la actividad o expresión de distintas enzimas, tales como:

- regulación al alza de: sacarosa sintasa, inhibidores de invertasas, sintasa de almidón de clase IV, enzima ramificante del almidón, proteínas implicadas en endocitosis y tráfico de vesículas, el transportador de glucosa-6-fosfato del estroma al citosol, y enzimas implicadas en rutas glucolíticas, respiratorias y fermentativas;

- regulación a la baja de: invertasa ácida, tiorredoxinas plastidiales, enzimas de degradación del almidón, proteínas implicadas en la conversión de triosas-fosfato plastidiales en glucosa-6-fosfato citosólicas, proteínas implicadas en la provisión interna de aminoácidos tales como la nitrito reductasa, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa plastidial, la cisteína sintasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa plastidial, etc ....

5

La Fig. 21 ilustra un modelo metabólico sugerido para el proceso desencadenado por los volátiles microbianos, deducido a partir de los estudios realizados en hojas de plantas de patata que se describen más adelante en los Ejemplos de la presente solicitud, que comprenden estudios de variación tanto en actividades enzimáticas como en el transcriptoma, así como análisis mediante RT-PCR de los niveles de diversos transcritos específicos especialmente relacionados con el metabolismo de N, C y S.

10

Tal como se discute en los Ejemplos que aparecen más adelante en la presente memoria, la regulación al alza de la sacarosa sintasa (SuSy) parece ser uno de los factores determinantes de la acumulación de almidón en las plantas sometidas al efecto de los volátiles microbianos. Pero los efectos observados sobre otras enzimas, particularmente la reducción de la cisteína sintasa, la reducción de la nitrito reductasa, la reducción de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa plastidial, la reducción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa plastidial, la sobre-expresión del translocador de glucosa-6-fosfato y la sobreexpresión del inhibidor de proteasa, solos o combinados entre sí, parecen ser capaces de dar lugar al incremento en el contenido del almidón, sin necesidad de que se produzca un incremento en la actividad sacarosa sintasa.

15

20

Todos estos hallazgos abren la puerta para plantearse procedimientos para incrementar el crecimiento de plantas y/o su producción de almidón mediante su cultivo en presencia de microorganismos que producen volátiles, sin existir contacto entre ellos, o mediante el cultivo de las plantas en presencia de la mezcla de volátiles producida por el microorganismo previamente cultivado en un espacio diferente al de crecimiento de la planta. Por tanto, deja abierta la posibilidad de incrementar la productividad de plantas cultivadas, por ejemplo, en invernaderos, cocultivando con ellas microorganismos emisores de compuestos volátiles; alternativamente, las plantas podrían entrar en contacto con los volátiles porque los mismos se aplicaran directamente a los invernaderos, tras haber sido cultivados los microorganismos en grandes fermentadores, en los medios adecuados (en general, medios mínimos tales como M9, MOPS, Murashige&Skoog (MS) etc.). El hecho de que las hojas acumulen más almidón en presencia de microorganismos que producen volátiles, incluso cuando dichas hojas están separadas de la planta, permite el diseño de un mecanismo alternativo para la obtención de almidón en el que se utilizan hojas desprendidas de plantas, que pueden ser productos de desecho del procesamiento de las mismas. La dilucidación de las enzimas en cuya actividad/expresión se producen cambios que promueven la acumulación del almidón permiten conseguir el incremento en la producción de almidón mediante métodos alternativos, basados en el mismo principio inventivo, en el que los cambios en determinadas enzimas se producen en la planta por el hecho de utilizarse plantas transgénicas que sobreexpresan el gen o genes de interés o en las que se expresa un inhibidor de las mismas cuya actividad se ve reducida por la presencia de los volátiles microbianos.

25

30

35

40

Además, el hecho de que las hojas separadas de la planta completa sean capaces también de producir almidón, cuando se mantienen en presencia de cultivos de microorganismos que producen volátiles, es muy importante desde el punto de vista industrial. En cuestión de 2-3 días, las hojas son capaces de producir enormes cantidades de almidón con tan sólo 4 ingredientes, que podrían considerarse “baratos”: un poco de agua, CO<sub>2</sub> natural, luz natural y volátiles microbianos. Se puede considerar que la hoja actuaría como una biofactoría productora de almidón alimentada por luz solar. Además del interés que el almidón producido podría tener para la industria del almidón, hay que tener en cuenta la ventaja que supone poder utilizar hojas separadas de las plantas completas, pues los restos de podas que normalmente son destruidos (por ejemplo, hojas de patata), podrían ser destinados a la producción de un tipo de almidón de interés industrial.

45

50

Por todo ello, la invención se refiere a un método para aumentar el tamaño de una planta, su patrón de desarrollo (incluidas características relacionadas con su fertilidad, la biomasa en general y el almidón en particular creciendo la misma en presencia de los volátiles emitidos por un microorganismo, microorganismo que puede cultivarse en el mismo espacio que la planta, para que la planta entre en contacto con ellos debido a que el microorganismo libera dichos volátiles a la atmósfera en la que está creciendo la planta, o que pueden haber sido recogidos previamente y añadirse artificialmente a la atmósfera de crecimiento de la planta.

55

Así, un objeto de la presente invención es un método para incrementar el crecimiento de una planta y/o alterar su patrón de desarrollo, caracterizado por que la planta se cultiva en presencia de un microorganismo que produce compuestos volátiles, sin que exista contacto entre la planta y el microorganismo, o en presencia de los volátiles emitidos por el microorganismo, en el que el microorganismo es distinto de los aislados *Bacillus subtilis* GB03 y *Bacillus amyloliquefaciens* IN937. El aumento del crecimiento de la planta puede manifestarse en un aumento de tamaño (en longitud) de la planta y aumento del tamaño de las hojas. En cuanto a la alteración del patrón de desarrollo, puede manifestarse como un incremento del número de hojas, incremento del número de ramas, o en efectos más estrechamente relacionados con la fertilidad, como el incremento del número de flores y semillas de plantas angiospermas, y/o la inducción de la floración, o en combinaciones de los efectos anteriores.

60

65

El microorganismo puede ser una bacteria, una levadura o un hongo pluricelular microscópico. Cuando el microorganismo se elige entre bacterias, puede elegirse de un género distinto a *Bacillus* o *Paenibacillus*, que son los géneros a los que pertenecen las cepas específicas de rizobacterias en las que previamente se había detectado un efecto positivo de sus emisiones de volátiles sobre el crecimiento de la planta al crecer en medios muy ricos.

Debido al efecto observado, concretamente, sobre el incremento de la acumulación de almidón, otro objeto de la invención es un método para incrementar la producción de almidón de una planta, caracterizado por que la planta se cultiva en presencia de un microorganismo que produce compuestos volátiles, sin que exista contacto entre la planta y el microorganismo, o en presencia de los volátiles emitidos por el microorganismo. Se prefiere especialmente que, además, el almidón producido presente modificaciones con respecto a la estructura normal de la planta, que pueden referirse tanto al aumento del tamaño de los gránulos de almidón, como a la estructura de la molécula del almidón en sí, concretamente, en una reducción de la relación amilosa/amilopectina (que, como se ha explicado previamente, disminuye respecto a la hallada en las plantas control, por producirse una importante reducción en el contenido relativo de amilosa), y en la disminución el grado de polimerización de las cadenas de amilopectina, que es menor en las plantas tratadas con volátiles microbianos con respecto al observado en las plantas control, tal como se muestra más adelante en los Ejemplos referidos al análisis estructural del almidón obtenido al crecer las plantas en presencia de volátiles microbianos.

Dado que el aumento de almidón, según se demuestra en los Ejemplos de la presente solicitud, se ha observado en distintos órganos de la planta (hojas, tallos, raíces y tubérculos), son realizaciones posibles del método de incremento de la acumulación de almidón, preferiblemente con estructura modificada, aquéllas en las que el incremento de la producción de almidón se produce al menos en un órgano de la planta, preferiblemente seleccionado entre hoja, tallo, raíz, semillas o, en las plantas que lo presenten, el tubérculo. Como sucede cuando se busca un incremento del crecimiento y/o la alteración del patrón de desarrollo, cuando el objetivo específico es la acumulación de almidón la planta puede ser una angiosperma, monocotiledónea o dicotiledónea. Se prefieren particularmente las plantas de patata o de maíz. Entre los microorganismos, una posible opción son los hongos de los géneros *Alternaria* o *Penicillium*, cuya utilidad se demuestra más adelante en los Ejemplos de la presente solicitud.

Aprovechando el conocimiento adquirido por los autores sobre las modificaciones en el metabolismo de las plantas mediante los cuales los volátiles microbianos provocan el incremento de la acumulación de almidón, una alternativa al método de incremento de acumulación de almidón consiste en provocar la acumulación directamente mediante el uso de plantas transgénicas, basadas en el mismo principio inventivo, en las que el transgén o transgenes expresado(s) da(n) lugar a la sobreexpresión de alguna de las enzimas reguladas al alza por la exposición a los volátiles o consiste en un inhibidor de la actividad o de la expresión (mediante RNAs de interferencia, por ejemplo) de alguna de las enzimas reguladas a la baja. Así, un aspecto alternativo de la invención es un método para incrementar la producción de almidón de una planta, caracterizado porque la planta es una planta transgénica en la que está presente al menos un transgén cuya expresión da lugar a un producto seleccionado del grupo de: un inhibidor de proteasas de plantas (tal como, por ejemplo, el que presenta el número de acceso en GenBank DQ16832), la enzima ramificante del almidón, un inhibidor de la invertasa ácida (tal como por ejemplo, el que presenta el número de acceso en GenBank FN691928), un RNA antisentido dirigido contra la cisteína sintasa (que puede deducirse, por ejemplo, a partir de la secuencia correspondiente a la cisteína sintasa de la planta de patata, con número de acceso en GenBank AB029512), un RNA antisentido dirigido contra la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa plastidial (tal como por ejemplo, el que presenta el número de acceso en GenBank FN691929), un RNA antisentido dirigido contra la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa plastidial (que puede deducirse, por ejemplo, a partir de la secuencia correspondiente a la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de patata, con número de acceso en GenBank X83923) o un RNA antisentido dirigido contra la nitrito reductasa (tal como por ejemplo, el que presenta el número de acceso en GenBank FN691930). Son realizaciones preferidas aquéllas en las que la planta expresa al menos un transgén cuya expresión da lugar a un producto seleccionado de grupo de: inhibidor de proteasas de plantas, un RNA antisentido dirigido contra la cisteína sintasa o un RNA antisentido dirigido contra la nitrito reductasa. En este último caso, las secuencias codificantes del transgén pueden derivarse, por ejemplo, de las correspondiente al genoma de la patata, es decir, el transgén puede ser uno que exprese el inhibidor de proteasas cuya secuencia codificante está representada por SEQ ID NO:67 o en el que el RNA antisentido expresado por el transgén está dirigido contra la cisteína sintasa cuya secuencia codificante está representada por SEQ ID NO:69 o contra la nitrito reductasa cuya secuencia codificante está representada por SEQ ID NO:71. Se prefiere especialmente que la planta exprese más de un transgén de cualquiera de los citados anteriormente y/o aquéllas realizaciones en las que la planta, adicionalmente a uno o más transgenes de uno de los grupos anteriores, posee también al menos un transgén que da lugar a la expresión ectópica de la enzima sacarosa sintasa (SuSy) (tal como puede ser un transgén que expresa la enzima de patata, cuyo mRNA tiene el número de acceso en GenBank AJ537575) o la expresión del transportador de glucosa-6-fosfato (tal como un transgén que exprese el transportador de patata, cuya secuencia codificante y promotor tienen el número de acceso en GenBank AY163867).

Finalmente, el hecho de que el incremento en el almidón acumulado se observe también en hojas que no forman parte de plantas completas, sino separadas de ellas, cuando la hoja se mantiene junto a un cultivo de un microorganismo, permite contemplar un aspecto más de la invención. El mismo sería un método para la obtención de almidón a partir de hojas de plantas separadas de las mismas, que comprende una etapa en la que las hojas se mantiene en presencia (pero sin contacto físico) de un cultivo de un microorganismo o de los volátiles emitidos por este. De nuevo, se prefiere que el microorganismo sea una bacteria, levadura u hongo microscópico que no entre en contacto con la planta en condiciones naturales de cultivo. Una posible preferencia son los hongos de los géneros *Alternaria* o *Penicillium*, especialmente cuando las hojas son hojas de patata.



Tal como se ha comentado, el método de la invención, en cualquiera de sus aspectos (excepto el que se refiere al uso de plantas transgénicas) requiere que el cultivo de la planta o la colocación de las hojas desprendidas en las que se quiere inducir la acumulación de almidón, se haga de manera que los volátiles emitidos por el microorganismo estén presentes en la atmósfera en la que se cultiva la planta. Cumpliéndose esta condición, el procedimiento de la invención puede llevarse a cabo de distintas maneras. Una posibilidad es que la planta y el microorganismo se cultiven simultáneamente en un mismo recipiente, o que las hojas se introduzcan en un recipiente en el que se esté produciendo el cultivo de microorganismos; en ese caso, para favorecer que la planta entre en contacto con los volátiles emitidos por el microorganismo, es preferible que el recipiente sea un recipiente cerrado que, a su vez, contenga el recipiente específico, tal como una Placa Petri, en el que se cultiva el microorganismo, preferiblemente en un medio sólido. El recipiente común de cultivo de la planta y el microorganismo puede ser un invernadero en el que, preferiblemente, las condiciones de humedad, temperatura e, incluso, velocidad de circulación del aire, están controladas artificialmente.

Dado que el procedimiento de la invención no requiere contacto entre el microorganismo y la planta, sino que son los volátiles emitidos por el microorganismo, no es necesario que el microorganismo y la planta se cultiven en proximidad, sino que la planta a su vez puede ser cultivada en presencia de los volátiles emitidos por el microorganismo sin necesidad de que éste esté localizado cerca de la planta. Así, es posible cultivar los microorganismos previamente, en el lugar y condiciones de cultivo que se elijan, recogiendo los volátiles emitidos para, posteriormente, hacer que la planta crezca en presencia de dichos volátiles, haciendo que estén presentes en la atmósfera en la que se cultiva la planta.

Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término “microorganismo” incluye bacterias, levaduras, algas y protozoos, todos ellos generalmente unicelulares, así como hongos microscópicos pluricelulares como los mohos, que pueden ser propagados y manipulados en un laboratorio.

El microorganismo utilizado puede pertenecer a una especie patógena o no patógena para la planta, que convive o no con la planta en condiciones naturales. Dicho microorganismo puede ser una bacteria, una levadura o un hongo microscópico. Dentro de ellos, se tiene particular preferencia por los hongos pertenecientes al género *Penicillium* (por ejemplo *Penicillium charesii*, *Penicillium aurantiogriseum*) o *Alternaria* (por ejemplo *Alternaria alternata*), por las levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* y por las bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus* (especialmente, *Bacillus subtilis* y, por ejemplo, *Bacillus subtilis* 168), *Salmonella* (por ejemplo, *Salmonella enterica* LT2), *Escherichia* (especialmente, *Escherichia coli* y, muy particularmente, *Escherichia coli* BW25113), *Agrobacterium* (especialmente, *Agrobacterium tumefaciens* y, muy particularmente, *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 ó GV2260) o *Pseudomonas* (especialmente, *Pseudomonas syringae* y, muy particularmente, *Pseudomonas syringae* 1448A9, 49a/90 ó PK2).

Tal como se ha comentado previamente, cuando el microorganismo se elige entre bacterias, puede elegirse de un género distinto a *Bacillus* o *Paenibacillus*, que son los géneros a los que pertenecen las cepas específicas de rizobacterias en las que previamente se había detectado un efecto positivo de sus emisiones de volátiles sobre el crecimiento de la planta al crecer en medios muy ricos: ambos géneros pueden excluirse del grupo de bacterias elegibles. En cualquier caso, se ha observado que los volátiles emitidos por bacterias pertenecientes a estos géneros, de cepas distintas de *Bacillus subtilis* GB03 y *Bacillus amyloliquefaciens* IN937, son capaces de producir el efecto de aumento del crecimiento de las plantas cuando las bacterias se cultivan en un medio que carece de compuestos orgánicos que poseen grupos amino, particularmente aminoácidos y/o proteínas, tales como medios mínimos suplementados con una fuente de carbono orgánico, produciendo también un incremento en la acumulación de almidón: ninguno de estos efectos eran esperables de los resultados previos obtenidos con volátiles de rizobacterias, que parecían indicar que el efecto sobre el crecimiento era exclusivo de los volátiles emitidos por ciertas cepas. La inducción de la acumulación de almidón, además, no había sido descrita previamente para mezclas de volátiles emitidas por microorganismos y, como se demuestra más adelante en los Ejemplos de la invención, se observa para todos los microorganismos con los que se realizaron experimentos: así, tal como se ha mencionado previamente, se considera que cualquier bacteria, hongo microscópico o levadura puede elegirse para llevar a efecto el aspecto del método de la invención referido específicamente a la acumulación de almidón, ya sea en plantas completas en crecimiento o en hojas desprendidas.

En cualquiera de los aspectos del método de la invención que no se refieren a la utilización específica de plantas transgénicas, se prefiere particularmente que el crecimiento del microorganismo se produzca en un medio que carezca de compuestos orgánicos que incluyan nitrógeno en su fórmula o, al menos, que carezca de compuestos orgánicos que presente grupos amino, tales como aminoácidos y/o proteínas. Se tiene muy especial preferencia por el cultivo en medio mínimo que contenga un compuesto orgánico como fuente de carbono, que puede ser, por ejemplo, sacarosa o glucosa u otros compuestos orgánicos tales como el succinato.

Entre las plantas, se prefieren las angiospermas (tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas), en las que se ha observado aumento del número de ramificaciones y del número de flores con respecto a las plantas control. Este efecto permite también que un aspecto más de la invención sea un método para inducir la floración y para aumentar el número de ramificaciones y/o de flores producidas por una planta, en el que el objetivo se consigue cultivando la planta en presencia de un microorganismo que produce compuestos volátiles, sin que exista contacto entre la planta y el microorganismo. Cuando el efecto buscado es el aumento del número de flores, la planta tendrá que ser, lógicamente, una planta capaz de producirlas: una angiosperma, tanto monocotiledónea como dicotiledónea.

La invención se explicará ahora con más detalle mediante los Ejemplos y Figuras que aparecen a continuación.

**Breve descripción de las figuras**

Fig. 1: Rutas sugeridas de síntesis de almidón en hojas de origen.

5 - El panel (A) ilustra el “modelo clásico”, según el cual el proceso de biosíntesis del almidón tiene lugar exclusivamente en el cloroplasto, separado del proceso de biosíntesis de sacarosa que tiene lugar en el citosol.

- El panel (B) ilustra el “modelo alternativo” en el que tanto la ruta biosintética de la sacarosa como la del almidón están interconectadas por medio de actividad productora de ADPG de SuSy (sacarosa sintasa).

10 Compuestos implicados: FBP: fructosa-1,6-bifosfato; F6P: fructosa-6-bifosfato; G6P: glucosa-6-fosfato; G1P: glucosa-1-fosfato; ADPG; ADP-glucosa; UDPG: UDP-glucosa. Actividades enzimáticas: 1, 1': fructosa-1,6-bifosfato aldolasa; 2, 2': fructosa-1,6-bifosfatasa; 3: PPI:fructosa-6-fosfato fosfotransferasa; 4, 4': fosfoglucosa isomerasa; 5, 5': fosfoglucomutasa; 6: UDPG pirofosforilasa; 7: sacarosa fosfato sintasa; 8: sacarosa-fosfato-fosfatasa; 9: AGP; 10: SS (almidón sintasa); 11: almidón fosforilasa; 12, SuSy (sacarosa sintasa).

Fig. 2: Condiciones de cultivo de plantas de *Arabidopsis* y efecto de los volátiles microbianos sobre las mismas.

20 - Paneles (A), (B), (C) y (D): Fotografías que ilustran las condiciones de cultivo de plantas de *Arabidopsis* en ausencia (A y C) y presencia (B y D) de volátiles microbianos. Para ver el efecto de los volátiles, placas Petri que contenían plantas completamente desarrolladas se introdujeron en cajas de plástico en las que previamente se habían incluido cultivos de *E. coli* BW25113 crecidos en medio sólido M9 suplementado con 50 mM glucosa (panel B) y *Alternaria alternata* crecida en medio sólido MS suplementado con 90 mM sacarosa (panel D). Las cajas se sellaron y, a los tiempos de incubación indicados, se recogieron las plantas para realizar los análisis.

25 Fig. 3: Efecto de los volátiles producidos por *Alternaria alternata* sobre el peso fresco (panel A), peso seco (panel B), número de flores (panel C), número de vainas (panel D), longitud del brote (panel E) y número de ramas (panel F) de *Arabidopsis*. Las fotografías de los paneles G y H ilustran el efecto positivo de los volátiles fúngicos (FVs) en el número de flores, vainas, longitud del brote y número de ramas en plantas expuestas durante 6 días a los FVs. *A. alternata* fue cultivada en medio MS sólido suplementado con 90 mM sacarosa.

Fig. 4: Condiciones de cultivo de plantas de tabaco y efecto de los volátiles microbianos sobre el desarrollo y crecimiento de las plantas:

35 - Panel A: Fotografías que ilustran las condiciones de cultivo de plantas de tabaco en ausencia (-FV) o en presencia (+FV) de volátiles fúngicos (FV) emitidos por un cultivo de *Alternaria alternata*. Las plantas se cultivaron durante 6 días, y se procedió a su comparación.

40 - Paneles B y C: Comparación de plantas de tabaco cultivadas en las mismas condiciones, salvo la ausencia (-FV) o presencia (+FV) del cultivo de *Alternaria alternata*. Se observa que las plantas crecidas en presencia de volátiles fúngicos emitidos por *A. alternata* son de mayor tamaño, hecho que se aprecia particularmente en las hojas e, incluso, presentan un número mayor de hojas (panel C). Además, se observa que las plantas tratadas con FVs florecen antes.

45 - Panel D: Fotografías en las que se muestran plantas de tabaco completas, incluidas las raíces, crecidas en ausencia (-FV) o presencia (+FV) del cultivo de *Alternaria alternata*. Se aprecia que el tamaño de la raíz es mayor en el caso de las plantas crecidas en condiciones +FV. *A. alternata* fue cultivada en medio MS sólido suplementado con 90 mM sacarosa.

50 Fig. 5. Efecto de los volátiles producidos por *Salmonella enterica* LT2 (panel A), las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* indicadas junto a las fotografías (EHA105 o GV2260) (panel B), o las cepas de *Pseudomonas syringae* 49a/90 y PK2 (panel C) sobre el crecimiento de *Arabidopsis*, según el medio de cultivo de la bacteria: medio mínimo (M9) o LB suplementados con 50 mM glucosa.

55 Se observa que las plantas de *Arabidopsis* crecidas en presencia de bacterias crecidas sobre medio LB presentan zonas amarillas (puntos más claros sobre las hojas) y menor tamaño y/o aspecto de estar enfermas.

Fig. 6: Efecto de los volátiles de especies microbianas en la acumulación de almidón en hojas de *Arabidopsis*.

60 - Panel A: contenido de almidón en hojas de plantas de *Arabidopsis* cultivadas 2 días en medio MS sólido suplementado con sacarosa 90 mM, en presencia o ausencia de: *Alternaria alternata*, *Penicillium charlessi*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Pseudomonas syringae* PK2, *Pseudomonas syringae* 49a/90, *Pseudomonas syringae* 1448A9, *A. tumefaciens* GV2260, *A. tumefaciens* EHA105, *E. coli* (BW25113), *Salmonella enterica* (LT2), *B. subtilis* 168, *Saccharomyces cerevisiae* NA33. Todos los microorganismos, excepto *S. cerevisiae*, *Penicillium aurantiogriseum*, y *Penicillium charlessi* se crecieron en medio sólido M9 suplementado con 50 mM glucosa. *P. aurantiogriseum*, *P. charlessi* y *A. alternata* se crecieron en MS sólido suplementado con 90 mM sacarosa.

## ES 2 372 071 A1

- Panel B: cuantificación del contenido de almidón en hojas de plantas de *Arabidopsis*, cultivadas en presencia de distintas bacterias y hongos según se indica bajo las barras correspondientes, barras que están agrupadas según el medio de cultivo del microorganismo: medio mínimo (M9) sólido suplementado con 90 mM glucosa (barras sin relleno) o LB sólido suplementado con 90 mM glucosa (barras con relleno oscuro). Se observa que el efecto positivo sobre el incremento de almidón sólo tiene lugar cuando los microorganismos crecen en medio mínimo.

- Panel C: contenido de almidón en hojas de plantas de *Arabidopsis* cultivadas en las mismas condiciones de cultivo que en el panel A, en presencia de carbón, un cultivo de *A. alternata*. *A. alternata* en presencia de carbón, o un cultivo inicial de *Alternaria* retirado durante los 3 días siguientes, según se indica bajo las barras. Se observa la disminución del efecto inductor en presencia de carbón y la desaparición del efecto tras 3 días fuera de contacto con los volátiles fúngicos. *A. alternata* fue cultivada en medio MS sólido suplementado con 90 mM sacarosa.

- Panel D: cuantificación del contenido de almidón en tallos de *Arabidopsis* crecidas en ausencia (-FV) o en presencia (+FV) de volátiles fúngicos producidos por *A. alternata*. Se observa un aumento muy fuerte del almidón en los tallos en condiciones +FV. *A. alternata* fue cultivada en medio MS sólido suplementado con 90 mM sacarosa.

- Panel E: contenido de almidón en raíces de *Arabidopsis* crecidas en ausencia ( $\emptyset$ ) o en presencia (+FV) de volátiles fúngicos producidos por *A. alternata*. Se observa también un fuerte aumento del almidón en las raíces en condiciones +FV. *A. alternata* fue cultivada en medio MS sólido suplementado con 90 mM sacarosa.

- Paneles F y G: comparación de la biomasa observada en hojas (primera barra de cada pareja, relleno punteado) y en raíces (segunda barra de cada pareja, relleno más oscuro continuo) de *Arabidopsis*, en ausencia (-FV) o en presencia (+FV) de volátiles fúngicos producidos por *A. alternata*. El efecto se observa tanto si se determina el peso fresco (panel F) como el peso seco (panel G). *A. alternata* fue cultivada en medio MS sólido suplementado con 90 mM sacarosa.

Fig. 7: Efecto de los volátiles fúngicos sobre plantas de maíz y *Arabidopsis* cultivadas en tierra.

- Panel A: Fotografías de plantas de maíz crecidas en tierra, en ausencia (-FV) o presencia durante 6 días (+FV) de volátiles fúngicos producidos por hongos *Alternaria alternata* cultivada en medio MS sólido suplementado con 90 mM sacarosa. Se observa que las plantas crecidas en presencia de volátiles son más robustas. Como se demuestran en el Panel B, acumulan más almidón.

- Panel B: Contenido de almidón, expresado en micromoles de glucosa por gramo de peso húmedo (FW), de las hojas de plantas de maíz del panel A. Control: plantas crecidas en ausencia de volátiles fúngicos; +Hongo: plantas crecidas en presencia durante 6 días de un cultivo de *A. alternata* que emite volátiles fúngicos.

- Panel C: Fotografías de plantas de *Arabidopsis* crecidas en tierra, en ausencia (-FV) o presencia (+FV) de volátiles fúngicos producidos por hongos *Alternaria alternata* cultivada en medio MS sólido suplementado con 90 mM sacarosa. Como se demuestran en el Panel D, acumulan más almidón.

- Panel D: Contenido de almidón, expresado en micromoles de glucosa por gramo de peso húmedo (FW), de las hojas de plantas de *Arabidopsis* del panel C. -FV: plantas crecidas en ausencia de volátiles fúngicos; +FV: plantas crecidas durante 6 días en presencia de un cultivo de *A. alternata* que emite volátiles fúngicos.

Fig. 8: Examen visual y microscópico de tejidos de plantas crecidas en ausencia o presencia de volátiles emitidos por *Alternaria alternata* cultivada en medio MS sólido suplementado con 90 mM sacarosa:

- Paneles A y B: tinción de yodo de plantas de *Arabidopsis* completas cultivadas en ausencia o en presencia de FVs, respectivamente.

- Paneles C y D: análisis de tinciones de yodo mediante microscopía óptica de cortes transversales de hojas de plantas cultivadas en ausencia o en presencia de FVs, respectivamente. Insertos: Patrón de intensidad de tinción y distribución de material positivo para yodo en células de mesófilo individuales.

- Paneles E, F, G: microscopía de barrido con láser confocal de hojas de plantas que expresan GBSS-GFP, cultivadas en ausencia (E) o presencia (F y G) de FVs.

Barra = 5  $\mu$ m en E, F, G; Barra = 100  $\mu$ m en C y D.

Fig. 9: Ubicuidad del efecto de los volátiles microbianos entre las plantas. Gráficos en los que se representa la cantidad de almidón (expresado como micromoles de glucosa por gramo de peso fresco del correspondiente extracto foliar) detectado en plantas de *Arabidopsis* (A), patata (B), maíz (C), cebada (D) y (E) tabaco cultivadas durante 3 días en medio MS sólido, con o sin sacarosa 90 mM, tal como se indica debajo de las barras, en presencia (barras con la leyenda "+FV") o en ausencia (barras con la leyenda "-FV") de volátiles emitidos por un cultivo de *A. alternata* crecido en medio MS sólido suplementado con 90 mM sacarosa.

Fig. 10: Gráficos en los que se representa la cantidad de almidón (expresado como micromoles de glucosa por gramo de peso fresco del correspondiente extracto vegetal) acumulado en tubérculos (panel A) y tallos (panel B) de plantas de patata cultivadas en medio MS sólido sin sacarosa en presencia o en ausencia de FVs emitidos por *A. alternata* cultivada en medio MS sólido suplementado con 90 mM sacarosa.

Fig. 11: Acumulación de almidón en hojas desprendidas de la planta promovida por volátiles fúngicos emitidos por un cultivo de *A. alternata* crecido en medio MS sólido suplementado con 90 mM sacarosa.

- Paneles A, B, C, D: Gráficos en los que se representa la cantidad de almidón (expresado como micromoles de glucosa por gramo de peso fresco del correspondiente extracto foliar) detectado en hojas de *Arabidopsis* (A), patata (B), maíz (C), cebada (D) mantenidas durante 2 días en medio MS sólido (con o sin sacarosa 90 mM, tal como se indica debajo de las barras), en presencia (barras con la leyenda "+FV") o en ausencia (barras con la leyenda "-FV") de volátiles emitidos por un cultivo de *A. alternata* crecido en medio MS sólido suplementado con 90 mM sacarosa.

- Panel E: Fotografías que ilustran las condiciones en las que se mantuvieron las hojas de plantas de patata en ausencia (columna con la etiqueta "-FV") o en presencia (columna con la etiqueta "+FV") de volátiles microbianos.

Fig. 12: Acumulación de almidón en hojas desprendidas de la planta cultivadas en superficie de papel mojada en MS líquido o en agua promovida por volátiles fúngicos emitidos por un cultivo de *A. alternata* crecido en medio MS sólido suplementado con 90 mM sacarosa.

- Panel A: Gráfico en el que se representa la cantidad de almidón (expresado como micromoles de glucosa por gramo de peso fresco del correspondiente extracto foliar) detectado en hojas de tabaco mantenidas durante 2 días en papel mojado en agua o en MS líquido (con o sin sacarosa 90 mM, tal como se indica debajo de las barras), en presencia (barras con la leyenda "+FV") o en ausencia (barras con la leyenda "-FV") de volátiles emitidos por un cultivo de *A. alternata*.

- Panel B: Fotografías que ilustran las condiciones en las que se mantuvieron las hojas de plantas de tabaco cultivadas en superficie de papel mojada en MS líquido o en agua en ausencia (columna con la etiqueta "-FV") o en presencia (columna con la etiqueta "+FV") de volátiles microbianos emitidos por *A. alternata*.

Fig. 13: Abundancia relativa, expresada como factor de variación, de los niveles de transcritos de los genes indicados en abscisas, medidos mediante real time (RT)-PCR cuantitativa, en hojas de plantas de patata cultivadas en presencia de volátiles fúngicos emitidos por *A. alternata* crecido en medio MS sólido suplementado con 90 mM sacarosa. Los factores de variación representados son relativos a las hojas control de plantas cultivadas en ausencia de FVs. Las plantas se cultivaron durante 3 días en presencia de FVs en medio MS sólido suplementado con sacarosa 90 mM, y se recogieron al final del período de luz. Los niveles de transcritos de SuSy (sacarosa sintasa) y del translocador de glucosa-6-P se midieron tanto en presencia (+sac) como en ausencia (-sac) de sacarosa.

Fig. 14: Categorización funcional de los transcritos diferencialmente expresados en hojas de patata cultivadas en MS suplementado (panel A) o no (panel B) con sacarosa 90 mM en presencia de volátiles fúngicos emitidos por *A. alternata* crecido en medio MS sólido suplementado con 90 mM sacarosa. Los transcritos se identificaron usando el array de oligos 60-méros POCI 44K (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/poci>). Los transcritos regulados significativamente al alza y a la baja (diferencia de 2,5 veces en plantas cultivadas con sacarosa y diferencia de 1,9 veces en plantas cultivadas sin sacarosa) comparados con los controles, se clasificaron según su categoría funcional teórica según el software MapMan. Dicha categoría se indica bajo el eje de abscisas. En ordenadas se indica el número de genes desregulados en cada grupo categórico. Los genes regulados al alza aparecen en barras con relleno más claro y los genes regulados a la baja aparecen en barras con relleno más oscura. Los genes de la categoría "ningún efecto encontrado" no se incluyeron en el gráfico.

Fig. 15: Análisis de AGP en transferencias tipo Western de hojas de plantas de patata, en condiciones no reductoras (sin ditioneitol 10 mM: -DTT) y reductoras (con ditioneitol 10 mM: + DTT). Las plantas completas se cultivaron durante 3 días en medio MS sólido suplementado con sacarosa 90 mM en presencia ("FV") o en ausencia ("-FV") de volátiles emitidos por *A. alternata* crecido en medio MS sólido suplementado con 90 mM sacarosa.

Fig. 16: Gráficos en los que se demuestra que los cambios en la actividad AGP juegan un papel menor en la acumulación de almidón inducida por volátiles en hojas de patata: (A) actividad AGP, (B) contenido de almidón, y (C) contenido de ADPG en hojas de plantas tipo silvestre (WT) y AGP62 (plantas antisentido de la subunidad pequeña de la ADPG pirofosforilasa) cultivadas en presencia ("FV") y en ausencia ("-FV") de volátiles emitidos por *A. alternata* crecido en medio MS sólido suplementado con 90 mM sacarosa. Las plantas completas se cultivaron durante 3 días en medio MS sólido suplementado con sacarosa 90 mM.

Fig. 17: Gráficos en los que se representa, en hojas de patata cultivadas en presencia (+FV) o en ausencia (-FV) de volátiles fúngicos emitidos por *Alternaria alternata* crecido en medio MS sólido suplementado con 90 mM sacarosa: la actividad de SuSy productora de ADPG (panel A), y los contenidos intracelulares de almidón (panel B), ADPG (panel C) y UDPG (panel D), todo ello expresado con referencia a los gramos de peso fresco. Se observa correlación entre la actividad de SuSy (sacarosa sintasa) y los contenidos de los otros compuestos.

Fig. 18: Análisis de SuSy en transferencias tipo Western en hojas de plantas de patata cultivadas en presencia (A) y ausencia (B) de sacarosa tratadas y no tratadas con FVs emitidos por *A. alternata* crecido en medio MS sólido suplementado con 90 mM sacarosa.

5 Fig. 19: Gráfico donde se representa el contenido de almidón (expresado como  $\mu$ moles de glucosa por gramo de peso fresco) medido en plantas de patata cultivadas durante 2 días en MS suplementado con sacarosa 90 mM y las concentraciones indicadas de cisteína, glicina, serina y metionina en ausencia (-FV) o en presencia (+FV) de volátiles emitidos por *A. alternata* crecido en medio MS sólido suplementado con 90 mM sacarosa.

10 Fig. 20: Los volátiles fúngicos promueven tanto la reducción del contenido de amilosa como cambios en la composición de la amilopectina.

- Panel (A): Porcentaje de amilosa respecto a la amilopectina en hojas de plantas de patata cultivadas en presencia (+FV) y ausencia (-FV) de volátiles fúngicos emitidos por *A. alternata* crecido en medio MS sólido suplementado con 15 90 mM sacarosa.

- Panel (B): Perfiles de distribución de longitudes de cadena (grado de polimerización: GP) en amilopectina desramificada purificada a partir de hojas de plantas de patata cultivadas en presencia y ausencia de FVs (barras negras y 20 blancas, respectivamente).

- Panel (C): Diferencia entre las distribuciones de longitudes de cadena de amilopectina desramificada purificada de hojas cultivadas en presencia y en ausencia de volátiles fúngicos emitidos por *A. alternata* crecido en medio MS sólido suplementado con 90 mM sacarosa, calculado como la diferencia entre el perfil en presencia de FVs menos el 25 perfil en ausencia de FVs.

Fig. 21: Representación esquemática de las principales rutas de metabolismo de hidratos de carbono que se producen durante el MIVOISAP según la visión alternativa de la biosíntesis del almidón. El panel A representa las situaciones que es probable que se den cuando las plantas se cultivan en condiciones heterotróficas, mientras que el panel B representa situaciones que es probable que se den cuando las plantas se cultivan en condiciones autotróficas. Los 30 cambios en la expresión de genes que codifican enzimas principales del metabolismo de hidratos de carbono se indican mediante variaciones en la escala de grises y en la continuidad de las líneas (líneas grises discontinuas, incremento; líneas grises continuas, disminución; líneas negras, sin diferencias significativas).

### 35 Ejemplos

Los Ejemplos de la presente solicitud incluyen ensayos realizados con los siguientes materiales y técnicas metodológicas:

40 - *Plantas, cultivos microbianos, condiciones de crecimiento y obtención de muestras*

Este trabajo se llevó a cabo utilizando plantas de *Arabidopsis thaliana* (cv. Columbia), patata (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée), tabaco (*Nicotiana tabacum*), maíz (*Zea mays*, cv. Hill), cebada (*Hordeum vulgare* cv. Golden promise) 45 cultivadas en placas Petri que contenían medio MS sólido con o sin sacarosa 90 mM y la suplementación con aminoácidos indicada. Las plantas se hicieron crecer en cámaras de crecimiento con un fotoperíodo de 16 h de luz ( $300 \mu\text{mol}$  fotones  $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) y a una temperatura constante de 24°C.

*E. coli* BW25113, *A. tumefaciens* EHA105 y GV2260, *Salmonella enterica* LT2, *Bacillus subtilis* 168 (*Bacillus* 50 Genetic Stock Center, Ohio State University, Columbus) y *Pseudomonas syringae* 1448A9, 49a/90 y PK2 se cultivaron en placas Petri que contenían medio mínimo M9 sólido (95 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ /44 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /17 mM NaCl/37 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ /0,1 mM  $\text{CaCl}_2$ /2 mM  $\text{MgSO}_4$ , agar bacteriológico al 1,5%) suplementado con glucosa 50 mM. *S. cerevisiae* NA33 se cultivaron en placas que contenían medio sólido LB (triptona al 1%, NaCl al 1%, extracto de levaduras al 0,5% y agar bacteriológico al 1,5%) suplementado con glucosa 50 mM. Las colonias de *Penicillium chartesii* y 55 *Penicillium aurantiogriseum* o de *Alternaria alternata* se cultivaron en placas Petri que contenían medio MS sólido suplementado con sacarosa 90 mM.

Los cultivos microbianos se colocaron en cajas de plástico estériles y se sellaron. Después de dos días, las placas Petri que contenían plantas completamente desarrolladas se colocaron en cajas que contenían cultivos microbianos, 60 tal como se ilustra en la Fig. 2. Las cajas se sellaron y las hojas se recogieron tras los tiempos de incubación indicados para realizar los análisis bioquímicos y de transcriptomas. A menos que se indique de otra manera, las hojas se recogieron al final de período de luz. Como control negativo, las placas Petri que contenían plantas completamente desarrolladas se cultivaron en cajas de plástico selladas junto con placas Petri que poseían medio estéril para el cultivo de microorganismos.

65

## ES 2 372 071 A1

### - Análisis de transferencias tipo Western

Para producir antisueros policlonales contra Sus4, un cDNA codificante de Sus4 de longitud completa se clonó en el vector de expresión pET-28b(+) (Novagen) para crear pET-SuSy. Las células BL21(DE3) transformadas con pET-SuSy se hicieron crecer en 100 ml de medio LB líquido hasta una absorbancia a 600 nm de 0,5 y luego se añadió isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido 1 mM. Pasadas 5 h, las células se centrifugaron a 6.000 x g durante 10 min. Las bacterias sedimentadas se resuspendieron en 6 ml de tampón de unión His-bind (Novagen), tratado con ultrasonidos y centrifugado a 10.000 x g durante 10 min. El sobrenadante así obtenido se sometió a cromatografía en His-bind (Novagen). La Sus4 etiquetada con His eluida se desaló rápidamente mediante ultracentrifugación en una Centricon YM-10 (Aicon, Bedford, MA). La proteína purificada se separó electroforéticamente mediante PAGE preparativa con SDS al 12% y se tiñó con Azul de Coomassie. Una banda de proteínas de aproximadamente. 90 kDa se eluyó y se utilizó para producir antisueros policlonales inmunizando conejos.

Para los análisis de inmunotransferencias, las muestras de proteínas se separaron en PAGE con SDS al 10%, se transfirieron a filtros de nitrocelulosa, y se inmunodecoraron utilizando antisueros obtenidos frente a AGP de maíz o SuSy de patata como anticuerpo primario, y una IgG de cabra anti-conejo conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma) como anticuerpo secundario. En el caso de las transferencias tipo Western de AGP, las muestras se extrajeron y se separaron en SDS-PAGE en condiciones reductoras/no reductoras esencialmente como ha sido descrito por Kolbe *et al.* (Kolbe *et al.*, 2005: Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11118-11123).

### - Ensayos enzimáticos

1 g de polvo congelado de hoja se resuspendió a 4°C en 5 ml de HEPES 100 mM (pH 7,5) y EDTA 2 mM. Cuando se indicó así, se añadió DTT 5 mM al tampón de extracción. La suspensión se desaló y se ensayaron en ella las actividades enzimáticas. El ensayo de las actividades AGP, SuSy, invertasa ácida, PPasa y SS total se realizó tal como ha sido descrito por Baroja-Fernández *et al.* (Baroja Fernández *et al.*, 2009: Enhancing sucrose synthase activity in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers results in increased levels of starch, ADPglucose and UDPglucose and total yield, Plant Cell Physiol. 50: 1651-1662). El ensayo de la  $\beta$ -amilasa se realizó como ha sido descrito por Liu *et al.* (Liu *et al.*, 2005: Toxicity of arsenate and arsenite on germination, seedling growth and amylolytic activity of wheat, Chemosphere 61: 293-301). La actividad SBE se midió como la disminución en la absorbancia del complejo amilosa-yodo tal como ha sido descrito por Vos-Scheperkeuter *et al.* (Vos-Scheperkeuter *et al.*, 1989: Immunological comparison of the Starch Branching Enzymes for potato tubers and Maize leaves, Plant Physiol. 90: 75-84). La nitrito reductasa se midió siguiendo el método descrito por Rao *et al.* (Rao *et al.*, 1981: Phytochrome regulation of nitrite reductase- a chloroplast enzyme- in etiolated maize leaves, Plant Cell Physiol, 22: 577-582). La pG6PDH se midió según Hauschild *et al.* (Hauschild *et al.*, 2003: Differential regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase isozyme activities in potato, Plant Physiol. 133: 47-62). El ensayo de la fructosa-1,6-bisfosfatasa citosólica se realizó tal como ha sido descrito por Lee and Hahn (Lee and Hahn, 2003: Light-regulated differential expression of pea chloroplast and cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase, Plant Cell Rep. 21:611-618). Una unidad (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la producción de 1  $\mu$ mol de producto por min.

### - Determinación de ADPG, UDPG y 3-fosfoglicerato

Una alícuota de 0,5 g del tejido vegetal pulverizado congelado en nitrógeno líquido se resuspendió en 4 ml de HClO<sub>4</sub> 1,0 M, se dejó a 4°C durante 2 h y se centrifugó a 10.000 g durante 5 min. El sobrenadante se neutralizó con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5 M, se centrifugó a 10.000 g y se sometió a análisis de medida de los nucleótido-azúcares tal como ha sido descrito por Muñoz *et al.* (Muñoz *et al.*, 2005: Sucrose synthase controls the intracellular levels of ADPglucose linked to transitory starch biosynthesis in source leaves, Plant Cell Physiol. 46: 1366-1376) por HPLC en un sistema obtenido de P. E. Waters and Associates acoplado a una columna Partisil-10-SAX. El 3-fosfoglicerato se midió como ha sido descrito por Muñoz *et al.* (Muñoz *et al.*, 2005: Sucrose synthase controls the intracellular levels of ADPglucose linked to transitory starch biosynthesis in source leaves, Plant Cell Physiol. 46: 1366-1376).

### - Procedimientos analíticos

El almidón se midió utilizando un kit de ensayo basado en la amiloglucosidasa (Boehringer Mannheim, Alemania). El contenido de amilosa del almidón se midió yodométricamente según Hovenkamp-Hermelink *et al.* (Hovenkamp-Hermelink *et al.*, 1988: Rapid estimation of the amylose/amylopectin ratio in small amounts of tuber and leaf tissue of the potato Potato Res. 31: 241-246). El análisis de la distribución de cadenas laterales del almidón aislado se llevó a cabo mediante HPAEC-PAD esencialmente como ha sido descrito por Abel *et al.* (Abel *et al.*, 1996: Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a novel 139 kDa starch synthase from potato (*Solanum tuberosum* L.), Plant J. 10: 981-991) utilizando un sistema DX-500 (Dionex) acoplado a una columna CarboPac PA 10.

- *Microarrays*

El RNA total se extrajo de hojas de patata congeladas utilizando el método del Trizol siguiendo el procedimiento del fabricante (Invitrogen), seguido por la purificación con el kit RNeasy (Qiagen). La amplificación, marcado y análisis de datos estadísticos relativos al RNA se llevaron a cabo básicamente como ha sido descrito por Adié *et al.* (Adié *et al.*, 2007: ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*, Plant Cell 19: 1665-1681). Para la hibridación se utilizaron portaobjetos con microarrays Agilent POCI 4 x 44 (015425) que contienen 246.000 etiquetas de secuencia expresadas que corresponden a 46.345 unigenes (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/poci>) (Kloosterman *et al.* 2008: Genes driving potato tuber initiation and growth: identification based on transcriptomal changes using the POCI array, Funct Integr. Genomics 8: 329-340). Las condiciones de mareaje e hibridación fueron las descritas en “The manual two color microarray based gene expression Analysis” (“El manual del análisis de la expresión de genes basado en microarrays de dos colores”) de Agilent Technologies. Para las hojas de las plantas tratadas con microorganismos y de las plantas control se hibridaron tres réplicas biológicas independientes. Las imágenes de los canales Cy3 e Hyper5 se equilibraron con respecto a las diferencias en la intensidad y se capturaron con un escáner GenePix 4000B (Axon). Los puntos se cuantificaron utilizando el software GenPix (Axon) y se normalizaron utilizando el método de Lowess. Se calcularon las medias de los logaritmos de las relaciones de intensidades para las tres réplicas y sus desviaciones estándar y los datos de expresión se analizaron estadísticamente utilizando el paquete informático LIMMA (Smyth and Speed, 2003: Normalization of cDNA microarray data, Methods 31: 265-273). La caracterización funcional de los genes diferencialmente expresados se hizo utilizando la herramienta Mapman (<http://gabi.rzpd.de/projects/MapMan/>).

- *PCR cuantitativa en Tiempo Real*

El RNA total se extrajo de las hojas de patata como se hizo para los experimentos de microarrays. El RNA se trató con DNAsa libre de RNAasas (Takara). Se realizó la transcripción inversa de 1,5  $\mu\text{g}$  de RNA utilizando cebadores de poliT y el kit Expand Reverse Transcriptase (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción de RT-PCR se llevó a cabo utilizando un sistema detector de secuencias 7900HT (Applied Biosystems) con el SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) según el protocolo del fabricante. Cada reacción se llevó a cabo por triplicado con 0,4  $\mu\text{L}$  de la primera cadena de cDNA en un volumen total de 20  $\mu\text{L}$ . La especificidad de la amplificación por PCR se comprobó con una curva de calor de disociación (de 60°C a 95°C). Los valores comparativos del umbral se normalizaron con respecto a un control interno de RNA 18S y se compararon para obtener niveles relativos de expresión. La especificidad de los productos de RT-PCR obtenidos se controló en geles de agarosa al 1,8%. Los cebadores utilizados para las RT-PCRs se enumeran a continuación en la Tabla 1:

TABLA 1

*Cebadores de PCR cuantitativa en Tiempo Real*

Proteína codificada	Cebadores utilizados	SEQ ID NO:
SNF4	Directo: CCCCGTAGATCTCAGAAGCA	1
	Inverso: CAGCGTGGCTGTATATGGAA	2
1-fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinasa	Directo: ACACAAGAAGTGGGGAATGG	3
	Inverso: TTTTCTGCTGCCTTCCTAGC	4
Pululanasa	Directo: GCGTAAACAATACCGCCAGT	5
	Inverso: CAGGTCAAACCGAAATCCAT	6
Translocador de Triosa-fosfato / 3-fosfoglicerato	Directo: CAAGATTTCCCCATTGCTA	7
	Inverso: TTCCAACCGCATGTGTAAGA	8
Transportador de nitrito	Directo: CAAATACCTCCAGCCAGCAT	9
	Inverso: TGTGAATCGACGAGCAAAG	10
Trehalosa-6-fosfato sintasa	Directo: CGATTTTCAGTGGATGCAGA	11
	Inverso: GATGATGCCAAACAAGAGCA	12
Fosforilasa del almidón (isoforma plastidial)	Directo: AACCAAGTGGACAGGATCTGA	13
	Inverso: CTTTTGCCTTCCTCCACTCA	14

ES 2 372 071 A1

<b>Proteína codificada</b>	<b>Cebadores utilizados</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
β-amilasa BMYI	Directo: GAGGTAACACGAGGCTTCCA	15
	Inverso: CACAACCTGCAACCTCTGCAT	16
Tiorredoxina M4	Directo: AAGTTACCCGTCCTGGTTGA	17
	Inverso: ACTTGCCAGCGTATTCCTGT	18
Nitrito reductasa	Directo: TGCAGACATTGGATTCATGG	19
	Inverso: CTCCCAAATGTGAATCACTCC	20
Cisteína sintasa	Directo: TGCCTGCATCAATGAGTCTT	21
	Inverso: CAGCCTTTGAAACAGCTCCT	22
Pirofosfatasa inorgánica	Directo: ACAGCCGAAACCCTAGATT	23
	Inverso: TGAAAACACCATCACCCAAA	24
Invertasa ácida	Directo: AATGGAGCAGCACGACTCTT	25
	Inverso: AGTCTTGCAAGGGGAAGGAT	26
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (isoforma plastidial)	Directo: CGAGGAGGGTACTTTGACCA	27
	Inverso: CAAGCTGACAGGTGTTTCCA	28
Almidón sintasa III	Directo: CGAAAGGGTGCATATATGGT	29
	Inverso: TCCGGACTAAATCCACCTTG	30
Inositol-3-fosfato sintasa	Directo: CAAGAGGGCAATGGATGAGT	31
	Inverso: ATTGGAGCAGCCAAAAGAGA	32
Fructosa-2,6-bifosfatasa	Directo: TGGGACAGATGGCACTATCA	33
	Inverso: ATCCGGGACAATTACTTCCA	34
RNA 18S	Directo: GGGCATTCGTATTTTCATAGTCAGAG	35
	Inverso: CGGTTCTTGATTAATGAAAACATCCT	36
Translocador de glucosa-6-fosfato	Directo: TGACTIONGAGATGGATGTGGA	37
	Inverso: GATGGGAATTGCAGCTAGGA	38
Inhibidor de proteasas I	Directo: TGAAACTCTCATGGCACGAA	39
	Inverso: TGGCCAGCTTAGTTTTCCAT	40
Enzima ramificante del α-glucano	Directo: AATTTGGTGGCCATGGAAG	41
	Inverso: AGGAATTTGGACGACCATTG	42
ADP-glucosa pirofosforilasa L3	Directo: CAGGTGAGGCTAAGTTGAAGG	43
	Inverso: GAGGGGGAAAAGACGAGTTC	44
ADP-glucosa pirofosforilasa L1	Directo: GGTGAAAGATCGCGCTTAGA	45
	Inverso: CTGCTAACAGGGAGGCAATC	46
Inhibidor de invertasa de tubérculo tipo Kunitz	Directo: AAACCTTCAATGCCCAAATG	47
	Inverso: ATTCCGACTCCGACTTACGA	48
Sacarosa sintasa 4	Directo: TGGGAATACATCCGTGTGAA	49
	Inverso: GCTCCGTCGACAAGTTCTTC	50
Chaperona tipo dnaK Hsc70	Directo: TGCAAGCTGCAATCTTGAGT	51



Proteína codificada	Cebadores utilizados	SEQ ID NO:
	Inverso: ACACCTCCAGCAGTCTCCAG	52
Almidón sintasa IV	Directo: CATCGTCTCTTGCGCCTAAT	53
	Inverso: ATGGCCTTACTGCTGACGTT	54
Proteína RSH4 similar a Real-SpoT	Directo: ACAAGGGCGGTGTTACTGAT	55
	Inverso: TCGCCGAAGGAAAATCTCTA	56
Sedoheptulosa-1,7-bifosfatasa	Directo: GAACCATCTTTGGCGTATGG	57
	Inverso: CATATGTAGTTCGCGGTCCA	58
Fructosa-bifosfato aldolasa	Directo: GGAAAGGTATTTTGGCAGCA	59
	Inverso: GTTGACGAAGTGCTTGACGA	60
Fructosa-1,6-bifosfatasa cloroplástica	Directo: TTCGATGGCTTGTAAGCAGA	61
	Inverso: TTTTGGTCCTCTCCATGAGC	62
Fructosa-1,6-bifosfatasa citosólica	Directo: TATCCCGCTGATGGTTCTTC	63
	Inverso: CTCCGGGGTACAAGAAGATG	64
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (isoforma plastidial)	Directo: CACACCGTGACTTGAGGAGA	65
	Inverso: CCCTTGAGCTGAGGTAGCAC	66

#### - Tinción de yodo y localización microscópica de gránulos de almidón

Las hojas recogidas al final del período de luz se fijaron por inmersión en formaldehído al 3,7% en tampón fosfato. Luego se retiraron los pigmentos foliares con etanol al 96%. Las muestras rehidratadas se tiñeron con solución de yodo (KI 2% (w/v) 12 1% (w/v)) durante 30 min, se sumergieron rápidamente en agua desionizada y se fotografiaron. Las hojas para la observación microscópica de almidón se montaron en portaobjetos de microscopio y se examinaron mediante microscopía confocal utilizando láser de excitación de Ar 488. Las muestras de las que se iban a obtener secciones se sumergieron en medio crioprotector OCT (Tissue-Tec, USA) y se congelaron a -50°C. Se obtuvieron criosecciones de 10 µm de espesor en un criotomo AS620 (Shandon, Inglaterra). Después de descongelarlas, las secciones se tiñeron con solución de yodo durante 2 min a temperatura ambiente, se montaron en portaobjetos de microscopio y se observaron utilizando un estereomicroscopio Olympus MVX10 (Japón). Las microfotografías se capturaron con una vídeo-cámara DP72 (Olympus, Japón) y el software Cell D (Olympus, Japón).

#### - Microscopía confocal

La localización subcelular de GBSS-GFP se efectuó utilizando un microscopio confocal D-Eclipse C1 (NIKON, Japón) equipado con un láser de excitación de Ar 488 estándar, un filtro BA515/30 para la emisión en verde, un filtro BA650LP para la emisión en rojo y un detector de luz transmitida para las imágenes de campo brillante.

#### - Ejemplo 1

*Los volátiles emitidos por diferentes especies microbianas promueven cambios en el desarrollo de la planta, aumento del crecimiento y la acumulación de almidón en hojas de diferentes especies de plantas*

##### 1.1. Efecto sobre el crecimiento

Para comprobar los posibles efectos que los compuestos químicos volátiles liberados por microorganismos pudieran tener sobre el metabolismo de las plantas, se realizaron en primer lugar ensayos con plantas de *Arabidopsis* cultivadas en medio MS en presencia o ausencia de cultivos de *Escherichia coli* BW25113, *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 y GV2260, *Saccharomyces cerevisiae* NA33, *Bacillus subtilis* 168, *Penicillium charlesii* o *Penicillium aurantiogriseum*, *Salmonella enterica* LT2, *Alternaria alternata*, *Pseudomonas syringae* 1448A9, 49a/90 ó PK2 y en ausencia de contacto físico entre la planta y el medio de cultivo. La disposición, en todos los casos, fue análoga a la de las fotografías de los paneles B y D de la Fig. 2, incluyendo controles con placas con medio de cultivo en las que no se habían sembrado microorganismos de forma análoga a la que se presentan en los paneles A y C de la Fig. 2.

Los análisis visuales preliminares revelaron que los volátiles emitidos por estos microorganismos promueven el crecimiento de la planta, tal como puede observarse comparando los cuatro primeros paneles de la Fig. 2. Este efecto se confirmó comprobando el peso fresco y seco de las plantas de *Arabidopsis* crecidas en ausencia o en presencia de volátiles emitidos por hongos *Alternaria alternata*, así como otros parámetros relacionados con el desarrollo de las plantas tales como el número de flores, ramas o vainas o la altura del brote. Tal como puede observarse en la Fig. 3, todos estos parámetros se vieron incrementados por el efecto de los volátiles, efecto que también se observó sobre el contenido de almidón.

Este efecto no es exclusivo de plantas de *Arabidopsis*, sino que se observa en otras especies, como en las plantas del tabaco, como puede observarse en la Fig. 4, en la que las plantas sometidas al efecto de volátiles emitidos por hongos *Alternaria alternata* muestran mayor tamaño y mayor número de hojas. También las raíces de las plantas de tabaco crecieron más en presencia de volátiles de *Alternaria alternata*.

En el caso concreto de algunos microorganismos, como *E. coli*, que esta bacteria promueva el crecimiento de plantas parece contradecir las observaciones hechas por Ryu *et al.* (Ryu *et al.* 2003: Bacterial volátiles promote growth in *Arabidopsis*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 4927-4932), quienes mostraron que *E. coli* DH5 $\alpha$  no promueve el crecimiento de plantas de *Arabidopsis*. Además, estos autores mostraron que los volátiles emitidos por *Pseudomonas syringae* ejercen un efecto negativo sobre el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis*. Por ello, se pensó que las variaciones en las condiciones de crecimiento y sistemas de ensayo podrían justificar los diferentes resultados. En concreto, se planteó si los resultados obtenidos en *Arabidopsis* por otros autores podrían deberse al uso de medios que contengan extractos de levadura, ricos en aminoácidos, tales como los medios LB o Kornberg, mientras que el crecimiento de microorganismos en medio mínimo podría dar lugar a que no se produjera algún metabolito volátil nocivo para la planta.

Para comprobar esta hipótesis, se repitió el ensayo, utilizando *Salmonella enterica* como microorganismo, cultivándolo o en medio mínimo M9 o en medio LB. Los resultados, mostrados en la Fig 5A, muestran que los volátiles producidos por *Salmonella enterica* crecida en LB hacen que las plantas se pongan amarillas y enfermen, mientras que, si se comparan las plantas de *Arabidopsis* crecidas en medio mínimo M9 con las plantas control mantenidas en idénticas condiciones, pero sin que se haya sembrado microorganismo alguna en la correspondiente placa Petri, se observa que las plantas crecidas en presencia del microorganismo son mayores y presentan mayor número de hojas.

Similares resultados se obtuvieron con otros patógenos de plantas, tales como *Agrobacterium tumefaciens*, tanto con la cepa EHA105 como GV2260 (véase la Fig. 5B) o *Pseudomonas syringae* (véase la Fig. 5C): el efecto positivo sobre el crecimiento tiene lugar siempre y cuando el patógeno crezca en un medio mínimo, tal como M9 o MOPS, que presentan en su composición sales inorgánicas como fuentes de Na, K, Ca, Mg, P, N y S y que, salvo el azúcar utilizado como suplemento fuente de carbono (sacarosa o glucosa en los Ejemplos de la presente solicitud) y el propio agar bacteriológico, carecen de otros compuestos orgánicos, en particular de compuestos que contengan nitrógeno orgánico. Los volátiles emitidos por microorganismos crecidos en medios tales como LB, Kornberg o cualquier otro medio que contenga un hidrolizado de levaduras, proteínas, o que sea rico en aminoácidos, ejercen un efecto negativo (o no tan positivo como el observado cuando se crecen en medios mínimos) sobre el crecimiento y producción de almidón en la planta, de manera que las plantas expuestas a tales volátiles desarrollan hojas blancas y, finalmente, mueren. Todo ello es debido, probablemente, al efecto tóxico del amonio producido por la deaminación de los aminoácidos existentes en el medio.

## 1.2. Efecto sobre la acumulación de almidón

A continuación, se midió el contenido de almidón de las hojas de las plantas de *Arabidopsis*, que habían sido cultivadas en medio MS en presencia o ausencia de cultivos de *S. cerevisiae* NA33, *B. subtilis* 168, *Salmonella enterica* (LT2), *E. coli* (BW25113), *A. tumefaciens* EHA105, *A. tumefaciens* GV2260, *Pseudomonas syringae* 1448A9, *Pseudomonas syringae* 49a/90, *Pseudomonas syringae* PK2, *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium charlessii* y *Alternaria alternata*. Todos los microorganismos, excepto *S. cerevisiae*, se crecieron en medio sólido M9 suplementado con glucosa. Todos, a su vez, crecieron en ausencia de contacto físico entre la planta y el medio de cultivo.

Los resultados obtenidos muestran que todas las especies microbianas ensayadas emitían compuestos volátiles que afectaban favorablemente a la acumulación de almidón, tal como se confirmó mediante análisis de medida cuantitativa del almidón utilizando un kit de ensayo basado en amilogucosidasa/hexoquinasa/glucosa-6P deshidrogenasa (Fig. 6A). Tal como se pueden observar en la Fig. 6C, este efecto se debe a los volátiles ya que (a) el efecto inductor es inferior en presencia de carbón activado y (b) el efecto desaparece tras 3 días fuera de contacto con el volátil.

También se comprobó la diferencia en la acumulación de almidón cuando los microorganismos *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Penicillium charlessii*, *E. coli* y *Salmonella enterica* se cultivaron bien en medio mínimo M9, bien medio LB. Tal como puede comprobarse en la Fig. 6B, el efecto "positivo" de los microorganismos sobre la acumulación de almidón sólo tiene lugar cuando éstos son crecidos en un medio mínimo (M9, MOPS o incuso MS), mientras que el efecto es inferior o nulo cuando los microorganismos crecen en un medio rico con aminoácidos.

Adicionalmente, se comprobó que la acumulación de almidón también se producía en otros órganos de las plantas de *Arabidopsis*, tales como el tallo o las raíces, cuando las mismas se hacían crecer en presencia de volátiles fúngicos emitidos por hongos *Alternaria alternata*. Las muestras de la acumulación en estos tejidos pueden observarse en los paneles D y E de la Fig. 6. Los paneles F y G muestran el incremento en la acumulación de biomasa producida por los volátiles fúngicos tanto en hojas como en raíces.

El efecto de acumulación de almidón no es exclusivo de plantas de *Arabidopsis*. Además, el efecto positivo se confirma si las plantas se crecen sobre tierra en lugar de en placas de cultivo *in vitro*: los ensayos realizados con plantas de maíz y *Arabidopsis* crecidas en tierra muestran un aumento del tamaño y vigor de las hojas cuando crecen en presencia de volátiles fúngicos emitidos por hongos *Alternaria alternata* (Fig. 7A y 7C), efecto positivo que se refleja también en un aumento en la acumulación de almidón (Fig. 7B y 7D).

Para confirmar que lo se estaba midiendo era realmente almidón, los autores de la invención caracterizaron hojas que habían sido teñidas previamente con soluciones de yodo. Además, se llevó a cabo análisis de microscopía de fluorescencia confocal de plantas que expresaban la sintasa de almidón unida al gránulo (GBSS) de *Arabidopsis* fusionada con la proteína de fluorescencia verde (GFP) (Szydłowski *et al.*, 2009: Starch granule initiation in *Arabidopsis* requires the presence of either class IV or class III starch synthase, *Plant Cell* 21, 2443-2457) cultivadas en presencia y en ausencia de FVs (volátiles fúngicos) emitidos por *Alternaria alternata*. Tal como se muestra en las Fig. 8A y 8B, estos análisis revelaron que la tinción con yodo de hojas de plantas cultivadas en presencia de FVs fue mucho más oscura que la de las plantas control. Los análisis de microscopía óptica (Fig. 8C y 8D) de secciones de hojas demostraron que la tinción de yodo se localizaba dentro de cloroplastos de células del mesófilo. Además, los análisis de microscopía de barrido con láser confocal de hojas transgénicas que expresaban el marcador de gránulos de almidón GBSS-GFP demostraron que los gránulos de almidón eran mucho mayores cuando las plantas se cultivaban en presencia de FVs que en las condiciones control (Fig. 8E, 8F y 8G). Estos análisis demuestran que el incremento del contenido de almidón no es debido al incremento del número de gránulos por plastidio, sino al espectacular incremento de tamaño de los gránulos de almidón.

Se confirmó si la existencia del proceso de acumulación de almidón inducido por volátiles microbianos (**microbial volátiles induced starch accumulation process: MIVOISAP**) estaba extendida en las plantas midiendo el contenido de almidón en hojas de plantas de *Arabidopsis*, patata (*Solanum tuberosum* L.), maíz (*Zea mays*), tabaco (*Nicotiana tabacum*) y cebada (*Hordeum vulgare*) cultivadas en presencia o en ausencia de FVs emitidos por *Alternaria alternata*. Estos experimentos se llevaron a cabo utilizando plantas cultivadas en medio MS sólido con o sin suplementación con sacarosa 90 mM. Tal como se muestra en la Fig. 9, estos análisis revelaron que, independientemente de la presencia de sacarosa en el medio de cultivo, el contenido de almidón en las hojas de las cinco especies fue mayor en exceso cuando las plantas se crecieron en presencia de FVs con respecto a la ausencia de FVs. Merece destacarse que los niveles de almidón en las plantas de patata cultivadas en presencia de FVs (aproximadamente 500-600  $\mu\text{mol}$  glucosa/g de peso fresco) eran comparables a los que se conocen para los tubérculos de patata (Baroja-Fernández *et al.*, 2009: Enhancing sucrose synthase activity in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers results in increased levels of starch, ADPglucose and UDPglucose and total yield. *Plant Cell Physiol.* 50, 1651-1662). Además, tal como se muestra en la Fig. 10, la presencia de FVs estimula el acumulo de almidón en tubérculos y tallos de patata. Así, los datos globales demostraron que el MIVOISAP ocurre de forma ubicua entre las plantas y en diferentes órganos.

#### - Ejemplo 2

##### *Los FVs promueven la acumulación de almidón en hojas desprendidas*

Para investigar si los volátiles microbianos que promueven la acumulación de almidón en las hojas se perciben en las hojas o en otras partes de la planta, se midió el contenido de almidón en hojas desprendidas de plantas de patata, maíz, tabaco *Arabidopsis* y cebada cultivadas en medio MS sólido (con o sin sacarosa) en presencia o en ausencia de FVs emitidos por la especie fúngica *Alternaria alternata*.

Independientemente de la presencia de sacarosa en el medio de cultivo, las hojas tratadas con FV acumularon niveles mucho más altos de almidón que las plantas control (Fig. 11), mostrando así los datos globales que los FVs que promueven la acumulación de almidón se perciben en las hojas. Este efecto se observó no solamente cuando las hojas se cultivaban en medio sólido MS, sino también cuando se mantenían sobre medio MS líquido o sobre agua (Fig. 12). Merece destacarse que las hojas desprendidas de las cinco especies analizadas acumularon más almidón que las hojas unidas a la planta completa, lo que indica que (a) el estrés abiótico puede promover, hasta cierto punto, la acumulación de almidón en hojas y (b) ejerce un efecto positivo en el MIVOISAP.

#### - Ejemplo 3

##### *Perfil de los transcriptomas de hojas de patata cultivadas en presencia de FVs*

Para comprender mejor el fenómeno de acumulación de almidón en hojas promovido por volátiles microbianos, se llevó a cabo el análisis de transcriptomas de alto rendimiento de hojas de plantas de patata cultivadas en medio MS (con o sin sacarosa) en presencia y en ausencia de FVs emitidos por *Alternaria alternata* utilizando el array de

oligos 60-meros POCI 44K (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/poci>) (Kloosterman *et al.* 2008: Genes driving potato tuber initiation and growth: identification based on transcriptomal changes using the POCI array, *Funct. Integr. Genomics* 8, 329-340).

5 Cuando las plantas se cultivaron en MS suplementado con sacarosa, se encontró que 3019 genes estaban desregulados en presencia de FVs (más de 2,5 veces de diferencia con respecto al control; valor  $P < 0,05$ ), 1203 de los cuales eran genes clasificados como “sin función asignada”. Entre esta población, 1192 genes estaban regulados al alza y 1827 genes estaban regulados a la baja.

10 Cuando las plantas se cultivaron en MS sin sacarosa, se encontró que 2856 genes estaban desregulados en presencia de FVs, 1109 de los cuales eran genes clasificados como “sin función asignada”. Entre esta población, 1671 genes estaban regulados al alza y 1185 genes estaban regulados a la baja. Los análisis de PCR con transcripción cuantitativa en tiempo real, (RT)-PCR, de algunos de los genes identificados (Fig. 13) validaron los resultados de los análisis del array.

15 Para determinar los procesos biológicos afectados por los volátiles microbianos, se llevó a cabo un análisis de los genes utilizando la herramienta MapMan (Thimm *et al.* 2004: MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathway and other biological processes, *Plant J.* 37, 914-939) (<http://gabi.rzpd.de/projects/MapMan/>). Tal como se refleja en los gráficos de la Fig. 14, este estudio reveló que los FVs promovieron cambios drásticos en la expresión de genes implicados en múltiples procesos tales como el metabolismo de hidratos de carbono, aminoácidos, azufre y lípidos, el estatus redox de la célula, el desarrollo, la biosíntesis de la pared celular, la fotosíntesis, el metabolismo secundario, la traducción y estabilidad de las proteínas, el tráfico de vesículas, la señalización, la producción de energía y las respuestas al estrés. La Fig. 14 da una visión general de los procesos metabólicos implicados en los cambios, tanto en presencia (panel A), como en ausencia (panel B) de sacarosa.

25 Debe destacarse que no se observaron cambios en la expresión de numerosos genes que codifican proteínas que se piensa que están implicadas en el metabolismo del almidón y la sacarosa tales como  $\beta$ -glucano/agua diquinasas, adenilato quinasa plastidial, hexoquinasa plastidial, fosfoglucosa isomerasa plastidial, fosfoglucomutasa plastidial, la subunidad catalítica pequeña de la AGP, ADPG pirofosfatasa, almidón sintasa (SS) clases I y II, transportadores de sacarosa, UDPglucosa (UDPG) pirofosforilasa, fosfoglucosa isomerasa citosólica, fosfoglucomutasa citosólica, sacarosa-fosfato sintasa e invertasa alcalina.

- Ejemplo 4

35 *Análisis detallado de funciones ligadas al metabolismo del almidón*

Los estudios de análisis de transcriptomas se complementaron con estudios de análisis de variación en la actividad enzimática de distintas enzimas, realizados tal como se ha descrito previamente en el apartado de “Ensayos enzimáticos”. Las enzimas estudiadas y los resultados obtenidos (expresados en miliunidades por gramos de peso fresco) se resumen a continuación en la Tabla 2:

45 TABLA 2

*Actividad enzimática de enzimas del metabolismo del almidón*

50 <b>Actividad enzimática (mU/ g FW)</b>	<b>- FV</b>	<b>+ FV</b>
AGP (con DTT)	126,0 ± 13,2	161,3 ± 20,5
55 SuSy	27,2 ± 2,9	255,0 ± 5,9
SS total	2,40 ± 0,52	8,11 ± 0,04
60 $\beta$ -amilasa	2,00 ± 0,24	1,31 ± 0,27

65

	PPasa	2,22 ± 0,12	1,67 ± 0,10
5	Invertasa ácida	423,1 ± 17,6	160,8 ± 14,7
	pG6PDH	65,5 ± 1,3	41,2 ± 2,4
	SBE	0,41 ± 0,14	2,61 ± 0,49
10	Nitrito reductasa	141,4 ± 0,2	63,13 ± 13,4
	Fructosa-1,6-bifosfatasa citosólica	10,8 ± 0,2	3,3 ± 0,2

Estos datos se consideraron en combinación con los datos obtenidos del análisis de transcriptomas, para estudiar con detalle algunas funciones que se vieron afectadas por el tratamiento con FVs, que directa o indirectamente están ligadas al metabolismo del almidón. En los siguientes apartados se expone el análisis realizado para cada una de dichas funciones.

#### 4.1. Los cambios en la actividad AGP no son determinantes en el MIVOISAP en plantas de patata

Está ampliamente asumido que la AGP es el principal paso limitante en la biosíntesis del almidón, y la única enzima que cataliza la producción de ADPG ligada a la producción de almidón (Neuhaus *et al.* 2005: No need to shift the paradigm on the metabolic pathway to transitory starch in leaves, Trends Plant Sci. 10, 154-156; Streb *et al.* 2009: The debate on the pathway of starch synthesis: a closer look at low-starch mutants lacking plastidial phosphoglucomutase supports the chloroplast-localised pathway, Plant Physiol. 151, 1769-1772). En las hojas, esta enzima heterotetramérica se activa alostéricamente mediante 3-fosfoglicerato y se inhibe mediante Pi. Comprende dos tipos de subunidades, homologas pero distintas, la pequeña (APS) y la grande (APL), que está codificada por tres genes diferentes (APL1, APL2 y APL3) (Crevillén *et al.* 2005: Differential pattern of expression and sugar regulation of *Arabidopsis thaliana* ADPglucose pyrophosphorylase-encoding genes, J. Biol. Chem. 280, 8143-8140).

Por ello, se estudió la posible influencia de la actividad AGP (ADP-glucosa pirofosforilasa), y de los cambios en sus dos subunidades, sobre el MIVOISAP. Los estudios se realizaron sobre plantas de patata cultivadas en presencia de cultivos de *Alternaria alternata* de manera análoga a como se ha descrito en Ejemplos anteriores.

Los análisis de transcriptomas revelaron que, de las dos subunidades de la AGP, los niveles de transcritos de la subunidad menor (APS) permanecían inalterados tras el tratamiento con FV. Por el contrario, la expresión de uno de los genes que codifica la subunidad mayor (APL1) estaba regulada al alza (incremento de 14,98 veces), mientras que otro de los genes que también codifica la subunidad mayor, APL3, estaba regulado a la baja (disminución de 8,8 veces) tal como se confirmó además mediante análisis de RT-PCR cuantitativa (Fig. 13).

Tal como se refleja en la Tabla 2 anteriormente expuesta, la actividad total de la AGP se vio ligeramente alterada por el tratamiento con FVs (incremento de 1,5 veces y disminución de 1,5 veces cuando la actividad AGP se midió en presencia o en ausencia de 5 mM ditiotreitól (DTT), respectivamente). Además, los análisis de transferencias tipo Western no revelaron ninguna diferencia aparente en la cantidad de AGP entre las hojas tratadas y no tratadas con FVs (Fig. 15).

El tratamiento con FVs dio como resultado un aumento de aproximadamente 35% en los niveles de 3-fosfoglicerato intracelular ( $494,0 \pm 36,0 \mu\text{mol/g FW}$  en ausencia de FVs frente a  $674,1 \pm 127,5 \mu\text{mol/g FW}$  en presencia de FVs), lo que indicaría que la AGP está ligeramente activada durante el MIVOISAP.

Como la AGP cataliza la conversión reversible de ATP y glucosa-1-P en ADPG y pirofosfato (PPi), se considera que la pirofosfatasa alcalina (PPasa) juega un papel crucial en la biosíntesis de almidón, puesto que desplaza la reacción de la AGP del equilibrio mediante la rápida retirada de PPi. Sin embargo, los análisis de RT-PCR cuantitativa (Fig. 13) y los análisis de transcriptomas revelaron que el tratamiento con volátiles fúngicos dio como resultado la regulación a la baja de la PPasa (reducción de 3,72 veces), que fue acompañada de una reducción en la actividad PPasa (véase la Tabla 2). Es así concebible que, con el tratamiento con FV, se acumulará PPi en el cloroplasto, impidiendo así la producción de ADPG mediada por AGP.

La síntesis de almidón está regulada por la activación redox postraducciona de AGP mediada por tioredoxinas (Ballicora *et al.* 2000: Activation of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase by thioredoxin, J. Biol. Chem. 275, 1315-1320), que está promovida por la trehalosa-6-fosfato formada en el citosol (Kolbe *et al.* 2005: Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 11118-11123). Merece destacarse que los análisis de RT-PCR cuantitativa (Fig. 13) y

los análisis de transcriptomas revelaron que la trehalosa-6-fosfato sintasa y las tiorredoxinas plastidiales se veían fuertemente reguladas a la baja cuando las plantas se cultivaban en presencia de FVs (reducción de 7,57 y 8,31 para la tiorredoxina m y f, respectivamente, y reducción de 4,57 veces de la trehalosa-6-fosfato sintasa en presencia de sacarosa; reducción de 3,71 y 2,74 veces para la tiorredoxina m y f, respectivamente, y reducción de 4,89 veces de trehalosa-6-fosfato sintasa en ausencia de sacarosa). Para ensayar si esta situación afecta al estatus redox de la AGP, se separaron extractos de hojas de patata control y tratadas con FVs mediante SDS-PAGE reductora y no reductora y posteriormente se sometieron a análisis por transferencia tipo Western de la AGP. Es importante hacer notar que, cuando los extractos de hoja se separaron en geles no reductores con SDS, la AGP está presente como una mezcla de monómeros activos de 50 kD y dímeros inactivos de 100 kD formados por enlaces intermoleculares que implican puentes de cisteína. Estos dímeros se pueden reactivar *in vitro* incubando extractos con DTT (Hendriks *et al.* 2003: ADPglucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of *Arabidopsis* and other plant species, *Plant Physiol.* 133, 838-849; Kolbe *et al.* 2005: Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 11118-11123). Tal como se muestra en la Fig. 15, las hojas de patata tratadas con FVs acumulan cantidades mucho mayores de dímeros inactivos de 100 kD que las hojas control en condiciones no reductoras. Estos dímeros de 100 kD se pudieron convertir en monómeros de 50 kD cuando los extractos se obtuvieron y separaron en condiciones no reductoras (incluyendo DTT) (Fig. 15), indicando así los datos globales que la AGP está en su mayor parte oxidada (inactiva) en las hojas tratadas con FVs.

Para evaluar más ampliamente la relevancia de la AGP en el MIVOISAP, se midió la actividad AGP, el contenido de almidón y la ADPG en hojas de plantas de patata AGP62 (que tienen la subunidad APS inactivada por elementos antisentido (Müller-Rober *et al.* 1992: Inhibition of the ADPglucose pyrophosphorylase in transgenic potato leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes, *EMBO J.* 11, 1229-1238)) cultivadas en presencia y en ausencia de FVs. Tal como se ilustra en la Fig. 16A, la actividad AGP en hojas AGP62 fue un 30% de la de las hojas tipo silvestre (WT). Al contrario que en las hojas WT, la actividad AGP en plantas AGP62 no se incrementó con el tratamiento con FVs. Merece destacarse que el tratamiento con FVs dio como resultado una potenciación drástica de la acumulación de almidón (Fig. 16B), y un incremento de aprox. 70% en el contenido de ADPG (Fig. 16C) en hojas AGP62. Los contenidos de almidón y ADPG en hojas AGP62 tratadas con FVs fueron comparables a los observados en hojas WT tratadas con FVs.

Los datos globales indicarían, así, que los cambios en la actividad AGP juegan un papel menor, si es que juegan alguno, en el MIVOISAP en hojas de patata.

#### 4.2. Los volátiles fúngicos regulan fuertemente al alza SuSy y regulan a la baja la expresión de la invertasa ácida

Tal como se comentó en el apartado de “Antecedentes de la invención”, generalmente se ha considerado que la biosíntesis de almidón en hojas tiene lugar exclusivamente en el cloroplasto, y está segregada del proceso biosintético de sacarosa que tiene lugar en el citosol, mientras que recientes evidencias prevén la existencia de (una) ruta(s) adicional(es) en la(s) que se produce de novo en el citosol, mediante SuSy, ADPG ligado a la biosíntesis del almidón.

En conexión con estas teorías, merece destacarse que los análisis de transcriptomas de hojas de plantas cultivadas en presencia o en ausencia de FVs revelaron que el tratamiento con FVs dio como resultado una drástica potenciación de la expresión de Su4 (incremento de 29,4 y 31,62 veces cuando las plantas se cultivaron en presencia o en ausencia de sacarosa, respectivamente), una isoforma de SuSy que controla la acumulación de ADPG, UDPG y almidón tanto en hojas como en tubérculos de patata (Muñoz *et al.* 2005: Sucrose synthase controls the intracellular levels of ADP-glucose linked to transitory starch biosynthesis in source leaves, *Plant Cell Physiol.* 46, 1366-1376; Baroja-Fernández *et al.* 2009: Enhancing sucrose synthase activity in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers results in increased levels of starch, ADPglucose and UDPglucose and total yield. *Plant Cell Physiol.* 50, 1651-1662). De hecho, los análisis de los niveles intracelulares de almidón y azúcares-nucleótidos en hojas de plantas de patata cultivadas en presencia y en ausencia de FVs reveló una correlación positiva entre los patrones de actividad de SuSy y los contenidos de almidón, UDPG y ADPG (Fig. 17). Esta potenciación drástica de la expresión de SuSy mediante el tratamiento con FVs se confirmó adicionalmente mediante análisis de transferencias tipo Western (Fig. 18), RT-PCR cuantitativa (Fig. 13), y mediante análisis de medida de la actividad enzimática (incremento de 10 veces: véase la Tabla 2).

La invertasa ácida es una enzima sacarolítica cuya actividad está regulada de forma postraduccional por un inhibidor proteínico (Bracho and Whitaker, 1990: Purification and partial characterization of potato (*Solanum tuberosum*) invertase and its endogenous proteinaceous inhibitor, *Plant Physiol.* 92, 386-394) en los tubérculos. Estas dos enzimas sacarolíticas compiten por el mismo suministro de sacarosa, actuando como uno de los principales determinantes de la acumulación de almidón el equilibrio entre SuSy y la invertasa ácida (Baroja-Fernández *et al.* 2009: Enhancing sucrose synthase activity in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers results in increased levels of starch, ADPglucose and UDPglucose and total yield, *Plant Cell Physiol.* 50, 1651-1662). Merece destacarse que los análisis del perfil de RNA revelaron que el tratamiento con FVs dio como resultado una regulación a la baja de la expresión de la invertasa ácida (disminución de 2,61 y 2,04 veces en presencia y ausencia de sacarosa, respectivamente), y una dramática potenciación de los transcritos que codifican el inhibidor de esta enzima sacarolítica (incremento de 17,78 y 18,1 veces en presencia y ausencia de sacarosa, respectivamente), lo que se confirmó adicionalmente mediante RT-PCR cuantitativa (Fig. 13) y mediante análisis de actividad enzimática (véase la Tabla 2).

Los datos globales indican que (a) las rutas sacarolíticas mediadas por SuSy e invertasa ácida se regulan coordinadamente en respuesta a señales idénticas, y (b) el equilibrio entre estas rutas es un determinante principal de la acumulación de almidón en hojas de patata expuestas a volátiles microbianos. Por la clara correlación existente entre los patrones de actividad de SuSy y los contenidos de almidón, ADPG y UDPG en hojas de plantas tratadas y no tratadas con FVs (Fig. 17), los datos globales indicaban también que los altos niveles de ADPG, UDPG y almidón producidos en hojas de patata tratadas con FVs se adscriben, al menos en parte, a la potenciación de la actividad de SuSy durante el MIVOISAP en patata.

#### 4.3. Los volátiles fúngicos regulan a la baja rutas principales de provisión interna de aminoácidos

Tal como se mencionó previamente en la sección de “Antecedentes de la invención”, estudios recientes han demostrado que las plantas poseen un sistema regulador mediado por ppGpp similar al que se da en las bacterias, lo cual se ha demostrado que juega un papel crucial en aspectos tales como la fertilización de las plantas. El ppGpp se acumula en el cloroplasto de hojas estresadas a través de la regulación de la expresión de homólogos de RelA/SpoT (RSH).

Merece destacarse que los análisis de RT-PCR cuantitativa (Fig. 13) y los análisis de transcriptomas descritos previamente en los Ejemplos de la presente solicitud revelaron que, independientemente de la presencia de sacarosa, el tratamiento con FVs dio como resultado una regulación a la baja de RSH (disminución de 2,6 y 2,42 veces en presencia y ausencia de sacarosa, respectivamente).

Es posible que las plantas desarrollen respuestas similares a las existentes en bacterias que regulan la biosíntesis de glucógeno como consecuencia de la privación y/o provisión de aminoácidos. Consistentemente con esta presunción, los análisis de RT-PCR cuantitativa (Fig. 13), y los análisis de transcriptomas revelaron que el tratamiento con FVs da como resultado una drástica reducción de la expresión de GAPDH y pPGK (disminución de 32,68 y 5,32 veces, respectivamente). Además, estos análisis revelaron que el tratamiento con FVs daba como resultado una marcada regulación a la baja de la G6P deshidrogenasa (pG6PDH) plastidial (reducción de 6,17 veces)(véanse también la Fig. 13 y la Tabla 2), una enzima de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato (OPPP) que está implicada en la producción de poder reductor requerido para la biosíntesis de aminoácidos en órganos heterotróficos o en hojas durante el período nocturno.

Además, el tratamiento con FVs dio como resultado una marcada reducción de la expresión de genes que codifican un juego de proteínas plastidiales implicadas en la asimilación de nitrógeno tales como las que codifican el transportador de nitrito, la nitrito reductasa, la glutamato sintasa y el translocador de glutamato/malato (disminución de 3,88, 9,85, 3,86 y 3,22 veces, respectivamente) (véanse también la Fig. 13 y la Tabla 2).

El primer paso en la conversión de sulfato en los sulfoaminoácidos cisteína y metionina está catalizado por la ATP sulfurilasa. Esta enzima plastidial cataliza la conversión reversible de ATP y sulfato en adenosina-5'-fosfosulfato y PPi, que es desplazada del equilibrio por la PPasa mediante la rápida retirada de PPi. Tal como se ha discutido más arriba, el tratamiento con FVs da como resultado a la regulación a la baja de la PPasa. Así, es concebible que con el tratamiento con FVs se acumule PPi en el cloroplasto, impidiendo así la biosíntesis de sulfoaminoácidos inhibiendo la ATP sulfurilasa. Merece destacarse que el tratamiento con FVs da como resultado una regulación a la baja de la serina acetiltransferasa plastidial, cisteína sintasa y cistationina-gamma-sintasa (reducción de 3,43, 2,85 y 2,53 veces, respectivamente), todas ellas enzimas que son necesarias para la síntesis de cisteína y metionina en el cloroplasto.

Por todo ello, se investigó si los defectos en la provisión de cisteína plastidial están directamente implicados en el MIVOISAP, midiendo el contenido de almidón en hojas de patata desprendidas cultivadas en presencia y en ausencia de FVs emitidos por *Alternaria alternata*, y en presencia de diferentes concentraciones de cisteína. Lo más importante es que estos análisis revelaron que, al contrario de lo que ocurre con otros aminoácidos, el MIVOISAP se veía fuertemente reprimido por la cisteína añadida exógenamente (Fig. 19). Otros aminoácidos, en cambio, no inhibieron el MIVOISAP.

Así, los datos globales indicaban con fuerza que el MIVOISAP es la consecuencia de una respuesta desencadenada por la inadecuada provisión interna de cisteína. Como los sulfoaminoácidos constituyen la principal entrada metabólica de azufre reducido en el metabolismo celular, los autores de la invención barajaron la hipótesis de que el alto contenido de almidón de las hojas tratadas con FVs sea el resultado, al menos en parte, de una respuesta desencadenada por la privación tanto de nitrógeno como de azufre.

Las proteasas juegan un papel principal en el control de la calidad de las proteínas, siendo responsables de la degradación de polipéptidos dañados y aberrantes así como del reciclaje de aminoácidos para biosíntesis de proteínas *de novo*. La proteólisis también proporciona los aminoácidos necesarios para mantener la homeostasis celular, siendo un proceso que implica una importante porción de los requerimientos de energía para el mantenimiento de la célula. En esa línea, merece destacarse que los análisis de transcritos de la presente invención revelaron que el tratamiento con FVs potenciaba drásticamente la expresión de muchos inhibidores de proteasas. Así es altamente concebible que (a) la falta de actividad proteolítica resultante tenga como consecuencia un defecto en el aporte interno de aminoácidos que desencadene una respuesta que conduzca a la sobreacumulación de almidón, y (b) la disminución de la demanda de ATP para la degradación de proteínas tenga como consecuencia la disponibilidad de un exceso de energía para la biosíntesis de almidón.

#### 4.4. Los volátiles fúngicos regulan al alza las almidón sintasas de clases III y IV

Se conocen cinco clases distintas de almidón sintasas (SS) en las plantas: la GBSS, que es responsable de la síntesis de amilosa, y las SS de clases I, II, III, y IV (SSI, SSII, SSIII, y SSIV, respectivamente). Abel *et al.* (Abel *et al.*, 1996: Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a novel 139 kDa starch synthase from potato (*Solanum tuberosum* L.), *Plant J.* 10, 981-991) han demostrado que la reducción de SSIII conduce a la síntesis de almidón con modificaciones estructurales en plantas transgénicas de patata. Por otra parte, Roldan *et al.* (Roldan *et al.* 2007: The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of *Arabidopsis thaliana* suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation, *Plant J.* 49, 492-504) han demostrado que la eliminación de SSIV determina que los cloroplastos acumulen sólo un gránulo grande de almidón en *Arabidopsis*. Además, utilizando diferentes combinaciones de mutaciones de la SS en un fondo mutante para la SSIV, Szydlowski *et al.* (Szydlowski *et al.* 2009: Starch granule initiation in *Arabidopsis* requires the presence of either class IV or class III starch synthase, *Plant Cell* 21, 2443-2457) han demostrado recientemente que los mutantes dobles de *Arabidopsis* que carecen de las funciones SSIII y SSIV muestran un fenotipo carente de almidón.

Los datos globales (a) indicaron que tanto la SSIII como la SSIV juegan un papel clave en la acumulación de almidón, aunque la SSIV es obligatoria para dar lugar al número regular de gránulos de almidón que se encuentran en plantas de tipo silvestre, y (b) sugerían que la SSIV juega un papel importante en el proceso de iniciación del gránulo de almidón.

Consistentemente con la idea de que SSIII y SSIV son determinantes principales de la acumulación de almidón en hojas de patata, los análisis de transcriptomas revelaron que, independientemente de la presencia de sacarosa en el medio de cultivo, el tratamiento con FVs dio como resultado un gran incremento de la expresión de SSIV (incremento de 7,00 y 4,68 veces en presencia y en ausencia de sacarosa, respectivamente) y un incremento moderado en la expresión de SSIII (incremento de 2,53 veces en presencia de sacarosa), resultados que se confirmaron mediante análisis de RT-PCR cuantitativa (Fig. 13). No se observaron cambios en los niveles de expresión de la SS de clase I y II. Los análisis de actividad enzimática revelaron que el tratamiento con FVs daba como resultado un incremento de 3 veces en la actividad SS total (véase la Tabla 2). Los datos globales indican así que el MIVOISAP se puede adscribir, al menos en parte, a la potenciación de la actividad de SSIII y SSIV.

#### 4.5. Los volátiles fúngicos promueven tanto la reducción del contenido de amilosa como cambios estructurales en la amilopectina incrementando el balance entre las actividades ramificante y desramificante del almidón

El gránulo de almidón está compuesto de dos homopolímeros estructuralmente diferentes: la amilosa, que es esencialmente lineal, y la amilopectina, que es una macromolécula moderadamente ramificada. El almidón de las hojas de patata contiene un 10-15% de amilosa. Mientras que la amilosa es producida por la GBSS, la amilopectina es sintetizada por las acciones combinadas de la SS soluble y la enzima ramificante del almidón (SBE), de las que la última cataliza la formación de los enlaces  $\alpha$ -1,6 en la molécula de almidón. Según el "modelo de recortes" de la formación del gránulo de almidón, la biosíntesis de la amilopectina es también el resultado de "recortes" por parte de las enzimas desramificantes (isoamilasas y pululaninas que hidrolizan enlaces  $\alpha$ -1,6 dentro de la molécula de almidón) de glucanos altamente ramificados que son sintetizados por la SS soluble y la SBE.

En esta línea, merece destacarse que los análisis de RT-PCR cuantitativa (Fig. 13) y los análisis de transcriptomas revelaron que el tratamiento con FVs dio como resultado un drástico aumento en la expresión de SBE (incremento de 32,66 y 2,5 veces en presencia y en ausencia de sacarosa, respectivamente) y un incremento moderado en la expresión tanto de pululanina como de GBSS cuando las plantas se cultivaron en condiciones heterotróficas (incremento de 3,4 y 2,98 veces, respectivamente). Consistentemente, la actividad de la SBE en hojas tratadas con FVs era marcadamente más elevada que en hojas no tratadas (Tabla 2). Merece destacarse que los cambios en la expresión de estos genes fueron acompañados por una importante reducción en el contenido relativo de amilosa (Fig. 20A).

Para investigar si los cambios promovidos por los FVs en las actividades SS y SBE daban como resultado cambios estructurales en la amilopectina, se sometió a desramificación enzimática amilopectina purificada de hojas tratadas y no tratadas con FVs y se determinó la distribución de longitudes de cadena mediante cromatografía de intercambio aniónico de alta eficacia con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD). Estos análisis revelaron que el tratamiento con FVs ejerce un efecto importante sobre la estructura de la amilopectina, puesto que la amilopectina de hojas tratadas con FVs contenía más cadenas con un grado de polimerización (GP) menor que 20 monómeros, que la amilopectina de hojas no tratadas (Fig. 20B, Fig. 20C). Los datos globales indicaron así que los cambios estructurales que ocurren en las moléculas de almidón de plantas tratadas con FVs se pueden adscribir, al menos en parte, a la potenciación de las actividades SS y SBE.

#### 4.6. Los volátiles fúngicos regulan fuertemente a la baja las enzimas degradativas del almidón

Utilizando la técnica de los antisentido, Scheidig *et al.* (Scheidig *et al.*, 2002: Downregulation of a chloroplast-targeted  $\beta$ -amylase leads to a starch-excess phenotype in leaves, *Plant J.* 30, 581-591) demostraron que la  $\beta$ -amilasa BMY1 de los cloroplastos utilizada como diana ejerce un fuerte control sobre la degradación del almidón en hojas de patata. Consistentemente con ello, los análisis de transcriptomas descritos en la presente solicitud revelaron que



el tratamiento con FVs daba como resultado una drástica regulación a la baja de PCT-BMY1 (disminución de 5,89 y 3,66 veces en presencia y en ausencia de sacarosa, respectivamente, que se confirmó adicionalmente mediante RT-PCR cuantitativa (Fig. 13) y mediante análisis de actividad enzimática (Tabla 2).

5 Las plantas superiores contienen fosforilasas de almidón tanto citosólicas como plastidiales. Al contrario de lo que ocurre con las  $\beta$ -amilasas plastidiales implicadas en la degradación del almidón, la función precisa *in vivo* de la isoforma plastidial no es todavía evidente, aunque se ha aceptado en general que puede estar implicada en la degradación del almidón. Zeeman *et al.* (Zeeman *et al.* 2004: Plastidial  $\alpha$ -glucan phosphorylase is not required for starch degradation in *Arabidopsis* leaves but has a role in the tolerance of abiotic stress, *Plant Physiol.* 135, 849-  
10 858) argumentaron que esta enzima está implicada en la tolerancia al estrés abiótico en *Arabidopsis*, proporcionando sustratos del almidón a la OPPP para aliviar el estrés. Merece destacarse que los análisis de RT-PCR (Fig. 13) y los análisis de transcriptomas revelaron que el tratamiento con FVs daba como resultado una marcada regulación a la baja de la expresión de la fosforilasa del almidón plastidial cuando las plantas se cultivaban en condiciones heterotróficas (disminución de 5,14 veces).

15 Los datos globales indicaron así que el MIVOISAP se puede adscribir, al menos en parte, a la regulación a la baja de isoformas plastidiales de la  $\beta$ -amilasa y la fosforilasa del almidón.

#### 20 4.7. Los volátiles fúngicos regulan al alza genes implicados en la endocitosis y el tráfico de vesículas

Sintetizados a partir del fosfatidilinositol (PI) mediante la PI-3-fosfato (POP) quinasa (PI3K) y mediante la PI-4-fosfato (PI4P) quinasa (PI4K), PI3P y PI4P han sido implicados en diversas funciones fisiológicas, incluidas la endocitosis en la membrana plasmática, el tráfico de vesículas, y la biogénesis y organización de vacuolas. La endocitosis es un proceso implicado en la internalización de moléculas desde la membrana plasmática y el entorno extracelular, y el reciclaje de membrana plasmática. El incremento del metabolismo del fosfoinosítido da como resultado un incremento en la utilización de azúcares de medio (Im *et al.*, 2007: Increasing plasma membrane phosphatidylinositol(4,5)biphosphate biosynthesis increases phosphoinositide metabolism in *Nicotiana tabacum*, *Plant Cell* 19, 1603-1616), lo que es un fuerte indicio de que la señalización mediada por el fosfoinosítido juega un papel importante en la potenciación de la absorción, internalización y almacenamiento en vacuolas de los azúcares extracelulares. Merece destacarse que recientes estudios han proporcionado fuertes evidencias de que una parte importante de la sacarosa incorporada en las células heterotróficas se absorbe mediante los procesos de endocitosis mediada por PI3K y/o PI4K y el tráfico de vesículas previamente a su conversión en almidón (Baroja-Fernández *et al.* 2006: An Important Pool of Sucrose Linked to Starch Biosynthesis is taken up by endocytosis in Heterotrophic Cells, *Plant Cell Physiol.* 47, 447-456). Consistentemente con estas observaciones, los análisis de RT-PCR (Fig. 13) y los análisis de transcriptomas revelaron que los genes que codifican PI4K y PI3K se ven regulados al alza por el tratamiento con FVs (incremento de 3,55 y 3,12 veces, respectivamente). El PI se sintetiza en el citosol a partir de G6P en un proceso de tres etapas, que implican a la inositol-fosfato sintasa, inositol monofosfatasa y PI sintasa. Merece destacarse que los análisis de RT-PCR (Fig. 13) y los análisis de transcriptomas revelaron que los genes que codifican la inositol-fosfato sintasa y la inositol monofosfatasa se ven regulados al alza por el tratamiento con FVs (incremento de 3,78 y 4,62 veces, respectivamente).

El citoesqueleto de actina de las plantas es una estructura de soporte dinámica que juega un papel crucial en el movimiento de los orgánulos, el tráfico de vesículas, las corrientes citoplasmáticas, las defensas de la planta frente a patógenos, etc. en respuesta a señales internas y externas. Recientemente se han proporcionado evidencias de que el citoesqueleto de actina también está implicado en la absorción endocítica y el tráfico de sacarosa ligados a la biosíntesis de almidón en células en cultivo de sicomoro (Baroja-Fernández *et al.* 2006: An Important Pool of Sucrose Linked to Starch Biosynthesis is taken up by endocytosis in Heterotrophic Cells, *Plant Cell Physiol.* 47, 447-456). Merece destacarse que se ha demostrado que SuSy, una enzima clave en el proceso de biosíntesis del almidón (ver más arriba), se asocia con el citoesqueleto de actina (Dunkan and Huber, 2007: Sucrose synthase oligomerization and F-actin association are regulated by sucrose concentration and phosphorylation, *Plant Cell Physiol.* 48, 1612-1623), lo cual es un apoyo más a la visión de que el citoesqueleto de actina determina hasta cierto punto el metabolismo del almidón. Los factores despolimerizantes de la actina son moduladores de la organización dinámica del citoesqueleto de actina, que modulan la tasa de recambio de los filamentos y la interconexión de las señales celulares con los procesos dependientes de citoesqueleto. Consistentemente con la visión de que la endocitosis y/o el tráfico de vesículas mediados por el citoesqueleto pueden jugar un papel importante en el MIVOISAP, los análisis de RT-PCR (Fig. 13) y los análisis de transcriptomas revelaron que la expresión del factor despolimerizante de la actina se ve regulada al alza por el tratamiento con FVs (incremento de 3,26 veces).

60 Los datos globales muestran así que, tal como se ilustra esquemáticamente en la Fig. 21, la absorción endocítica de sacarosa y el tráfico de vesículas pueden estar implicados en el MIVOISAP, especialmente cuando las plantas se cultivan en presencia de sacarosa.

65

#### 4.8. *Los volátiles fúngicos promueven la regulación a la baja de genes de fotosíntesis cuando las plantas se cultivan en condiciones heterotróficas*

Una de las alteraciones más llamativas del transcriptoma de las plantas tratadas con FVs cultivadas en presencia de sacarosa implica la represión de genes que codifican proteínas que funcionan en reacciones luminosas de la fotosíntesis. Además, cuando las plantas se cultivan en presencia de sacarosa, también se ven fuertemente reprimidos por el tratamiento con FVs genes que codifican enzimas clave del ciclo de Calvin y la fotorrespiración. Estos incluyen pPGK, pGAPDH, triosa-P-isomerasa, transcetolasa, pentosa-P-epimerasa, ribosa-P-isomerasa, fructosa-bifosfato aldolasa, fructosa-1,6-bifosfatasa, sedoheptulosa-1,7-bifosfatasa, Rubisco, glicolato oxidasa, catalasa, serina hidroximetiltransferasa, e hidroxipiruvato reductasa (reducción de 5,32, 32,68, 3,69, 3,65, 4,79, 6,43, 14,97, 17,99, 11,09, 46,62, 9,24, 4,01, 6,6 y 7,79 veces, respectivamente) (véase también la Fig. 13). Además, el tratamiento con FVs de plantas cultivadas con sacarosa dio como resultado la represión del gen que codifica la fotoclороfílido óxido reductasa (reducción de 7,73), que es necesaria para la biosíntesis de clorofila. En estas condiciones es altamente concebible que, tal como se ilustra esquemáticamente en la Fig. 21, gran parte del almidón acumulado por las plantas cultivadas en condiciones heterotróficas se produzca a partir de la degradación metabólica de sacarosa tomada del medio de cultivo (véase más adelante).

#### 4.9. *Los FVs promueven con fuerza el metabolismo aeróbico y anaeróbico cuando las plantas se cultivan en condiciones heterotróficas*

Simultáneamente con la represión de genes que codifican proteínas que funcionan en reacciones luminosas de la fotosíntesis (véase más arriba), el tratamiento con FVs dio como resultado la regulación a la baja de la ATP sintasa plastidial cuando las plantas se cultivaron en condiciones heterotróficas (reducción de 9,09 veces). En estas condiciones los FVs promovieron la transcripción de genes que codifican enzimas glicolíticas tales como enolasa, piruvato quinasa, fosfoenol piruvato (PEP) carboxiquinasa y PEP carboxilasa (incremento de 4,94, 5,48, 19,64 y 6,03 veces, respectivamente). Este efecto fue mucho menos pronunciado cuando las plantas se cultivaron en condiciones autotróficas. Como la PEP carboxiquinasa y la PEP carboxilasa están implicadas en la conversión de PEP en oxalacetato, los datos globales indican que los FVs promueven la glicolisis y el flujo de carbono hacia el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA), tal como se esquematiza en la Fig. 21, especialmente cuando las plantas se cultivan en condiciones heterotróficas. A este respecto, merece destacarse que el tratamiento con FVs dio como resultado un incremento en la expresión de los genes que codifican enzimas del ciclo de los TCA tales como succinato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa (incremento de 2,8 y 2,57 veces, respectivamente). Algunos genes implicados en fermentación, incluidos los que codifican la alcohol deshidrogenasa (ADH), la piruvato descarboxilasa y una aldehído deshidrogenasa, se vieron fuertemente regulados al alza por el tratamiento con FVs, tanto en condiciones heterotróficas (incremento de 51,43 y 9,92 veces para la ADH y la aldehído deshidrogenasa, respectivamente), y condiciones autotróficas (incremento de 9,92 y 3,77 veces para ADH y piruvato descarboxilasa, respectivamente) (véase también la Tabla 2). El incremento en actividad de la ruta de fermentación del etanol a partir del piruvato permite la reoxidación del NADH producido en glucolisis, permitiendo así que la planta genere ATP independientemente de la fosforilación oxidativa. Por ello, la promoción por parte de los FVs de la potenciación de la expresión de genes que codifican enzimas implicadas en la glucolisis, el ciclo de los TCA y la fermentación es consistente con la noción de que tanto los metabolismos aerobio como anaerobio están regulados al alza durante MIVOISAP para generar energía en condiciones de producción de ATP fotosintético reducido.

Las plantas superiores poseen transportadores de ATP/ADP tanto en los plastidios heterotróficos como en los autotróficos para tomar ATP citosólico intercambiándolo con ADP plastidial. Como los plastidios heterotróficos carecen de la maquinaria que produce ATP mediante la fotosíntesis, el transportador de ATP/ADP es necesario para suministrar energía a procesos anabólicos localizados en el estroma tales como los implicados en la producción de aminoácidos, almidón y ácidos grasos. En los cloroplastos se ha demostrado que los transportadores de ATP/ADP son importantes para la importación nocturna de ATP y para prevenir daños causados por la fotooxidación (Reinhold *et al.* 2007: Limitation of nocturnal import of ATP into *Arabidopsis* chloroplasts leads to photooxidative damage. *Plant J.* 50, 293-304). Merece destacarse que los FVs regulan al alza la expresión del transportador plastidial de ATP/ADP cuando las plantas se cultivan en condiciones heterotróficas (incremento de 3,16 veces), lo que es consistente con la noción de que el ATP extraplastidial sostiene en gran medida rutas anabólicas que suceden en el cloroplasto de plantas tratadas con FVs cultivadas en condiciones de crecimiento heterotróficas.

#### 4.10. *Los volátiles fúngicos promueven el intercambio de glucosa-6-fosfato y reprimen el intercambio de triosa-fosfato entre el cloroplasto y el citosol*

La principal proteína de la membrana de la envuelta de los cloroplastos, el translocador de triosa-P/3-fosfoglicerato/P (TPT), es fundamental para la comunicación entre cloroplasto y citosol, puesto que exporta los productos primarios del ciclo de Calvin (es decir, triosa fosfatos y 3-fosfoglicerato) fuera del cloroplasto en un intercambio estricto de unidades con respecto al Pi. Las plantas de patata con el TPT inhibido por moléculas antisentido acumulan en sus hojas 2-3 veces más almidón y más 3-fosfoglicerato que las hojas de tipo silvestre, y tienen reducido el vigor de la planta. Merece destacarse que los análisis de RT-PCR (Fig. 13) y transcriptomas revelaron que, independientemente de la presencia de sacarosa en el medio de cultivo, el tratamiento con FVs dio como resultado la reducción de la expresión del TPT (reducción de 3,17 y 2,25 veces en presencia y en ausencia de sacarosa, respectivamente). Las hojas de

las plantas tratadas con FVs acumularon niveles moderadamente elevados de 3-fosfoglicerato (véase más arriba), que probablemente se pueden adscribir a la reducción del transporte mediado por TPT de 3-fosfoglicerato del cloroplasto al citosol.

5 Los plastidios no verdes de tejidos heterotróficos dependen de la provisión de G6P del citosol a través de sistema de antiportador G6P/Pi. La G6P importada se puede usar para la síntesis de almidón y ácidos grasos. La G6P también se puede usar para activar la OPPP que, tal como se discutió más arriba, es la fuente principal de poder reductor requerido para la reducción de nitrito y para la biosíntesis de ácidos grasos y de aminoácidos. Merece destacarse que, aunque la expresión del translocador de G6P/Pi está restringida principalmente a los tejidos heterotróficos, el tratamiento con  
10 FVs potenció con fuerza la expresión del translocador G6P/Pi en hojas cuando las plantas se cultivaron en presencia y en ausencia de sacarosa, tal como se confirmó tanto mediante los análisis de RT-PCR (Fig. 13) como mediante los análisis de transcriptomas (incremento de 30,23 y 22,08 veces cuando las plantas de cultivaron en presencia y en ausencia de sacarosa, respectivamente).

15 La implicación del translocador G6P/Pi en la importación de G6P citosólica al cloroplasto cuando las plantas se trataron con FVs es cuestionable, puesto que, tal como se mostró más arriba, las enzimas implicadas en el metabolismo plastidial de la G6P están drásticamente reguladas a la baja. Esto y la reducción de la expresión de las proteínas implicadas en la síntesis de G6P en el citosol a partir de productos del ciclo de Calvin tales como TPT (véase más arriba), fructosa-1,6-bifosfatasa citosólica (véanse la Tabla 2 y la Fig. 13) (reducción de 9,87 y 3,61 veces en presencia  
20 y en ausencia de sacarosa, respectivamente), y fructosa-6-fosfato 2 quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa (reducción de 3,39 y 2,2 veces en presencia y en ausencia de sacarosa, respectivamente) (véase también la Fig. 13) sugieren que, tal como se esquematiza en la Fig. 21, en condiciones de tratamiento con FVs, el transportador de G6P/Pi jugaría un papel principal exportando moléculas de G6P del cloroplasto al citosol para posteriormente ser canalizadas hacia el ciclo de los TCA y/o rutas fermentativas, y/o ser convertidas en compuestos tales como sacarosa y PI que es necesario para los  
25 procesos de endocitosis y tráfico de vesículas.

#### 4.11. *Influencia de los FVs en otros genes de interés*

30 Todas las especies microbianas analizadas en este trabajo emitían volátiles que promovían el crecimiento de la planta, lo que indicaría que la maquinaria implicada en la biosíntesis se ve regulada al alza durante MIVOISAP. Consistentemente con esta presunción, el análisis de transcritos de hojas de plantas de patata reveló que el tratamiento con FVs daba como resultado la regulación al alza de la celulosa sintasa y la callosa sintasa (incremento de 9,78 y 2,1 veces, respectivamente).

35 MIVOISAP implica cambios en la expresión de multitud de genes que codifican enzimas fundamentales en el metabolismo de hidratos de carbono y en producción/consumo de energía, lo que sugiere que el MIVOISAP es un proceso altamente coordinado y regulado. Merece destacarse que los análisis de transcritos descritos en la presente solicitud revelaron que el tratamiento con FVs promovía con fuerza la expresión de SNF4 (incremento de 6,64 veces)  
40 (véase también la Fig. 13), un activador de la proteína quinasa SnRK1, que es un regulador global del metabolismo del carbono en las plantas. Es así probable que (a) SNF4 ejerza un efecto positivo sobre la acumulación de almidón a través de la activación de SnRK1, y (b) SnRK1 juegue un papel regulador durante el MIVOISAP.

45

50

55

60

65

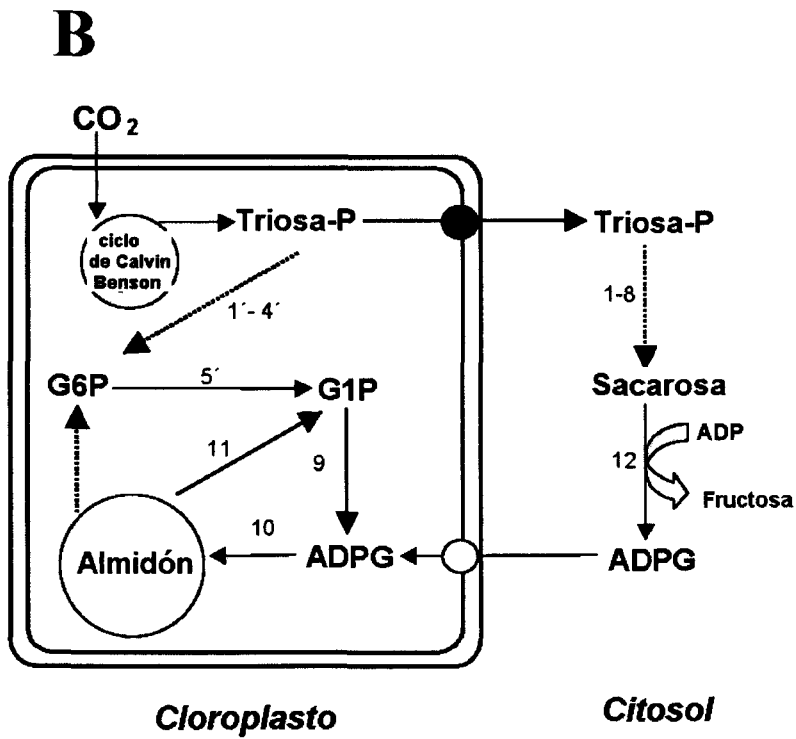
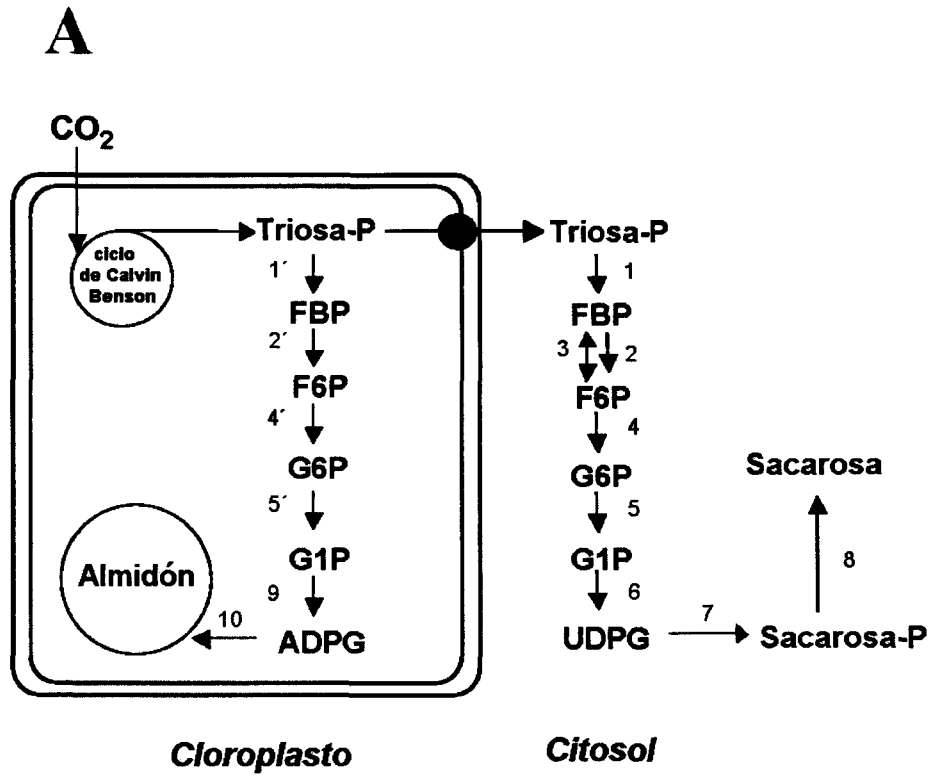
REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para incrementar el crecimiento de una planta y/o alterar su patrón de desarrollo **caracterizado** por que la planta se cultiva en presencia de un cultivo de un microorganismo que produce compuestos volátiles, sin que exista contacto entre la planta y el microorganismo, o en presencia de los volátiles emitidos por el microorganismo, en el que el microorganismo es distinto de los aislados *Bacillus subtilis* GB03 y *Bacillus amyloliquefaciens* IN937.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que el microorganismo es una bacteria, una levadura o un hongo pluricelular microscópico.
3. Método según la reivindicación 2, en el que el microorganismo es una bacteria perteneciente a un género distinto de *Bacillus* o *Paenibacillus*.
- 15 4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el crecimiento del microorganismo se produce en un medio que carece de compuestos orgánicos que presenten grupos amino.
5. Método según la reivindicación 4, en el que el crecimiento del microorganismo se produce en un medio que carece de aminoácidos y/o proteínas.
- 20 6. Método según la reivindicación 4 ó 5, en el que el crecimiento del microorganismo se produce en un medio mínimo suplementado con un compuesto orgánico como fuente de carbono.
7. Método según la reivindicación 6, en el que el microorganismo es una bacteria perteneciente a un género del grupo de *Bacillus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Agrobacterium* o *Pseudomonas*.
- 25 8. Método según la reivindicación 6, en el que el microorganismo es un hongo perteneciente al género *Penicillium* o *Alternaria*.
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la planta es una angiosperma, monocotiledónea o dicotiledónea.
- 30 10. Método según la reivindicación 9, en el que la planta se selecciona del grupo de plantas de patata, plantas de maíz, plantas de tabaco, o plantas de la especie *Arabidopsis thaliana*.
- 35 11. Método según la reivindicación 10, en el que la planta es una planta de maíz, una planta de tabaco o una planta de la especie *Arabidopsis thaliana* que se cultiva en presencia de un hongo perteneciente al género *Alternaria* o *Penicillium* que se deja crecer en medio mínimo suplementado con una fuente de carbono orgánico, sin que exista contacto entre la planta y el microorganismo.
- 40 12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el incremento del crecimiento se manifiestan en aumento de la longitud de la planta y/o en aumento del tamaño de las hojas.
- 45 13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la alteración del patrón de crecimiento se manifiesta en incremento del número de hojas, incremento del número de ramas y/o del número de flores, frutos y semillas de plantas angiospermas, en la inducción de la floración, o en combinaciones de los anteriores.
- 50 14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la planta se cultiva en una atmósfera en la que están presentes los compuestos volátiles emitidos por un microorganismo que ha sido cultivado en un lugar diferente al lugar de cultivo de la planta.

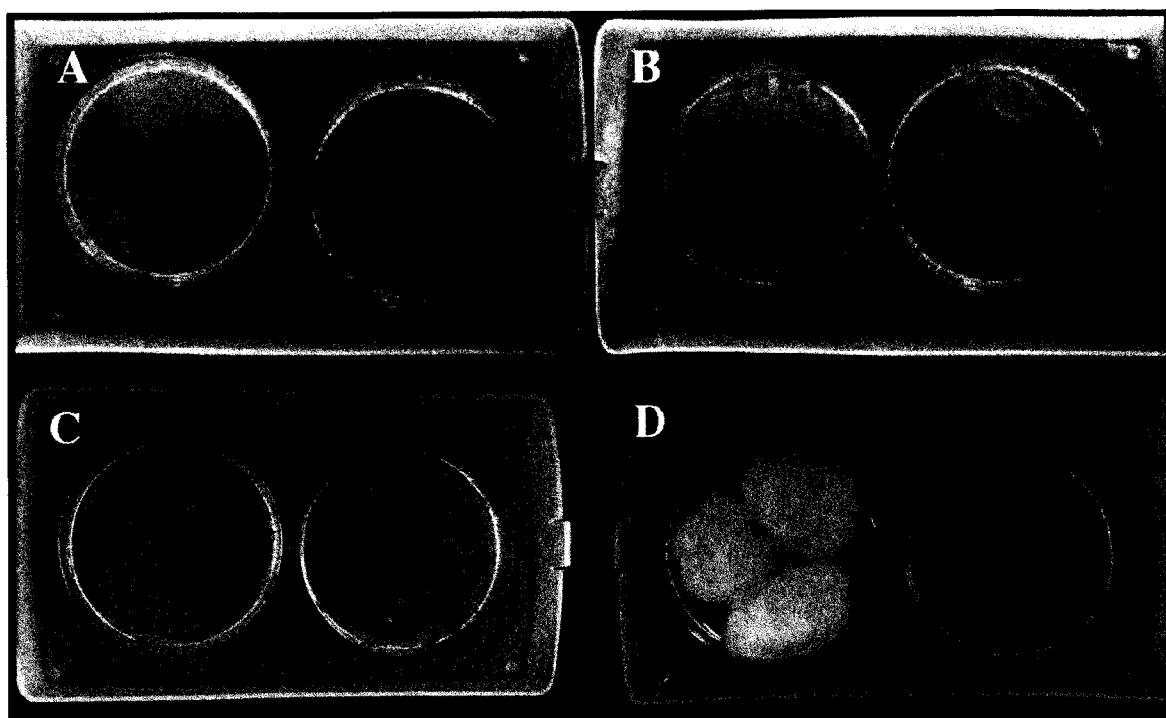
55

60

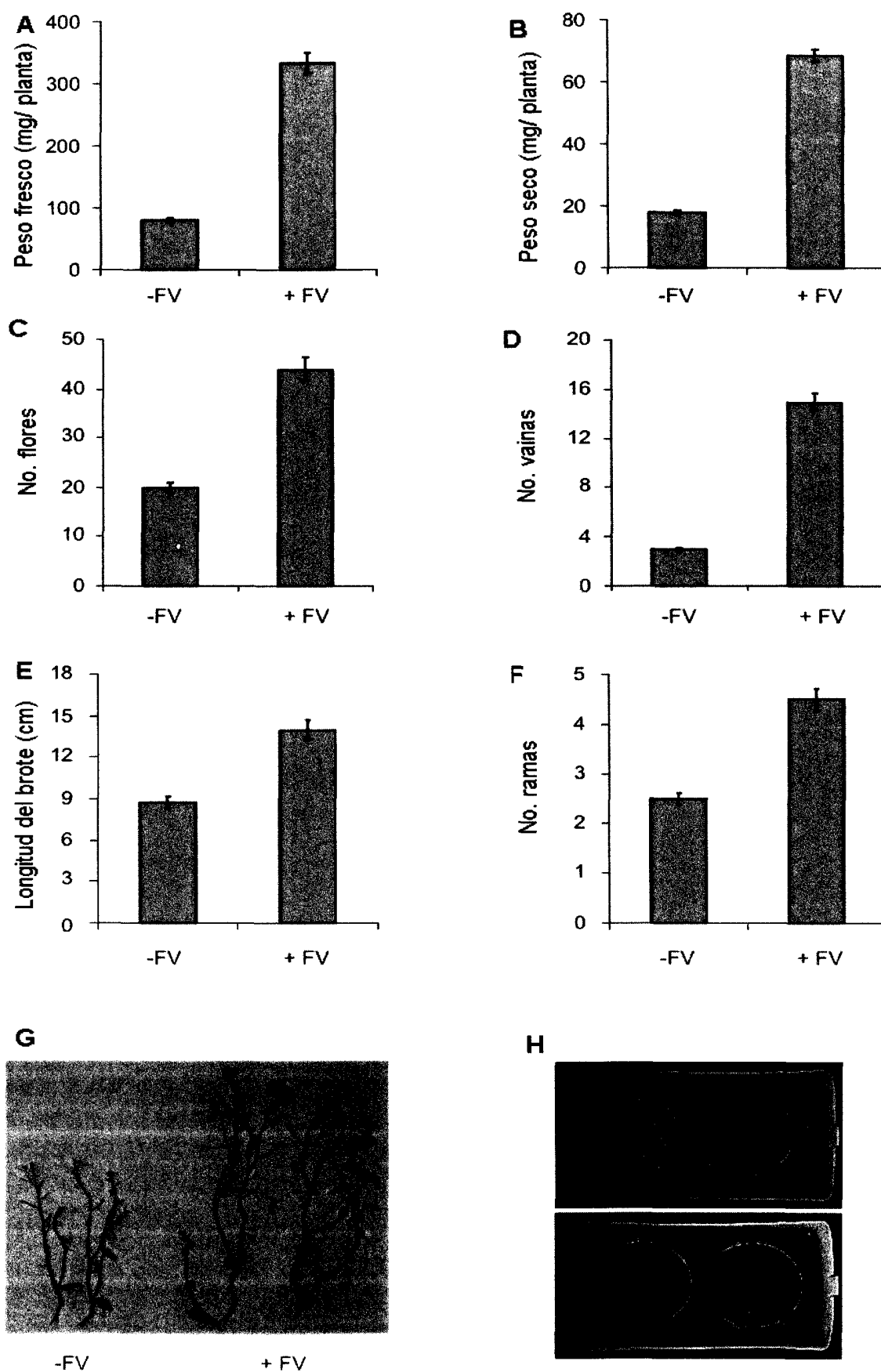
65



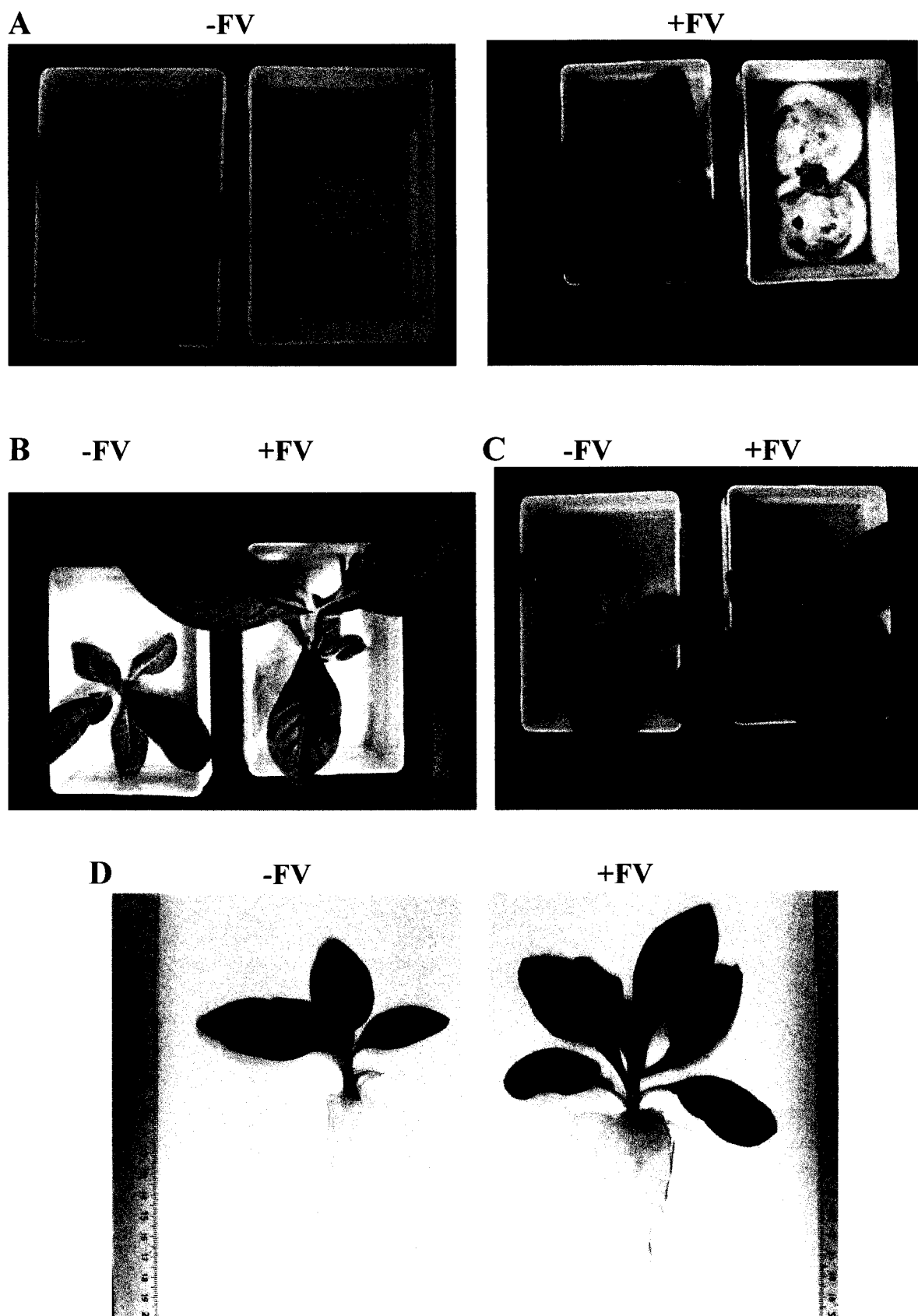
**Fig. 1**



**Fig. 2**

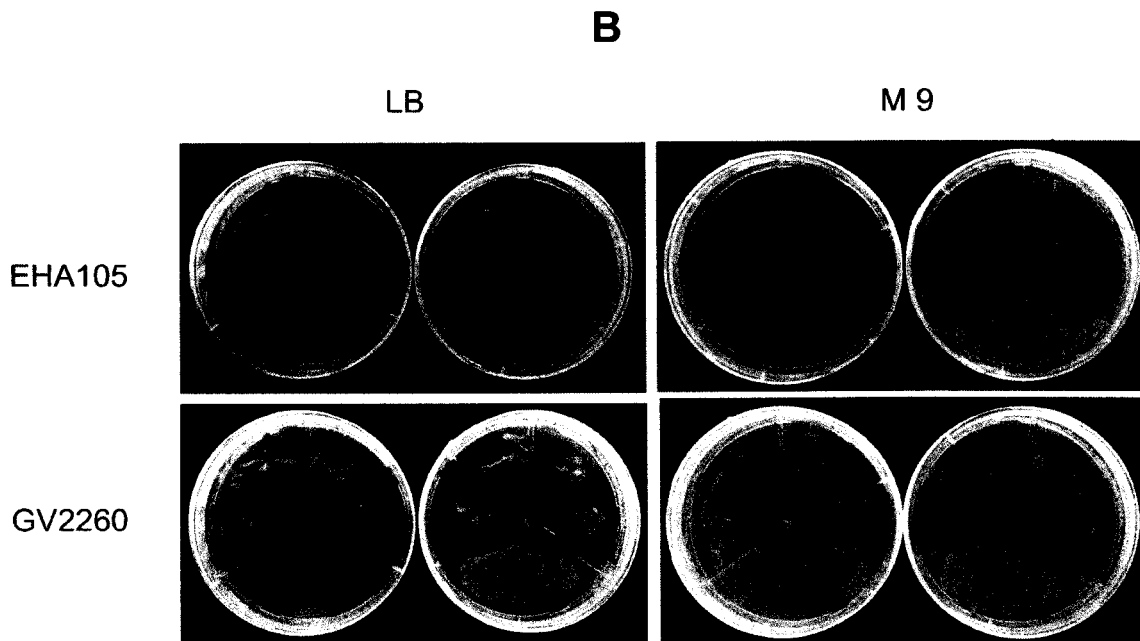
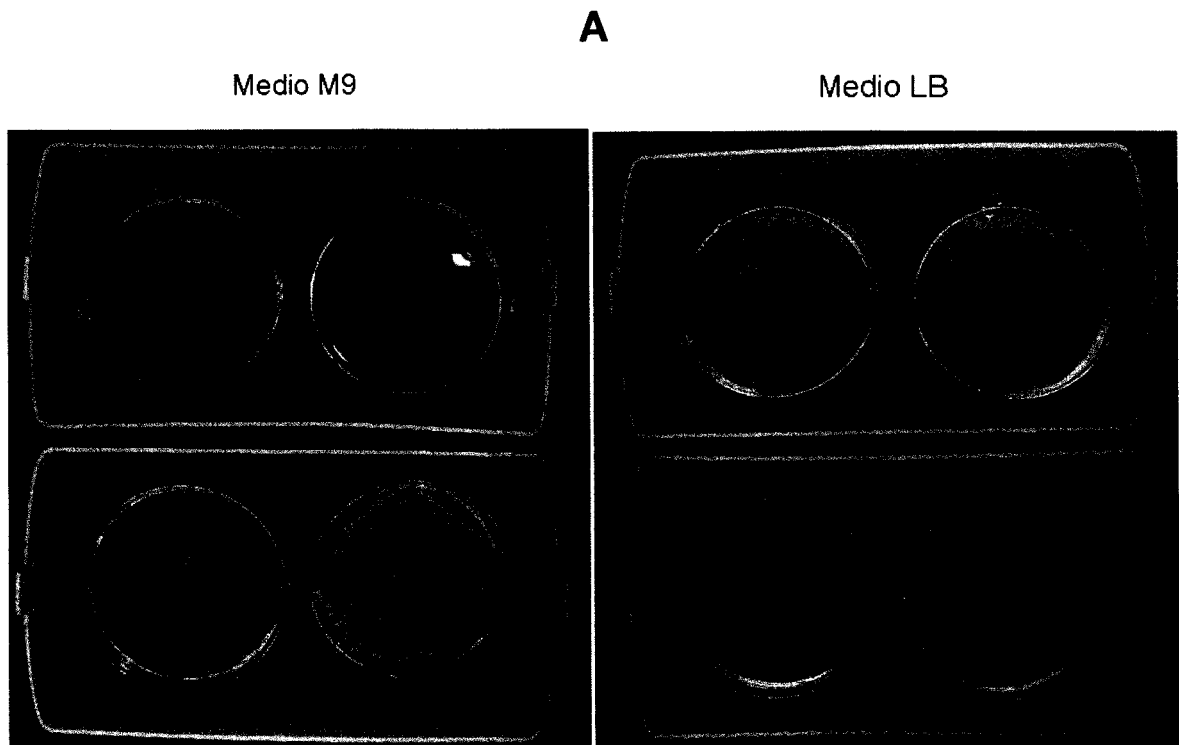


**Fig. 3**



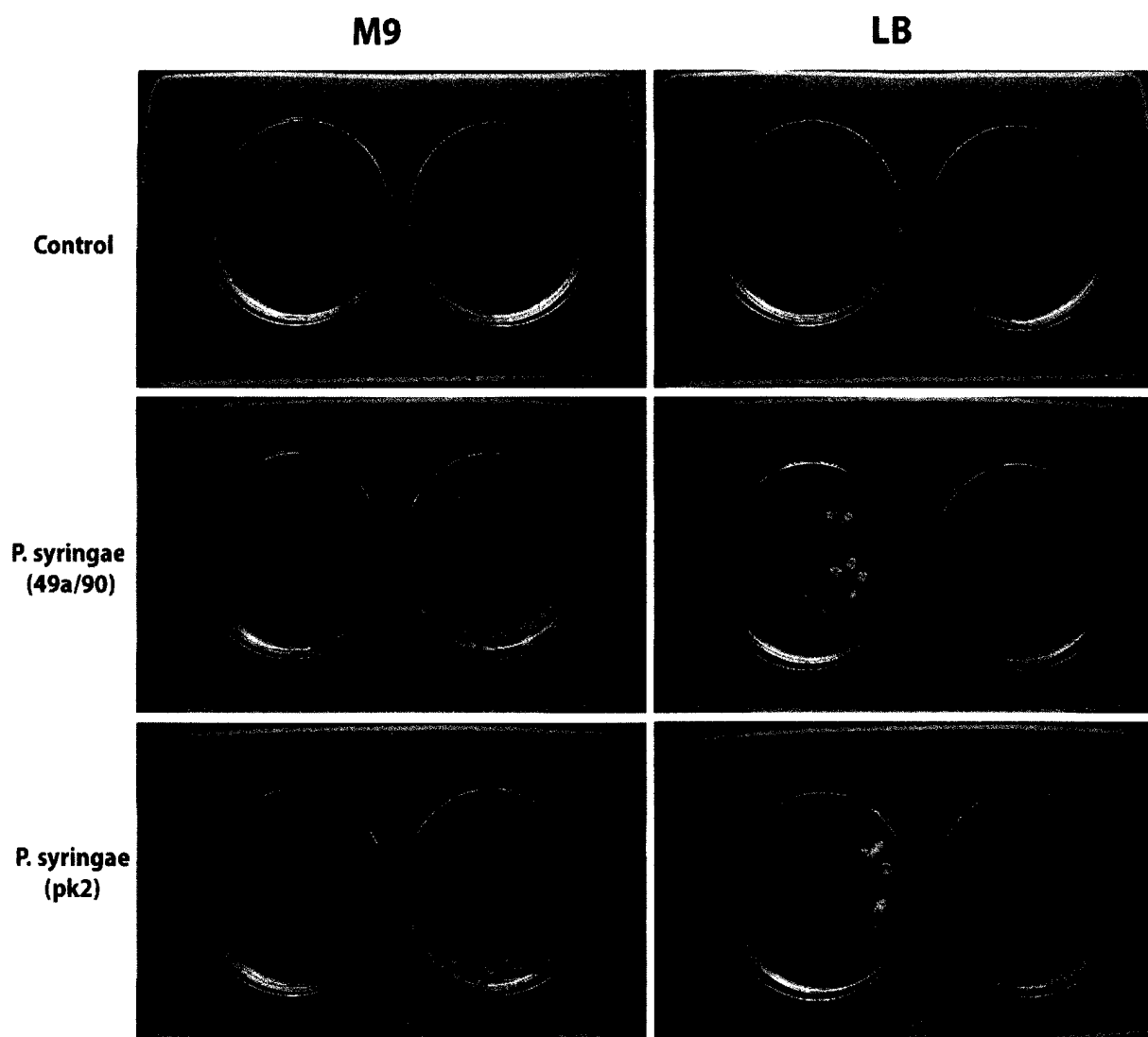
**Fig. 4**





**Fig. 5**

**C**



**Fig. 5 (cont.)**

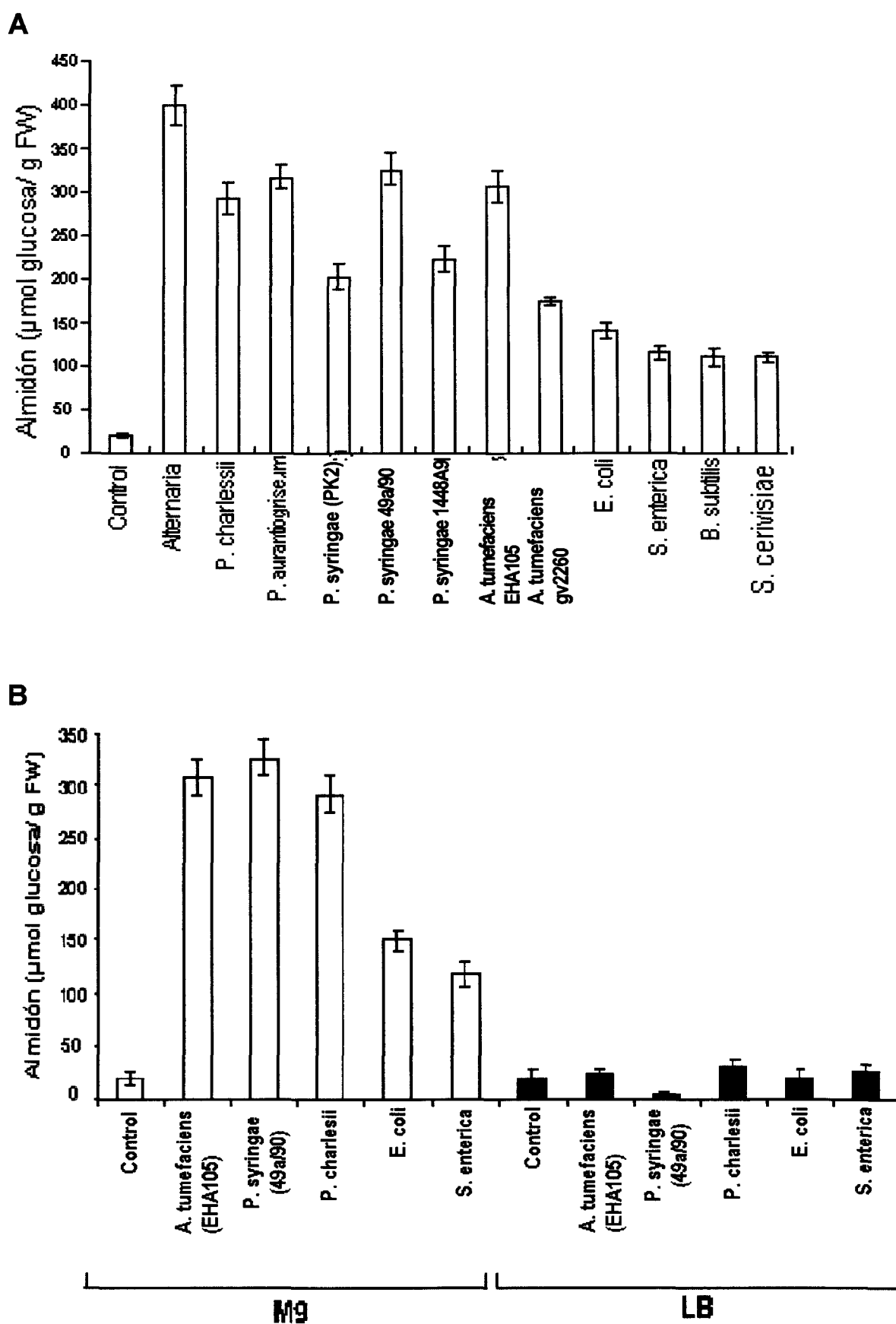


Fig. 6

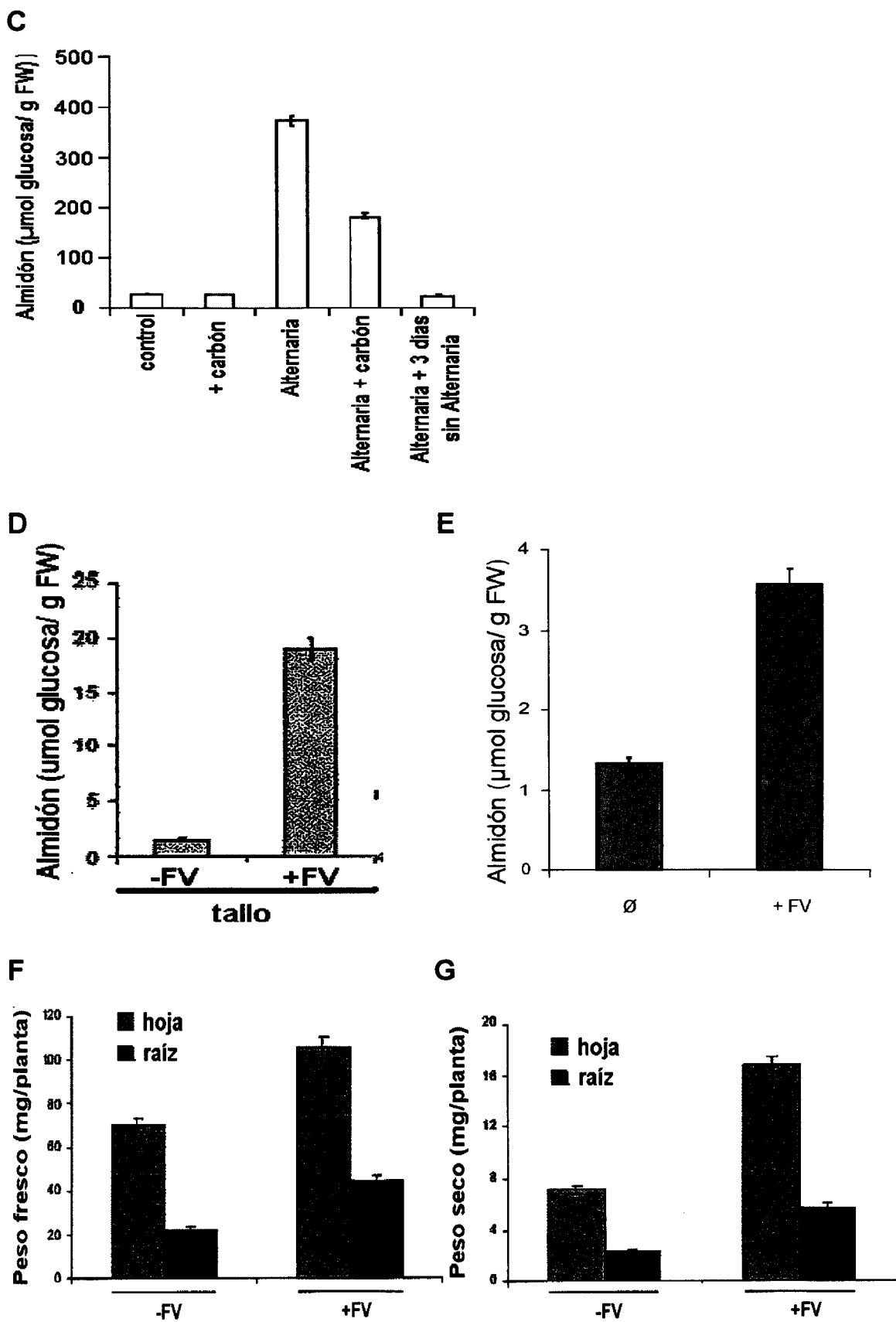
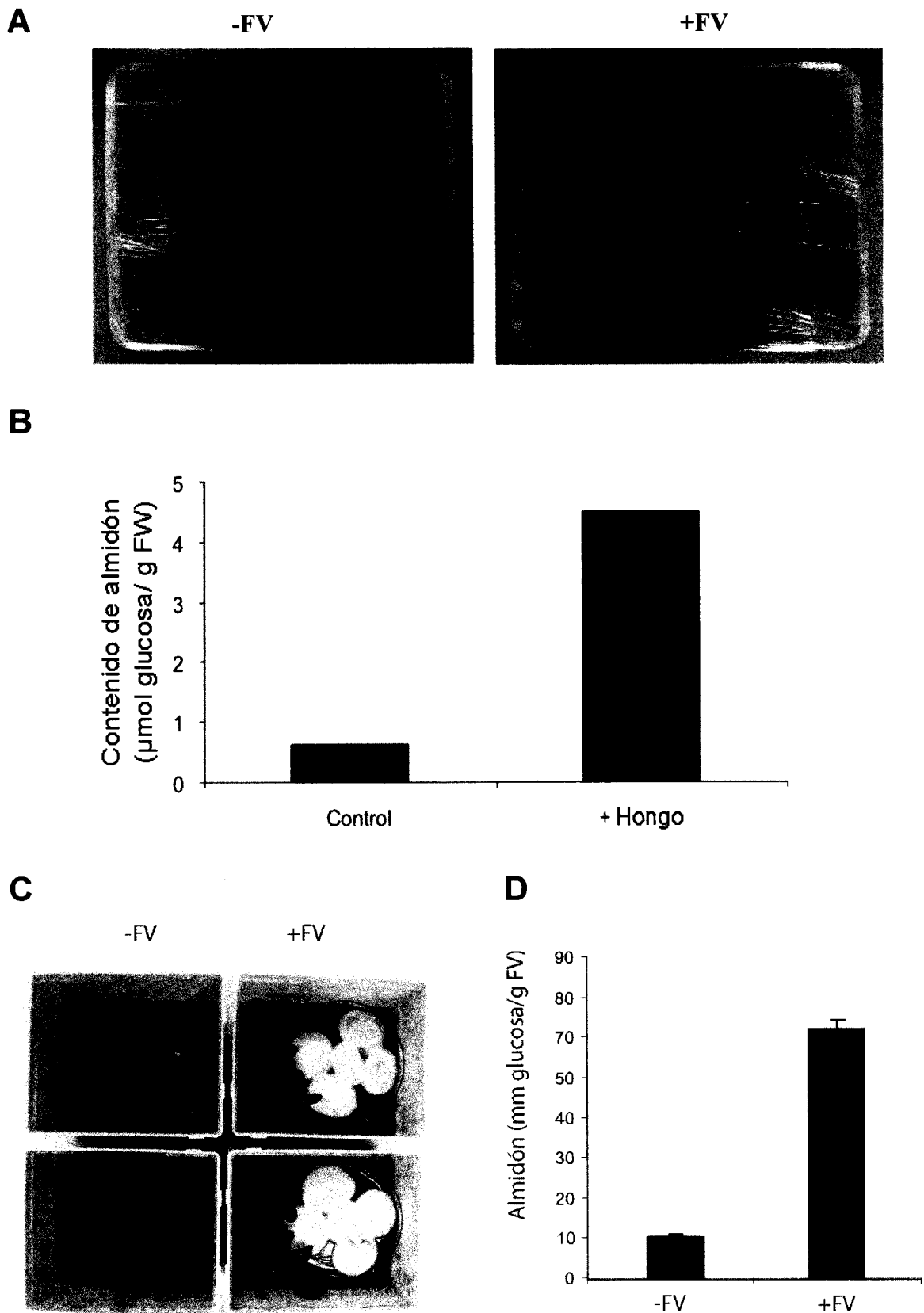


Fig. 6 (Cont.)



**Fig. 7**



Fig. 8

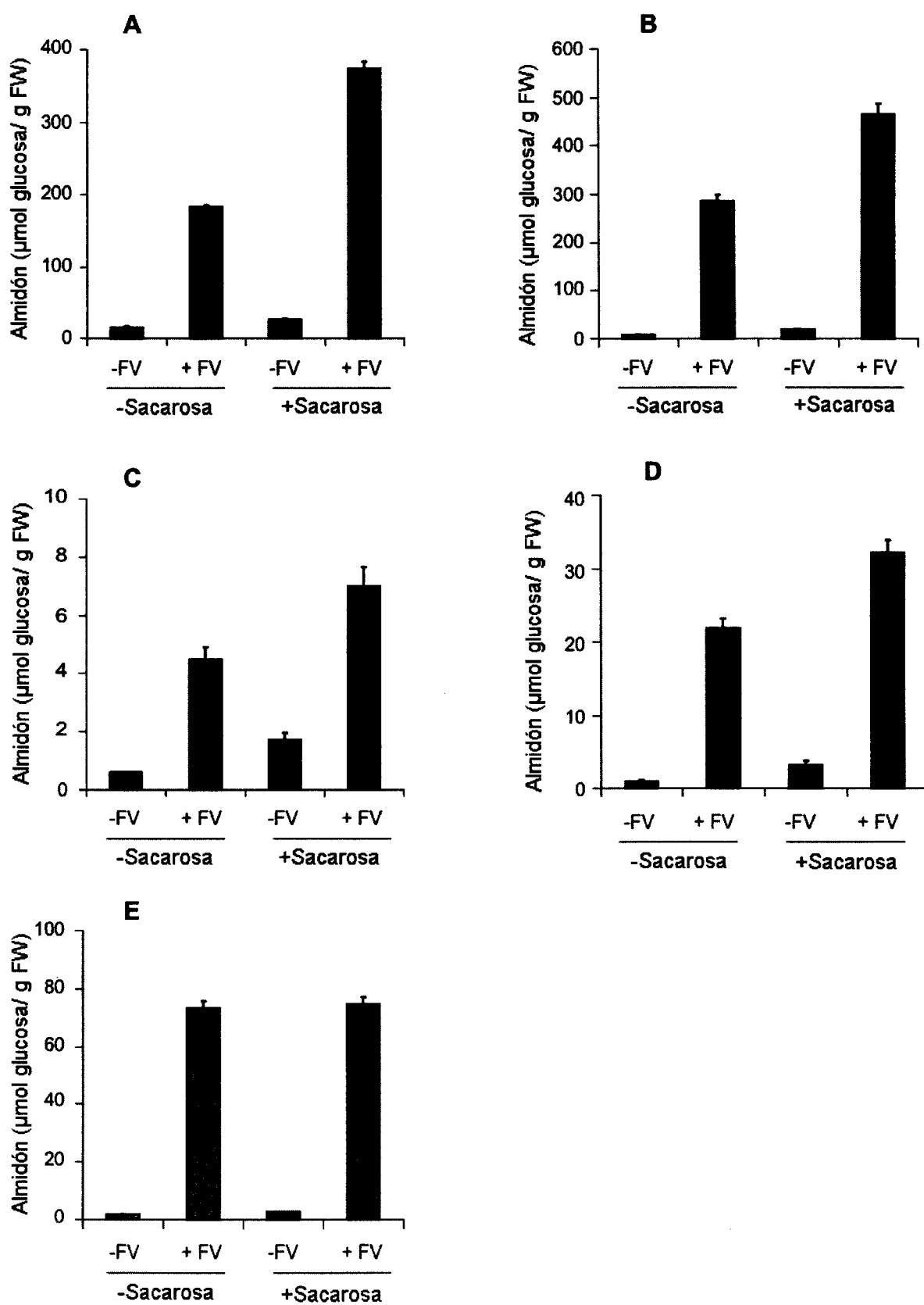
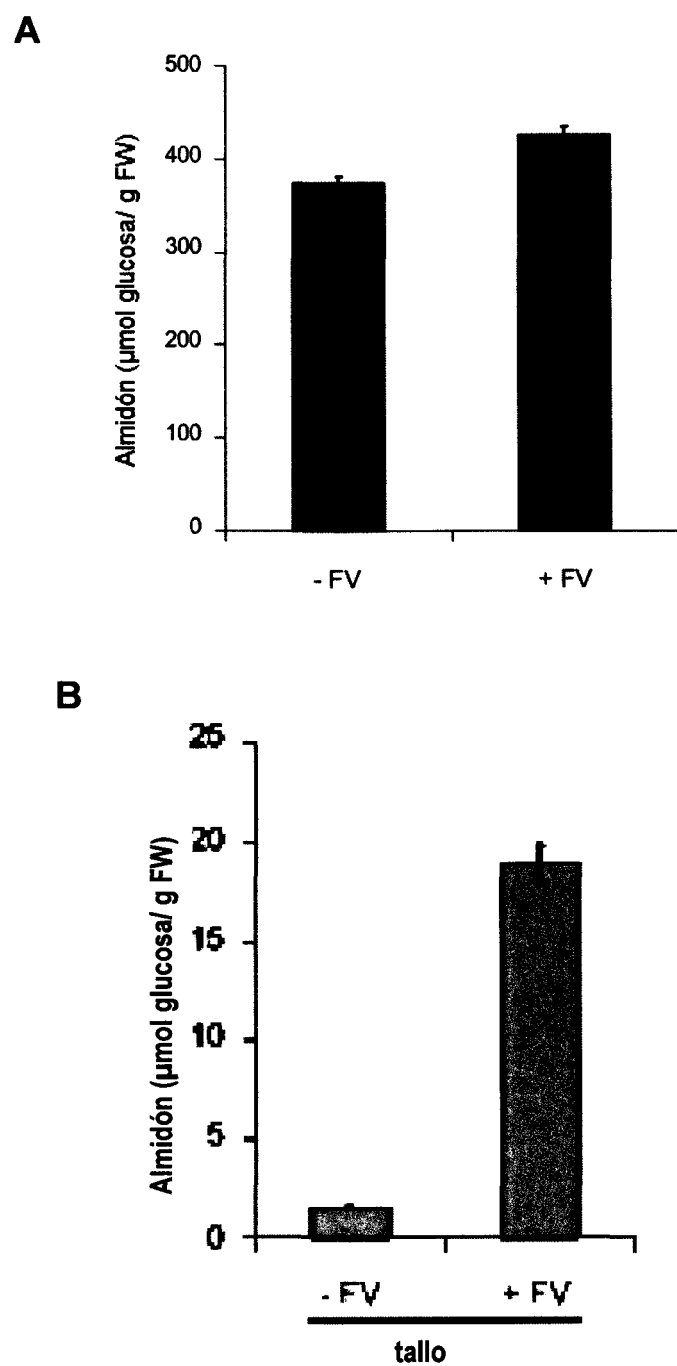


Fig. 9



**Fig. 10**



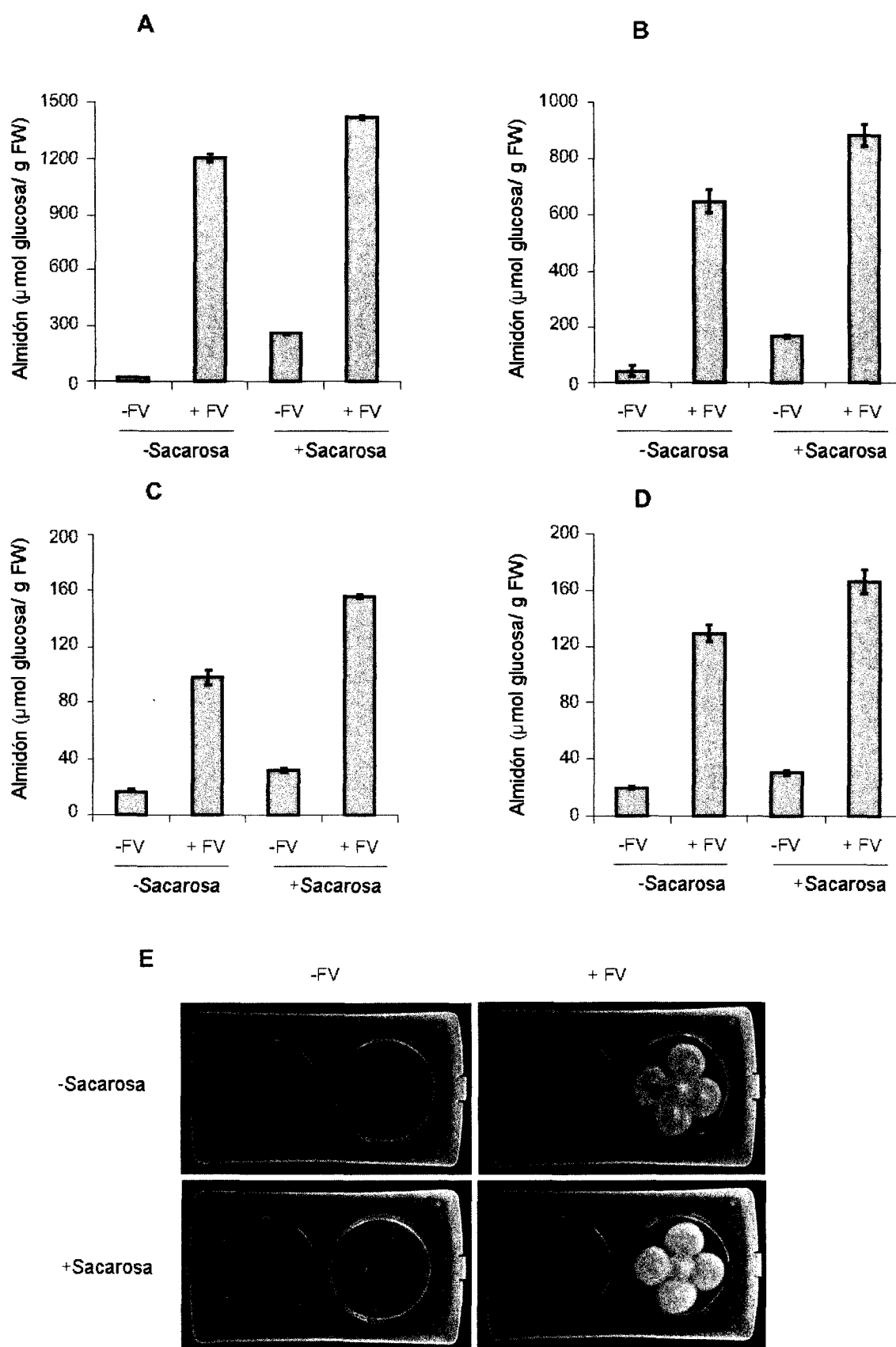


Fig. 11

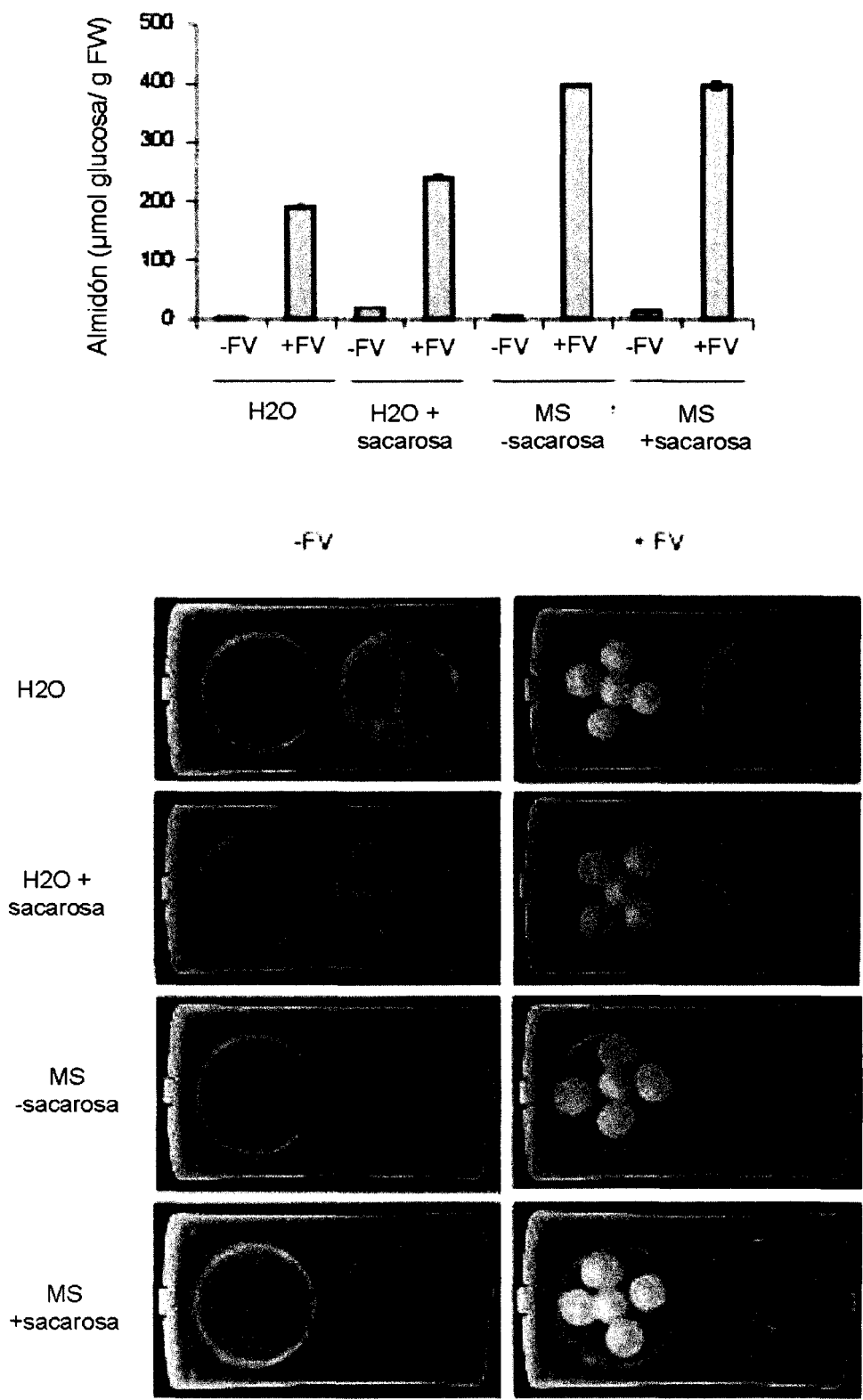


Fig. 12

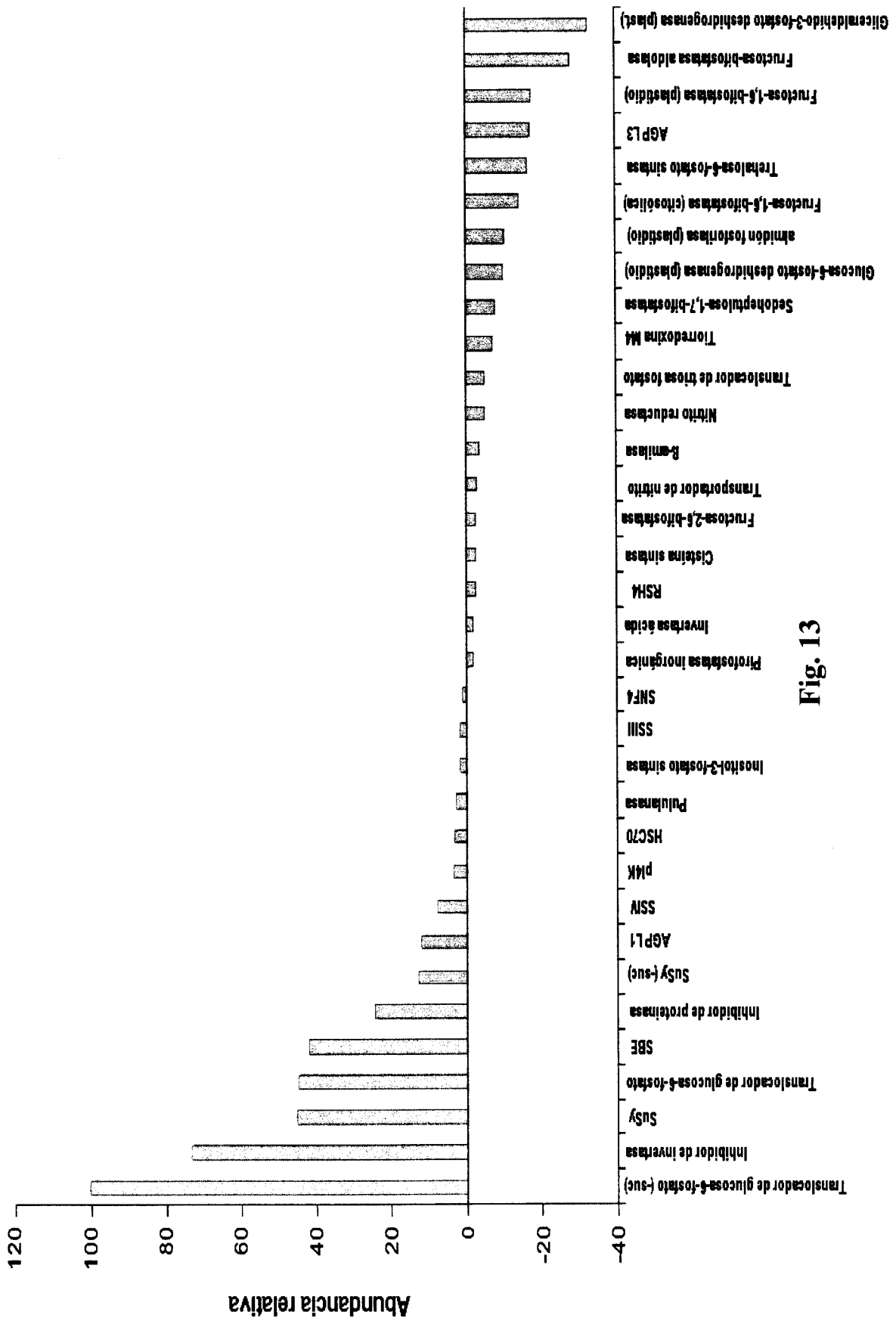
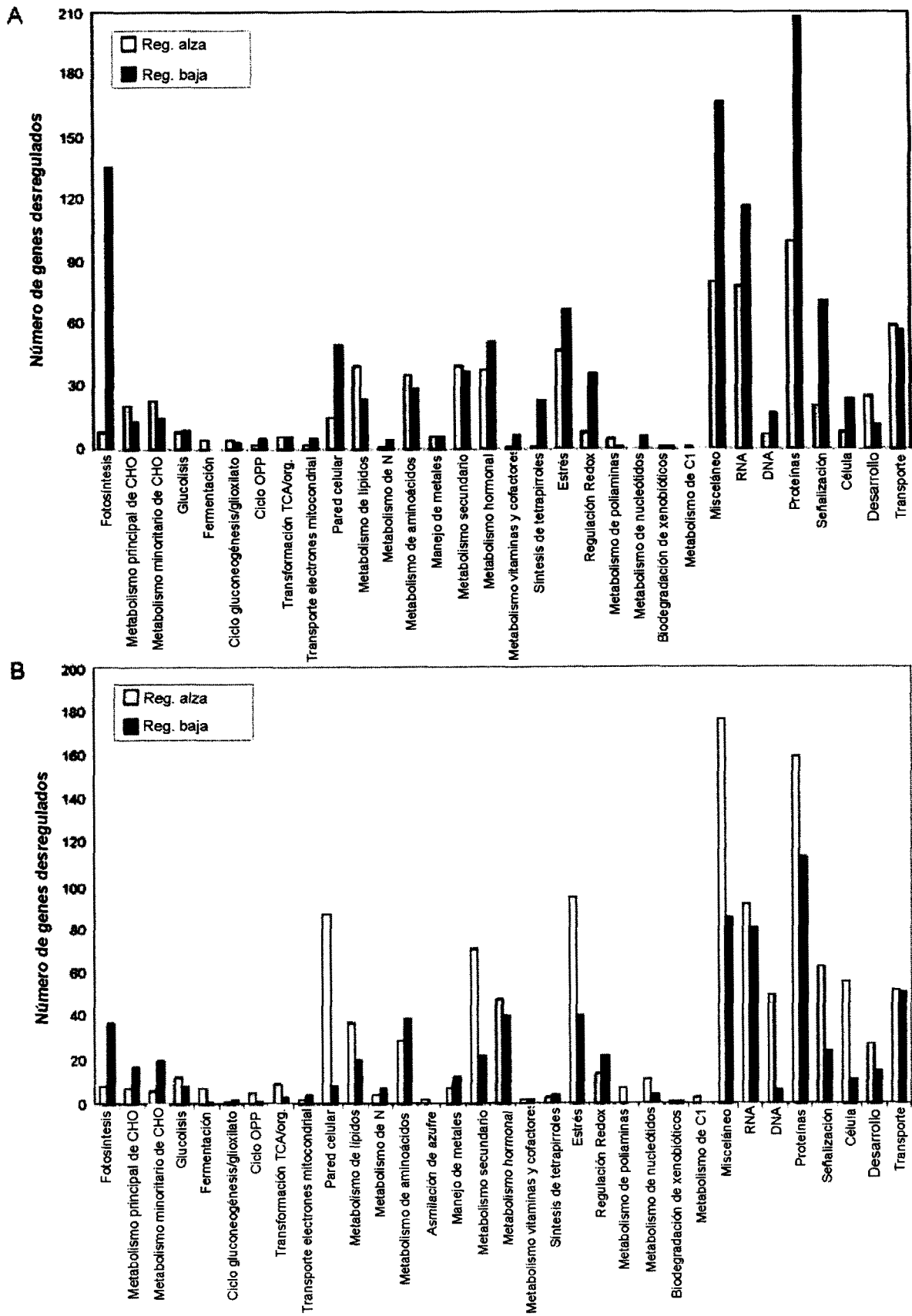
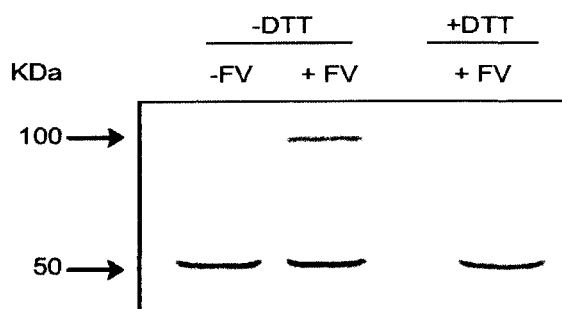
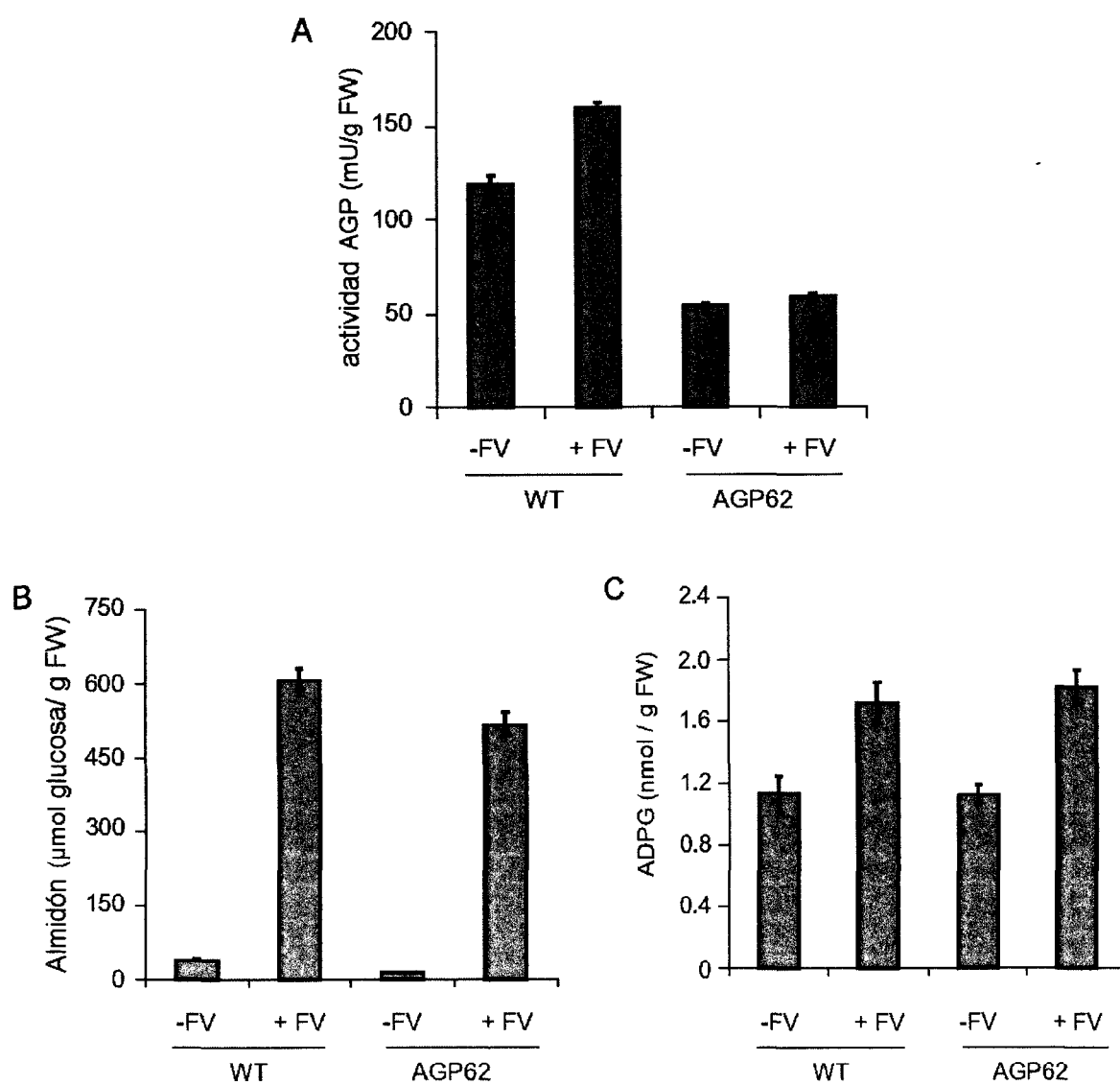


Fig. 13





**Fig. 15**



**Fig. 16**

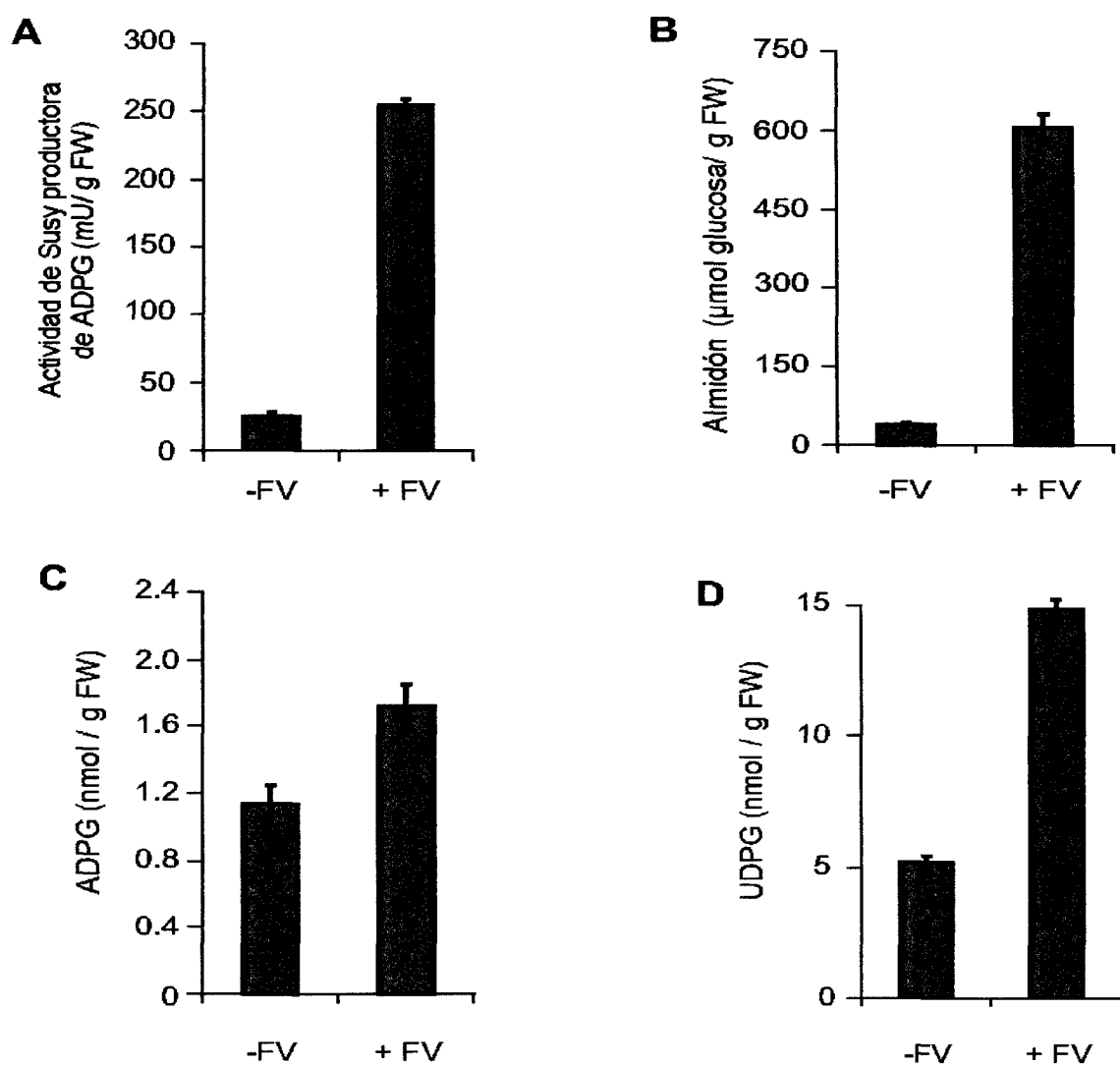


Fig. 17

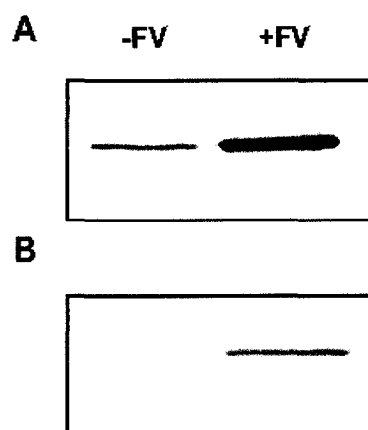


Fig. 18

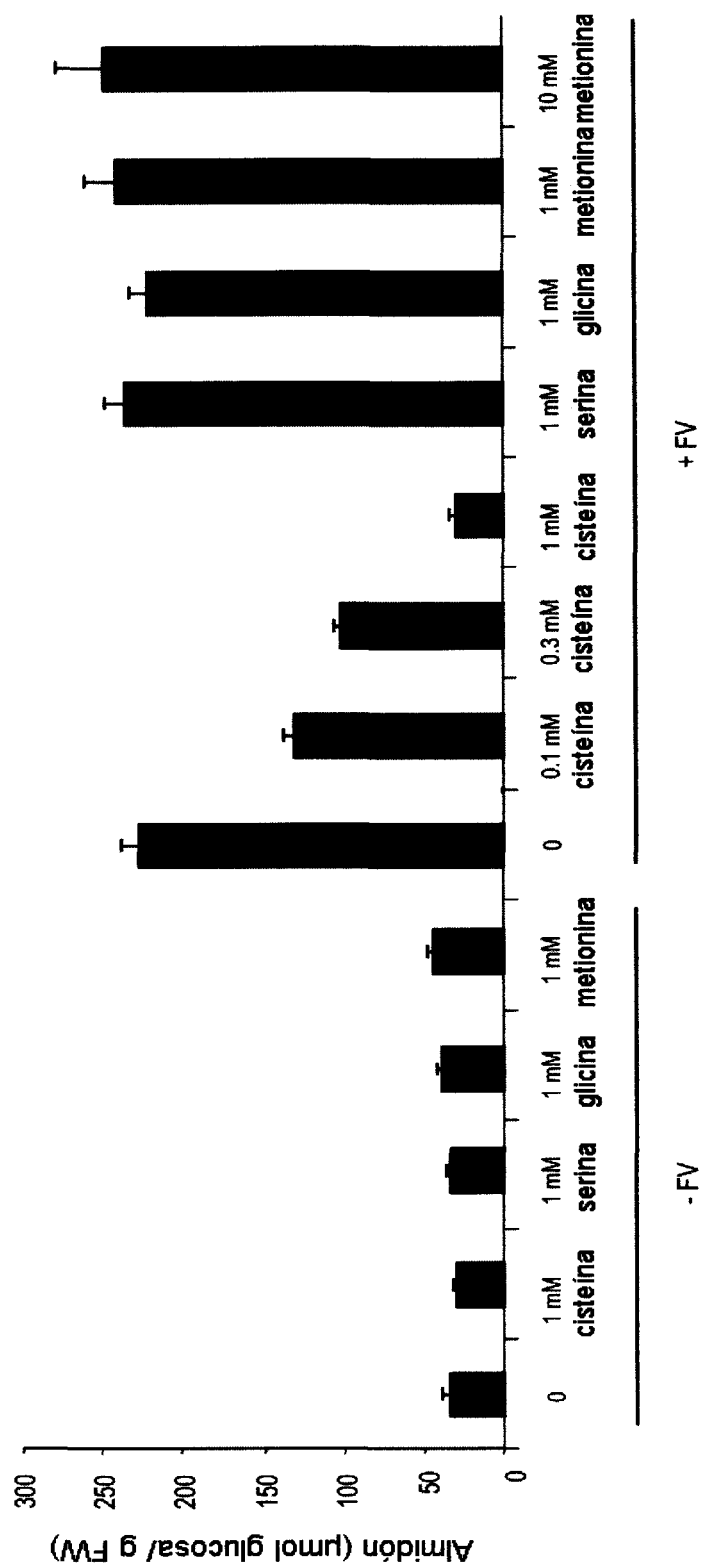


Fig. 19

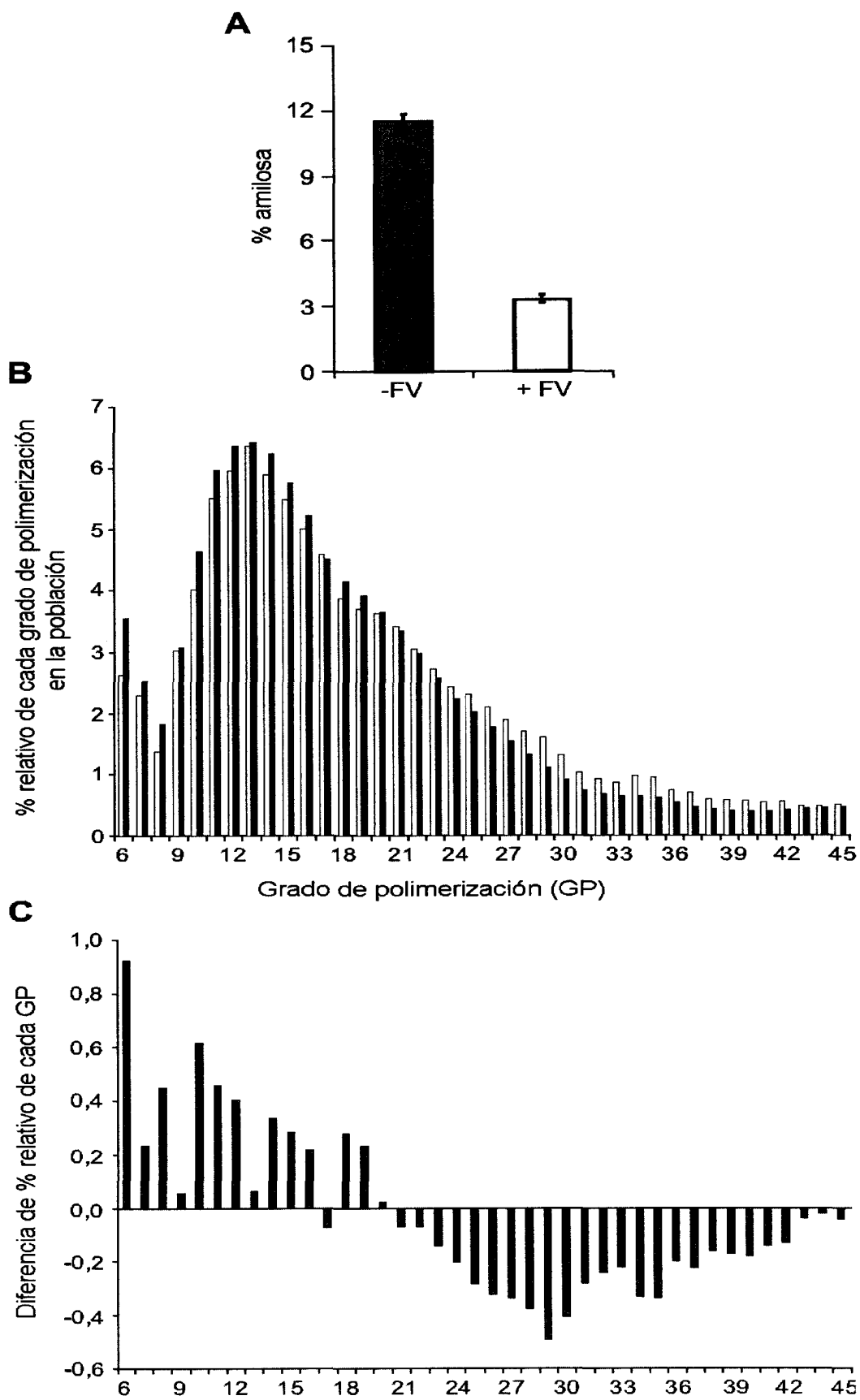
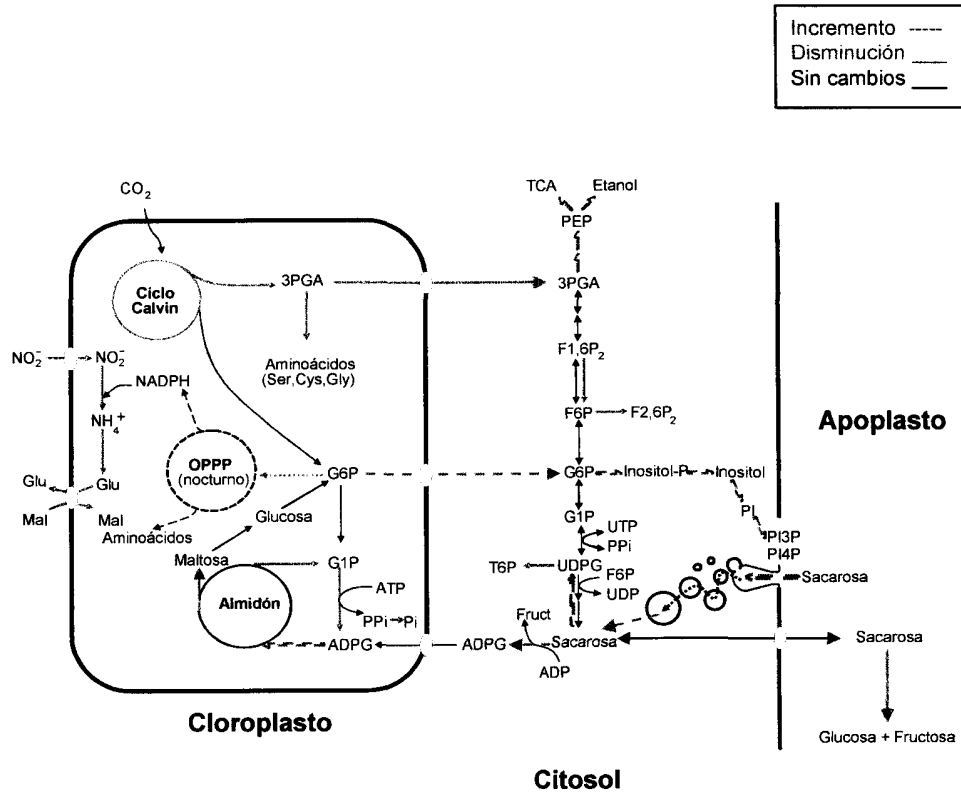


Fig. 20



A



B

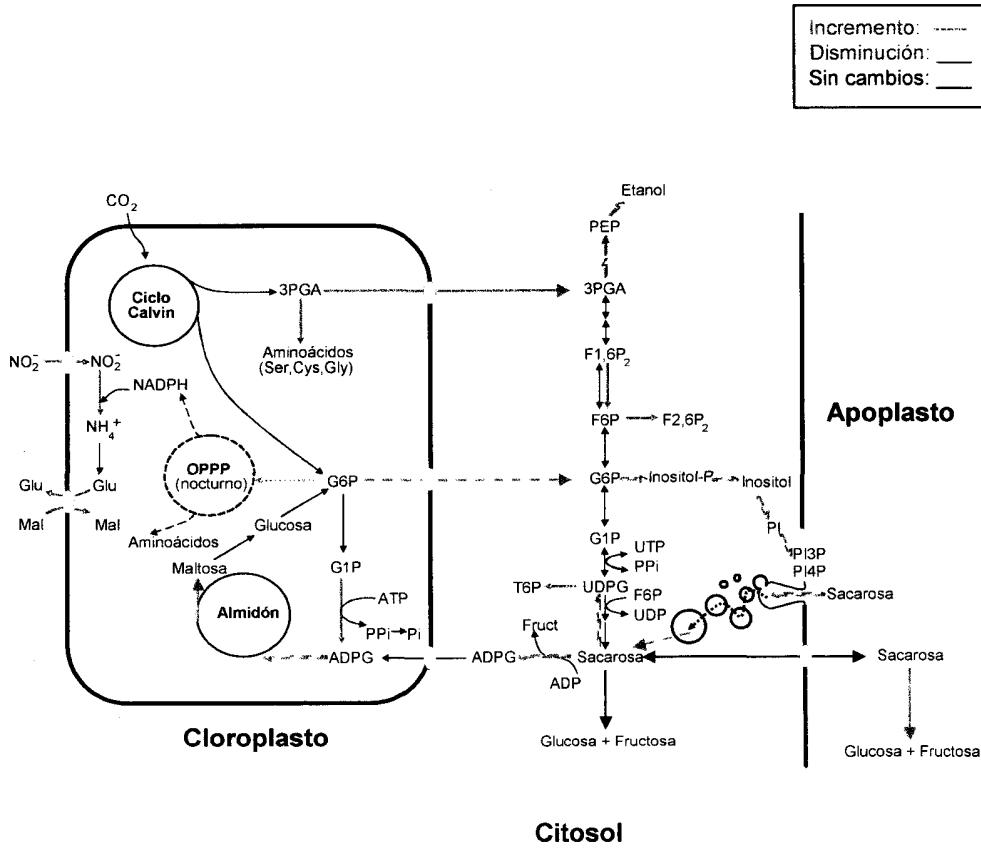


Fig. 21

# ES 2 372 071 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> IDEN BIOTECHNOLOGY, S.L.
- 5 <120> PROCEDIMIENTO PARA ALTERAR EL PATRÓN DE DESARROLLO, AUMENTAR EL CRECIMIENTO Y LA ACUMULACIÓN DE ALMIDÓN Y ALTERAR LA ESTRUCTURA DEL ALMIDÓN EN PLANTAS
- 10 <130> CO-30871
- <160> 72
- 15 <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 20
- 20 <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 25 <223> Cebador directo de RT-PCT para SNF4
- <400> 1
- 30 ccccgtagat ctcagaagca 20
- <210> 2
- <211> 20
- 35 <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 40 <223> Cebador inverso de RT-PCT para SNF4
- <400> 2
- 45 cagcgtggct gtatatggaa 20
- <210> 3
- 50 <211> 20
- <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- 55 <220>
- <223> Cebador directo de RT-PCT para 1-fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinasa
- <400> 3
- 60 acacaagaag tggggaatgg 20
- <210> 4
- 65 <211> 20
- <212> DNA
- <213> Secuencia artificial

## ES 2 372 071 A1

<220>

<223> Cebador inverso de RT-PCT para 1-fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinasa

5 <400> 4

ttttctgctg ccttcctagc

20

10 <210> 5

<211> 20

<212> DNA

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo de RT-PCT para pululanasa

20

<400> 5

gcgtaaaca taccgccagt

20

25

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

30 <213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Cebador inverso de RT-PCT para pululanasa

<400> 6

40

cagggtcaaac cgaaatccat

20

<210> 7

<211> 20

45 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Cebador directo de RT-PCT para translocador de triosa fosfato/3-fosfoglicerato

<400> 7

55

caagatttcc cccattgcta

20

<210> 8

60 <211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> Cebador directo de RT-PCT para translocador de triosa fosfato/3-fosfoglicerato

## ES 2 372 071 A1

<400> 8  
ttccaaccgc atgtgtaaga 20  
5  
<210> 9  
<211> 20  
<212> DNA  
10 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador directo de RT-PCT para transportador de nitrito  
15  
<400> 9  
caaatacctc cagccagcat 20  
20  
<210> 10  
<211> 20  
<212> DNA  
25 <213> Secuencia artificial  
<220>  
30 <223> Cebador inverso de RT-PCT para transportador de nitrito  
<400> 10  
35 tgtgaatcga cgagcaaaag 20  
<210> 11  
40 <211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial  
45 <220>  
<223> Cebador directo de RT-PCT para trehalosa-6-fosfato sintasa  
<400> 11  
50 cgattttcag tggatgcaga 20  
<210> 12  
55 <211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial  
60 <220>  
<223> Cebador inverso de RT-PCT para trehalosa-6-fosfato sintasa  
65 <400> 12  
gatgatgccca aacaagagca 20

## ES 2 372 071 A1

<210> 13  
<211> 21  
<212> DNA  
5 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador directo de RT-PCT para la almidón fosforilasa (forma plastidial)  
10  
<400> 13

aaccaagtgg acaggatctg a 21

15  
<210> 14  
<211> 20  
<212> DNA  
20 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador inverso de RT-PCT para la almidón fosforilasa (forma plastidial)  
25  
<400> 14

cttttgcctt cctccactca 20

30  
<210> 15  
<211> 20  
<212> DNA  
35 <213> Secuencia artificial

<220>  
40 <223> Cebador directo de RT-PCT para beta-amilasa BMYI  
<400> 15

gaggtaaacac gaggcttcca 20

45  
<210> 16  
<211> 20  
50 <212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
55 <223> Cebador INERSO de RT-PCT para beta-amilasa BMYI  
<400> 16

cacaactgca acctctgcat 20

60  
<210> 17  
65 <211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

## ES 2 372 071 A1

<220>  
<223> Cebador directo de RT-PCT para tiorredoxina M4

5 <400> 17  
aagttacccg tcctggttga 20

10 <210> 18  
<211> 20  
<212> DNA  
15 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador inerso de RT-PCT para tiorredoxina M4

20 <400> 18  
acttgccagc gtattcctgt 20

25 <210> 19  
<211> 20  
<212> DNA  
30 <213> Secuencia artificial

<220>  
35 <223> Cebador directo de RT-PCT para nitrito reductasa

<400> 19  
40 tgcagacatt ggattcatgg 20

<210> 20  
<211> 21  
45 <212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
50 <223> Cebador inverso de RT-PCT para nitrito reductasa

<400> 20  
55 ctcccaaatg tgaatcactc c 21

<210> 21  
60 <211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

65 <220>  
<223> Cebador directo de RT-PCT para cisteína sintasa

# ES 2 372 071 A1

<400> 21  
 tgcctgcatc aatgagtctt 20  
 5  
 <210> 22  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 10 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador inverso de RT-PCT para cisteína sintasa  
 15  
 <400> 22  
 cagcctttga aacagctcct 20  
 20  
 <210> 23  
 <211> 20  
 25 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> Cebador directo de RT-PCT para pirofosfatasa inorgánica  
 <400> 23  
 35 acagcccgaa accctagatt 20  
 <210> 24  
 <211> 20  
 40 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 45 <223> Cebador inverso de RT-PCT para pirofosfatasa inorgánica  
 <400> 24  
 50 tgaaaacacc atcaccoaaa 20  
 <210> 25  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> Cebador directo de RT-PCT para invertasa ácida  
 <400> 25  
 65  
 aatggagcag cacgactctt 20

## ES 2 372 071 A1

<210> 26  
<211> 20  
<212> DNA  
5 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador inverso de RT-PCT para invertasa ácida  
10  
<400> 26  
          agtcttgcaa ggggaaggat 20

15 <210> 27  
<211> 20  
<212> DNA  
20 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador directo de RT-PCT para glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (forma plastidial)  
25  
<400> 27  
          cgaggagggt actttgacca 20

30  
<210> 28  
<211> 20  
<212> DNA  
35 <213> Secuencia artificial

<220>  
40 <223> Cebador inverso de RT-PCT para glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (forma plastidial)  
  
<400> 28

45        caagctgaca ggtgtttcca 20

<210> 29  
<211> 20  
50 <212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
55 <223> Cebador directo de RT-PCT para almidón sintasa III  
  
<400>> 29

60        cgaaagggtg cgtatatggt 20

<210> 30  
<211> 20  
65 <212> DNA  
<213> Secuencia artificial



## ES 2 372 071 A1

<220>  
<223> Cebador reverso de RT-PCT para almidón sintasa III

5 <400> 30  
tccggactaa atccaccttg 20

10 <210> 31  
<211> 20  
<212> DNA  
15 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador directo de RT-PCT para inositol-3-fosfato sintasa

20 <400> 31  
caagagggca atggatgagt 20

25 <210> 32  
<211> 20  
<212> DNA  
30 <213> Secuencia artificial

<220>  
35 <223> Cebador inverso de RT-PCT para inositol-3-fosfato sintasa

<400> 32  
40 attggagcag ccaaagaga 20

<210> 33  
<211> 20  
45 <212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
50 <223> Cebador directo de RT-PCT para fructosa-2,6-bifosfatasa

<400> 33  
55 tgggacagat ggcaactatca 20

<210> 34  
60 <211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

65 <220>  
<223> Cebador inverso de RT-PCT para fructosa-2,6-bifosfatasa

## ES 2 372 071 A1

<400> 34  
atccgggaca attacttcca 20  
5  
<210> 35  
<211> 25  
<212> DNA  
10 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador directo de RT-PCT para el RNA 18S  
15  
<400> 35  
gggcattcgt atttcatagt cagag 25  
20  
<210> 36  
<211> 26  
<212> DNA  
25 <213> Secuencia artificial  
<220>  
30 <223> Cebador inverso de RT-PCT para el RNA 18S  
<400> 36  
35 cggttcttga ttaatgaaaa catcct 26  
<210> 37  
40 <211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial  
45 <220>  
<223> Cebador directo de RT-PCT para el translocador de glucosa-6-fosfato  
<400> 37  
50 tgactggaga tggatgtgga 20  
<210> 38  
55 <211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial  
60 <220>  
<223> Cebador inverso de RT-PCT para el translocador de glucosa-6-fosfato  
65 <400> 38  
gatgggaatt gcagctagga 20

## ES 2 372 071 A1

<210> 39  
<211> 20  
<212> DNA  
5 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador directo de RT-PCT para el inhibidor de proteasas I  
10  
<400>> 39

tgaaactctc atggcacgaa 20

15  
<210> 40  
<211> 20  
<212> DNA  
20 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador inverso de RT-PCT para el inhibidor de proteasas I  
25  
<400> 40

tggccagctt agttttccat 20

30  
<210> 41  
<211> 19  
<212> DNA  
35 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador directo de RT-PCT para la enzima ramificante del alfa-glucano  
40  
<400> 41

aatttggtgg ccatggaag 19

45  
<210> 42  
<211> 20  
<212> DNA  
50 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador inverso de RT-PCT para la enzima ramificante del alfa-glucano  
55  
<400> 42

aggaatttgg acgaccattg 20

60  
<210> 43  
<211> 21  
<212> DNA  
65 <213> Secuencia artificial

## ES 2 372 071 A1

<220>  
<223> Cebador directo de RT-PCT para la ADP-glucosa pirofosforilasa L3

5 <400> 43

caggtgaggc taagttgaag g 21

10 <210> 44  
<211> 20  
<212> DNA  
15 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador inverso de RT-PCT para la ADP-glucosa pirofosforilasa L3

20 <400> 44

25 gagggggaaa agacgagttc 20

<210> 45  
<211> 20  
30 <212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
35 <223> Cebador directo de RT-PCT para la ADP-glucosa pirofosforilasa L1

<400> 45

40 ggtgaaagat cgcgcttaga 20

<210> 46  
45 <211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Cebador inverso de RT-PCT para la ADP-glucosa pirofosforilasa L1

<400> 46

55 ctgctaacag ggaggcaatc 20

60 <210> 47  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

65 <220>  
<223> Cebador directo de RT-PCT para la invertasa de tubérculo tipo Kunitz

## ES 2 372 071 A1

<400> 47  
aaaccttcaa tgcccaaatg 20  
5  
<210> 48  
<211> 20  
<212> DNA  
10 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador inverso de RT-PCT para la invertasa de tubérculo tipo Kunitz  
15  
<400> 48  
attccgactc cgacttacga 20  
20  
<210> 49  
<211> 20  
<212> DNA  
25 <213> Secuencia artificial  
<220>  
30 <223> Cebador directo de RT-PCT para la sacarosa sintasa 4  
<400> 49  
35 tgggaataca tccgtgtgaa 20  
<210> 50  
<211> 20  
40 <212> DNA  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
45 <223> Cebador inverso de RT-PCT para la sacarosa sintasa 4  
<400> 50  
50 gctccgtcga caagttcttc 20  
<210> 51  
55 <211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial  
60 <220>  
<223> Cebador directo de RT-PCT para la chaperona tipo dnaK Hsc70  
65 <400> 51  
tgcaagctgc aatcttgagt 20

## ES 2 372 071 A1

<210> 52  
<211> 20  
<212> DNA  
5 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador inverso de RT-PCT para la chaperona tipo dnaK Hsc70  
10  
<400> 52  
acacctccag cagtctccag 20

15  
<210> 53  
<211> 20  
<212> DNA  
20 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador directo de RT-PCT para la almidón sintasa IV  
25  
<400> 53  
catcgtctct tgcgcctaat 20

30  
<210> 54  
<211> 20  
<212> DNA  
35 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador inverso de RT-PCT para la almidón sintasa IV  
40  
<400> 54  
atggccttac tgctgacgtt 20

45  
<210> 55  
<211> 20  
<212> DNA  
50 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador directo de RT-PCT para la proteína RSH4 similar a Real-SpoT  
55  
<400> 55  
acaagggcgg tgttactgat 20

60  
<210> 56  
<211> 20  
<212> DNA  
65 <213> Secuencia artificial

## ES 2 372 071 A1

<220>

<223> Cebador inverso de RT-PCT para la proteína RSH4 similar a Real-SpoT

5 <400> 56

tcgccgaagg aaaatctcta

20

10 <210> 57

<211> 20

<212> DNA

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo de RT-PCT para la sedoheptulosa-1,7-bifosfatasa

20 <400> 57

gaaccatctt tggcgtatgg

20

25

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

30 <213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Cebador inverso de RT-PCT para la sedoheptulosa-1,7-bifosfatasa

<400> 58

40 catatgtagt tcgcggtcca

20

<210> 59

<211> 20

45 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Cebador inverso de RT-PCT para la fructosa-bifosfato aldolasa

<400> 59

55 ggaaaggtat tttggcagca

20

<210> 60

60 <211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> Cebador inverso de RT-PCT para la fructosa-bifosfato aldolasa

## ES 2 372 071 A1

<400> 60

5 gttgacgaag tgcttgacga 20

<210> 61  
<211> 20  
<212> DNA  
10 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador directo de RT-PCT para la fructosa-1,6-bifosfatasa cloroplástica

15 <400> 61

20 ttcgatggct tgtaagcaga 20

<210> 62  
<211> 20  
25 <212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
30 <223> Cebador inverso de RT-PCT para la fructosa-1,6-bifosfatasa cloroplástica

<400> 62

35 ttttggtcct ctccatgagc 20

<210> 63  
<211> 20  
40 <212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
45 <223> Cebador inverso de RT-PCT para la fructosa-1,6-bifosfatasa citsólica

<400> 63

50 tatcccgctg atggttcttc 20

<210> 64  
55 <211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

60 <220>  
<223> Cebador inverso de RT-PCT para la fructosa-1,6-bifosfatasa citsólica

<400> 64

65 ctccggggta caagaagatg 20



# ES 2 372 071 A1

<210> 65  
<211> 20  
<212> DNA  
5 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador directo de RT-PCT para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (isoforma plastidial)  
10  
<400> 65  
cacaccgtga cttgaggaga 20

<210> 66  
<211> 20  
20 <212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
25 <223> Cebador inverso de RT-PCT para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (isoforma plastidial)  
<400> 66  
30 cccttgagct gaggtagcac 20

<210> 67  
<211> 324  
35 <212> DNA  
<213> *Solanum tuberosum*

<220>  
40 <221> CDS  
<222> (1)..(324)  
<223> Secuencia codificante del Inhibidor de proteasas de patata  
45  
<400> 67

atg gag tca aag tgt gct cac atc att gtt ttc ttt ctt ctt gca act 48  
50 Met Glu Ser Lys Cys Ala His Ile Ile Val Phe Phe Leu Leu Ala Thr  
1 5 10 15

tcc ttt gaa act ctc atg gca caa aaa gaa agt gat gga cta gaa gcc 96  
55 Ser Phe Glu Thr Leu Met Ala Gln Lys Glu Ser Asp Gly Leu Glu Ala  
20 25 30

ata gaa ctt cta aag gaa ttt gaa tgc aaa gga aaa cta agc tgg cca 144  
60 Ile Glu Leu Leu Lys Glu Phe Glu Cys Lys Gly Lys Leu Ser Trp Pro  
35 40 45

gaa ctt att ggt gta cca aca aag ctt gct aag ggg ata att gag aag 192  
65 Glu Leu Ile Gly Val Pro Thr Lys Leu Ala Lys Gly Ile Ile Glu Lys  
50 55 60

## ES 2 372 071 A1

```

    caa aat tca ctc ata agt aat gtt cat ata tta ttg aat ggt tct cca      240
    Gln Asn Ser Leu Ile Ser Asn Val His Ile Leu Leu Asn Gly Ser Pro
    65                          70                          75                          80

5   gtc aca ttg gat att cgt tgt gat cga gtt cgt ctt ttt gat aac atc      288
    Val Thr Leu Asp Ile Arg Cys Asp Arg Val Arg Leu Phe Asp Asn Ile
                                85                          90                          95

10  ttg ggt tct gtt gta cag att cct gtg gtt ggt taa                      324
    Leu Gly Ser Val Val Gln Ile Pro Val Val Gly
                                100                          105

15  <210> 68
    <211> 107
    <212> PRT
20  <213> Solanum tuberosum

    <400> 68

25  Met Glu Ser Lys Cys Ala His Ile Ile Val Phe Phe Leu Leu Ala Thr
    1                               5                               10                               15
    Ser Phe Glu Thr Leu Met Ala Gln Lys Glu Ser Asp Gly Leu Glu Ala
    20                               25                               30

30  Ile Glu Leu Leu Lys Glu Phe Glu Cys Lys Gly Lys Leu Ser Trp Pro
    35                               40                               45
    Glu Leu Ile Gly Val Pro Thr Lys Leu Ala Lys Gly Ile Ile Glu Lys
    50                               55                               60

35  Gln Asn Ser Leu Ile Ser Asn Val His Ile Leu Leu Asn Gly Ser Pro
    65                          70                          75                          80
    Val Thr Leu Asp Ile Arg Cys Asp Arg Val Arg Leu Phe Asp Asn Ile
    85                          90                          95
    Leu Gly Ser Val Val Gln Ile Pro Val Val Gly
    100                          105

45  <210> 69
    <211> 1764
    <212> DNA
    <213> Solanum tuberosum

50  <220>
    <221> CDS
    <222> (1)..(1764)
55  <223> Secuencia codificante de la nitrito reductasa de patata

    <400> 69

60  atg gca tct ttt tct atc aaa ttt ttg gca cct tca ttg cca aat cca      48
    Met Ala Ser Phe Ser Ile Lys Phe Leu Ala Pro Ser Leu Pro Asn Pro
    1                               5                               10                               15

65  act aga ttt tcc aag agt act att gtc aag ctc aat gca act ccg ccg      96
    Thr Arg Phe Ser Lys Ser Thr Ile Val Lys Leu Asn Ala Thr Pro Pro
    20                               25                               30

```

ES 2 372 071 A1

	cag aca gtg gct gcg gtg ggg cct cca gag gtt gct gct gag aga cta	144
	Gln Thr Val Ala Ala Val Gly Pro Pro Glu Val Ala Ala Glu Arg Leu	
	35 40 45	
5		
	gaa cca aga gtt gag gaa aaa gat gga tat tgg ata caa aaa gag cag	192
	Glu Pro Arg Val Glu Glu Lys Asp Gly Tyr Trp Ile Gln Lys Glu Gln	
	50 55 60	
10		
	ttt agg caa ggt att aat cct caa gag aag gtg aag att gag aag gaa	240
	Phe Arg Gln Gly Ile Asn Pro Gln Glu Lys Val Lys Ile Glu Lys Glu	
	65 70 75 80	
15		
	cct atg aag ttg ttc atg gaa aat ggt att gaa gag tta gct aag att	288
	Pro Met Lys Leu Phe Met Glu Asn Gly Ile Glu Glu Leu Ala Lys Ile	
	85 90 95	
20		
	cca att gaa gag ata gat caa tct aag ctt act aag gat gac atc gat	336
	Pro Ile Glu Glu Ile Asp Gln Ser Lys Leu Thr Lys Asp Asp Ile Asp	
	100 105 110	
25		
	gtt agg ctt aag tgg ctt ggc ctc ttc cat agg aga aag aat caa tat	384
	Val Arg Leu Lys Trp Leu Gly Leu Phe His Arg Arg Lys Asn Gln Tyr	
	115 120 125	
30		
	ggg aga ttc atg atg agg ttg aaa ctt cca aat gga gta aca acg agt	432
	Gly Arg Phe Met Met Arg Leu Lys Leu Pro Asn Gly Val Thr Thr Ser	
	130 135 140	
35		
	gct caa act cga tat ttg gca agt gtg ata agg aaa tac ggg gag gaa	480
	Ala Gln Thr Arg Tyr Leu Ala Ser Val Ile Arg Lys Tyr Gly Glu Glu	
	145 150 155 160	
40		
	gga tgt gct gat att acg aca agg caa aat tgg cag att cgt gga gtt	528
	Gly Cys Ala Asp Ile Thr Thr Arg Gln Asn Trp Gln Ile Arg Gly Val	
	165 170 175	
45		
	gtg cta cct gat gtg cct gag att ctg aag gga ctt gaa gaa gtt ggc	576
	Val Leu Pro Asp Val Pro Glu Ile Leu Lys Gly Leu Glu Glu Val Gly	
	180 185 190	
50		
	ttg act agt ttg cag agt ggc atg gat aat gtc agg aat cca gtt gga	624
	Leu Thr Ser Leu Gln Ser Gly Met Asp Asn Val Arg Asn Pro Val Gly	
	195 200 205	
55		
	aat cct ctg gct gga att gat cct gaa gaa att gtt gac aca aga cct	672
	Asn Pro Leu Ala Gly Ile Asp Pro Glu Glu Ile Val Asp Thr Arg Pro	
	210 215 220	
60		
	tac act aat ttg ctc tcc caa ttt atc act ggt aat tca cga ggc aat	720
	Tyr Thr Asn Leu Leu Ser Gln Phe Ile Thr Gly Asn Ser Arg Gly Asn	
	225 230 235 240	
65		
	ccg gca gtt tct aac ttg cca agg aag tgg aat ccg tgt gta gta ggc	768
	Pro Ala Val Ser Asn Leu Pro Arg Lys Trp Asn Pro Cys Val Val Gly	
	245 250 255	
70		
	tct cat gat ctt tat gag cac cct cat atc aat gat ctt gca tac atg	816
	Ser His Asp Leu Tyr Glu His Pro His Ile Asn Asp Leu Ala Tyr Met	
	260 265 270	

## ES 2 372 071 A1

	cct gcc ata aaa gat gga cga ttc gga ttc aac ctg ctt gtg gga ggg	864
	Pro Ala Ile Lys Asp Gly Arg Phe Gly Phe Asn Leu Leu Val Gly Gly	
	275	280
5	ttc ttc agt gcc aaa cga tgt gat gag gca att cct ctt gat gca tgg	912
	Phe Phe Ser Ala Lys Arg Cys Asp Glu Ala Ile Pro Leu Asp Ala Trp	
	290	295
10	gtt cca gct gat gat gtt gtt ccg gtt tgc aaa gca atc ctg gaa gct	960
	Val Pro Ala Asp Asp Val Val Pro Val Cys Lys Ala Ile Leu Glu Ala	
	305	310
15	ttt aga gat ctt ggt ttc aga ggg aac agg cag aaa tgt aga atg atg	1008
	Phe Arg Asp Leu Gly Phe Arg Gly Asn Arg Gln Lys Cys Arg Met Met	
	325	330
20	tgg tta atc gat gaa ctg ggt gta gaa gga ttc agg gca gag gtt gaa	1056
	Trp Leu Ile Asp Glu Leu Gly Val Glu Gly Phe Arg Ala Glu Val Glu	
	340	345
25	aag aga atg cct cag caa gag cta gag aga gca tct ccg gaa gac ttg	1104
	Lys Arg Met Pro Gln Gln Glu Leu Glu Arg Ala Ser Pro Glu Asp Leu	
	355	360
30	gtt cag aaa caa tgg gaa aga aga gat tat ctt ggt gta cat cca caa	1152
	Val Gln Lys Gln Trp Glu Arg Arg Asp Tyr Leu Gly Val His Pro Gln	
	370	375
35	aaa cag gaa ggc tat agt ttt att ggt ctt cac att cca gtg ggt cgt	1200
	Lys Gln Glu Gly Tyr Ser Phe Ile Gly Leu His Ile Pro Val Gly Arg	
	385	390
40	gtc caa gca gac gac atg gat gat cta gct cgt ttg gct gat gag tat	1248
	Val Gln Ala Asp Asp Met Asp Asp Leu Ala Arg Leu Ala Asp Glu Tyr	
	405	410
45	ggc tca gga gag cta cgg ctg act gtg gaa cag aac att att att ccc	1296
	Gly Ser Gly Glu Leu Arg Leu Thr Val Glu Gln Asn Ile Ile Ile Pro	
	420	425
50	aac att gag aac tca aag att gag gca ctg cta aaa gag cct att ttg	1344
	Asn Ile Glu Asn Ser Lys Ile Glu Ala Leu Leu Lys Glu Pro Ile Leu	
	435	440
55	agc aaa ttt tca cct gat cca cct att ctc atg aaa ggt tta gtg gct	1392
	Ser Lys Phe Ser Pro Asp Pro Pro Ile Leu Met Lys Gly Leu Val Ala	
	450	455
60	tgt act ggt aac cag ttt tgt gga caa gcc ata att gag aca aaa gct	1440
	Cys Thr Gly Asn Gln Phe Cys Gly Gln Ala Ile Ile Glu Thr Lys Ala	
	465	470
65	cgt tcc ctg aag atc acc gaa gag gtt caa agg caa gta tct cta acg	1488
	Arg Ser Leu Lys Ile Thr Glu Glu Val Gln Arg Gln Val Ser Leu Thr	
	485	490
70	agg cca gta agg atg cac tgg aca ggc tgc ccg aat acg tgt gca caa	1536
	Arg Pro Val Arg Met His Trp Thr Gly Cys Pro Asn Thr Cys Ala Gln	
	500	505
75	gtt caa gtt gca gac att gga ttc atg gga tgc ctg act aga gat aag	1584

# ES 2 372 071 A1

	Val	Gln	Val	Ala	Asp	Ile	Gly	Phe	Met	Gly	Cys	Leu	Thr	Arg	Asp	Lys		
			515					520					525					
5	gac	aag	aag	act	gtg	gaa	ggc	gcc	gat	gtt	ttc	tta	gga	ggc	aga	ata		1632
	Asp	Lys	Lys	Thr	Val	Glu	Gly	Ala	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Gly	Arg	Ile		
		530					535					540						
10	ggg	agt	gat	tca	cat	ttg	gga	gaa	gta	tac	aag	aaa	gcc	gtt	ccg	tgt		1680
	Gly	Ser	Asp	Ser	His	Leu	Gly	Glu	Val	Tyr	Lys	Lys	Ala	Val	Pro	Cys		
	545					550					555					560		
15	gat	gaa	tta	gta	cca	ctt	att	gtg	gac	tta	cta	gtt	aac	aac	ttt	ggt		1728
	Asp	Glu	Leu	Val	Pro	Leu	Ile	Val	Asp	Leu	Leu	Val	Asn	Asn	Phe	Gly		
					565					570					575			
20	gca	gtt	cca	cga	gaa	aga	gaa	gaa	aca	gaa	gat	taa						1764
	Ala	Val	Pro	Arg	Glu	Arg	Glu	Glu	Thr	Glu	Asp							
				580					585									

<210> 70

25 <211> 587

<212> PRT

<213> *Solanum tuberosum*

30 <400> 70

	Met	Ala	Ser	Phe	Ser	Ile	Lys	Phe	Leu	Ala	Pro	Ser	Leu	Pro	Asn	Pro	
	1				5					10					15		
35	Thr	Arg	Phe	Ser	Lys	Ser	Thr	Ile	Val	Lys	Leu	Asn	Ala	Thr	Pro	Pro	
			20						25					30			
40	Gln	Thr	Val	Ala	Ala	Val	Gly	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Ala	Glu	Arg	Leu	
			35					40						45			
45	Glu	Pro	Arg	Val	Glu	Glu	Lys	Asp	Gly	Tyr	Trp	Ile	Gln	Lys	Glu	Gln	
		50					55					60					
50	Phe	Arg	Gln	Gly	Ile	Asn	Pro	Gln	Glu	Lys	Val	Lys	Ile	Glu	Lys	Glu	
	65					70					75					80	
55	Pro	Met	Lys	Leu	Phe	Met	Glu	Asn	Gly	Ile	Glu	Glu	Leu	Ala	Lys	Ile	
					85					90					95		
60	Pro	Ile	Glu	Glu	Ile	Asp	Gln	Ser	Lys	Leu	Thr	Lys	Asp	Asp	Ile	Asp	
				100					105					110			
65	Val	Arg	Leu	Lys	Trp	Leu	Gly	Leu	Phe	His	Arg	Arg	Lys	Asn	Gln	Tyr	
			115					120						125			
70	Gly	Arg	Phe	Met	Met	Arg	Leu	Lys	Leu	Pro	Asn	Gly	Val	Thr	Thr	Ser	
		130					135					140					
75	Ala	Gln	Thr	Arg	Tyr	Leu	Ala	Ser	Val	Ile	Arg	Lys	Tyr	Gly	Glu	Glu	
	145					150					155					160	
80	Gly	Cys	Ala	Asp	Ile	Thr	Thr	Arg	Gln	Asn	Trp	Gln	Ile	Arg	Gly	Val	
					165					170					175		
85	Val	Leu	Pro	Asp	Val	Pro	Glu	Ile	Leu	Lys	Gly	Leu	Glu	Glu	Val	Gly	

# ES 2 372 071 A1

		180		185		190											
5	Leu	Thr	Ser 195	Leu	Gln	Ser	Gly	Met 200	Asp	Asn	Val	Arg	Asn 205	Pro	Val	Gly	
	Asn	Pro	Leu	Ala	Gly	Ile	Asp 215	Pro	Glu	Glu	Ile	Val	Asp 220	Thr	Arg	Pro	
10	Tyr	Thr	Asn	Leu	Leu	Ser 230	Gln	Phe	Ile	Thr	Gly 235	Asn	Ser	Arg	Gly	Asn 240	
15	Pro	Ala	Val	Ser	Asn 245	Leu	Pro	Arg	Lys	Trp 250	Asn	Pro	Cys	Val	Val	Gly 255	
	Ser	His	Asp	Leu	Tyr 260	Glu	His	Pro	His 265	Ile	Asn	Asp	Leu	Ala	Tyr	Met 270	
20	Pro	Ala	Ile 275	Lys	Asp	Gly	Arg	Phe 280	Gly	Phe	Asn	Leu	Leu 285	Val	Gly	Gly	
25	Phe	Phe	Ser 290	Ala	Lys	Arg	Cys 295	Asp	Glu	Ala	Ile	Pro 300	Leu	Asp	Ala	Trp	
	Val	Pro	Ala	Asp	Asp	Val	Val 310	Pro	Val	Cys	Lys 315	Ala	Ile	Leu	Glu	Ala 320	
30	Phe	Arg	Asp	Leu	Gly 325	Phe	Arg	Gly	Asn	Arg 330	Gln	Lys	Cys	Arg	Met 335	Met	
35	Trp	Leu	Ile	Asp 340	Glu	Leu	Gly	Val	Glu 345	Gly	Phe	Arg	Ala	Glu 350	Val	Glu	
	Lys	Arg	Met 355	Pro	Gln	Gln	Glu	Leu	Glu 360	Arg	Ala	Ser	Pro 365	Glu	Asp	Leu	
40	Val	Gln	Lys	Gln	Trp	Glu	Arg 375	Arg	Asp	Tyr	Leu	Gly 380	Val	His	Pro	Gln	
45	Lys	Gln	Glu	Gly	Tyr	Ser 390	Phe	Ile	Gly	Leu	His 395	Ile	Pro	Val	Gly	Arg 400	
	Val	Gln	Ala	Asp	Asp	Met	Asp	Asp	Leu	Ala 410	Arg	Leu	Ala	Asp	Glu 415	Tyr	
50	Gly	Ser	Gly	Glu	Leu	Arg	Leu	Thr	Val 425	Glu	Gln	Asn	Ile	Ile	Ile	Pro	
	Asn	Ile	Glu	Asn	Ser	Lys	Ile 440	Glu	Ala	Leu	Leu	Lys	Glu 445	Pro	Ile	Leu	
55	Ser	Lys	Phe	Ser	Pro	Asp	Pro	Pro	Ile	Leu	Met	Lys	Gly 460	Leu	Val	Ala	
60	Cys	Thr	Gly	Asn	Gln	Phe 470	Cys	Gly	Gln	Ala	Ile 475	Ile	Glu	Thr	Lys	Ala 480	
	Arg	Ser	Leu	Lys	Ile	Thr	Glu	Glu	Val	Gln 490	Arg	Gln	Val	Ser	Leu	Thr 495	
65	Arg	Pro	Val	Arg	Met	His	Trp	Thr	Gly 505	Cys	Pro	Asn	Thr	Cys 510	Ala	Gln	

# ES 2 372 071 A1

	Val	Gln	Val	Ala	Asp	Ile	Gly	Phe	Met	Gly	Cys	Leu	Thr	Arg	Asp	Lys		
			515					520					525					
5	Asp	Lys	Lys	Thr	Val	Glu	Gly	Ala	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Gly	Arg	Ile		
		530					535					540						
10	Gly	Ser	Asp	Ser	His	Leu	Gly	Glu	Val	Tyr	Lys	Lys	Ala	Val	Pro	Cys		
		545				550					555					560		
15	Asp	Glu	Leu	Val	Pro	Leu	Ile	Val	Asp	Leu	Leu	Val	Asn	Asn	Phe	Gly		
				565					570						575			
20	Ala	Val	Pro	Arg	Glu	Arg	Glu	Glu	Thr	Glu	Asp							
				580					585									
	<210> 71																	
	<211> 1161																	
	<212> DNA																	
	<213> <i>Solanum tuberosum</i>																	
25	<220>																	
	<221> CDS																	
	<222> (1)..(1161)																	
30	<223> Secuencia codificante de la cisteína sintasa de patata																	
	<400> 71																	
35	atg	gca	tct	ttc	atc	aac	aat	ccc	tta	act	tct	ctc	tgt	aac	act	aag		48
	Met	Ala	Ser	Phe	Ile	Asn	Asn	Pro	Leu	Thr	Ser	Leu	Cys	Asn	Thr	Lys		
	1			5					10					15				
40	tct	gaa	gct	aat	aat	ctc	ttc	aaa	att	tcc	cct	tta	aga	gct	caa	tca		96
	Ser	Glu	Ala	Asn	Asn	Leu	Phe	Lys	Ile	Ser	Pro	Leu	Arg	Ala	Gln	Ser		
				20				25					30					
45	ctg	ggt	ttt	tcc	aag	ctt	aat	ggc	agc	aga	aaa	gtt	gct	ttc	cct	tct		144
	Leu	Gly	Phe	Ser	Lys	Leu	Asn	Gly	Ser	Arg	Lys	Val	Ala	Phe	Pro	Ser		
			35					40					45					
50	gtt	gtt	tgc	aaa	gcg	gtg	tct	gta	cca	acg	aaa	tcg	agt	aca	gag	att		192
	Val	Val	Cys	Lys	Ala	Val	Ser	Val	Pro	Thr	Lys	Ser	Ser	Thr	Glu	Ile		
			50				55					60						
55	gaa	ggg	ctt	aac	atc	gct	gaa	gat	gtt	aca	cag	ctt	att	ggg	aac	aca		240
	Glu	Gly	Leu	Asn	Ile	Ala	Glu	Asp	Val	Thr	Gln	Leu	Ile	Gly	Asn	Thr		
	65				70						75				80			
60	cca	atg	gtt	tac	ctt	aac	acc	atc	gct	aag	ggt	tgt	gta	gca	aac	att		288
	Pro	Met	Val	Tyr	Leu	Asn	Thr	Ile	Ala	Lys	Gly	Cys	Val	Ala	Asn	Ile		
					85				90					95				
65	gct	gct	aaa	ctt	gag	att	atg	gag	cca	tgt	tgc	agt	gtt	aag	gac	agg		336
	Ala	Ala	Lys	Leu	Glu	Ile	Met	Glu	Pro	Cys	Cys	Ser	Val	Lys	Asp	Arg		
				100				105					110					
70	ata	ggg	ttc	agt	atg	ata	gtt	gat	gca	gag	gag	aag	gga	ctt	ata	tct		384
	Ile	Gly	Phe	Ser	Met	Ile	Val	Asp	Ala	Glu	Glu	Lys	Gly	Leu	Ile	Ser		
			115					120					125					
75	ccg	ggg	aag	act	gtt	cta	gtt	gag	cct	aca	agt	gga	aac	aca	ggc	att		432

## ES 2 372 071 A1

	Pro	Gly	Lys	Thr	Val	Leu	Val	Glu	Pro	Thr	Ser	Gly	Asn	Thr	Gly	Ile	
		130					135					140					
5	ggg	ctt	gcc	ttc	att	gct	gct	tcc	aga	gga	tat	aag	ctc	atc	tta	acg	480
	Gly	Leu	Ala	Phe	Ile	Ala	Ala	Ser	Arg	Gly	Tyr	Lys	Leu	Ile	Leu	Thr	
	145					150					155					160	
10	atg	cct	gca	tca	atg	agt	ctt	gaa	aga	agg	gtc	att	cta	aaa	gct	ttt	528
	Met	Pro	Ala	Ser	Met	Ser	Leu	Glu	Arg	Arg	Val	Ile	Leu	Lys	Ala	Phe	
					165					170					175		
15	gga	gct	gaa	ctt	gtt	tta	act	gac	cca	gcc	aaa	ggg	atg	aaa	gga	gct	576
	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Leu	Thr	Asp	Pro	Ala	Lys	Gly	Met	Lys	Gly	Ala	
				180					185					190			
20	gtt	tca	aag	gct	gaa	gaa	ata	ttg	aat	aac	aca	cca	gat	gcc	tat	atc	624
	Val	Ser	Lys	Ala	Glu	Glu	Ile	Leu	Asn	Asn	Thr	Pro	Asp	Ala	Tyr	Ile	
			195					200					205				
25	ctt	caa	caa	ttt	gac	aat	ccc	gcc	aac	ccc	aag	ata	cac	tat	gaa	aca	672
	Leu	Gln	Gln	Phe	Asp	Asn	Pro	Ala	Asn	Pro	Lys	Ile	His	Tyr	Glu	Thr	
		210					215					220					
30	acg	ggt	cca	gag	atc	tgg	gaa	gac	aca	aaa	ggc	aag	att	gac	ata	ctt	720
	Thr	Gly	Pro	Glu	Ile	Trp	Glu	Asp	Thr	Lys	Gly	Lys	Ile	Asp	Ile	Leu	
	225					230					235					240	
35	gtt	gct	ggc	att	gga	act	ggt	gga	acc	att	aca	gga	aca	ggc	cga	ttc	768
	Val	Ala	Gly	Ile	Gly	Thr	Gly	Gly	Thr	Ile	Thr	Gly	Thr	Gly	Arg	Phe	
					245				250						255		
40	ctt	aaa	gag	caa	aat	cca	aac	att	aag	att	att	ggt	gtg	gag	ccc	aca	816
	Leu	Lys	Glu	Gln	Asn	Pro	Asn	Ile	Lys	Ile	Ile	Gly	Val	Glu	Pro	Thr	
				260					265					270			
45	gaa	agt	aac	gtt	cta	tca	ggg	ggc	aaa	cct	ggc	cct	cac	aaa	att	caa	864
	Glu	Ser	Asn	Val	Leu	Ser	Gly	Gly	Lys	Pro	Gly	Pro	His	Lys	Ile	Gln	
			275					280					285				
50	ggg	att	gga	gca	ggt	ttt	att	cca	gga	aac	ttg	gat	caa	gat	gta	atg	912
	Gly	Ile	Gly	Ala	Gly	Phe	Ile	Pro	Gly	Asn	Leu	Asp	Gln	Asp	Val	Met	
		290					295					300					
55	gat	gaa	gtg	ata	gag	ata	tcg	agt	gac	gaa	gct	gtt	gaa	act	gcg	aag	960
	Asp	Glu	Val	Ile	Glu	Ile	Ser	Ser	Asp	Glu	Ala	Val	Glu	Thr	Ala	Lys	
	305					310					315					320	
60	caa	tta	gcg	cta	caa	gaa	ggg	ttg	ttg	gtt	ggg	att	tct	tcc	gga	gca	1008
	Gln	Leu	Ala	Leu	Gln	Glu	Gly	Leu	Leu	Val	Gly	Ile	Ser	Ser	Gly	Ala	
					325					330					335		
65	gct	gct	ctt	gct	gcc	att	cag	gtt	ggg	aag	aga	cct	gag	aat	gca	gga	1056
	Ala	Ala	Leu	Ala	Ala	Ile	Gln	Val	Gly	Lys	Arg	Pro	Glu	Asn	Ala	Gly	
				340					345					350			
70	aag	ctt	att	ggg	gtt	gta	ttt	cca	agc	tat	ggg	gaa	cga	tac	ctc	tcc	1104
	Lys	Leu	Ile	Gly	Val	Val	Phe	Pro	Ser	Tyr	Gly	Glu	Arg	Tyr	Leu	Ser	
			355					360					365				
75	tct	att	ctt	ttc	cag	tca	ata	cga	gag	gaa	tgc	gag	aaa	atg	aag	cca	1152
	Ser	Ile	Leu	Phe	Gln	Ser	Ile	Arg	Glu	Glu	Cys	Glu	Lys	Met	Lys	Pro	



ES 2 372 071 A1

370 375 380 1161

5 gaa ttg tga  
Glu Leu  
385

10 <210> 72  
<211> 386  
<212> PRT  
<213> *Solanum tuberosum*

15 <400> 72

20 Met Ala Ser Phe Ile Asn Asn Pro Leu Thr Ser Leu Cys Asn Thr Lys  
1 5 10 15

Ser Glu Ala Asn Asn Leu Phe Lys Ile Ser Pro Leu Arg Ala Gln Ser  
20 25 30

25 Leu Gly Phe Ser Lys Leu Asn Gly Ser Arg Lys Val Ala Phe Pro Ser  
35 40 45

30 Val Val Cys Lys Ala Val Ser Val Pro Thr Lys Ser Ser Thr Glu Ile  
50 55 60

Glu Gly Leu Asn Ile Ala Glu Asp Val Thr Gln Leu Ile Gly Asn Thr  
65 70 75 80

35 Pro Met Val Tyr Leu Asn Thr Ile Ala Lys Gly Cys Val Ala Asn Ile  
85 90 95

Ala Ala Lys Leu Glu Ile Met Glu Pro Cys Cys Ser Val Lys Asp Arg  
100 105 110

40 Ile Gly Phe Ser Met Ile Val Asp Ala Glu Glu Lys Gly Leu Ile Ser  
115 120 125

Pro Gly Lys Thr Val Leu Val Glu Pro Thr Ser Gly Asn Thr Gly Ile  
130 135 140

45 Gly Leu Ala Phe Ile Ala Ala Ser Arg Gly Tyr Lys Leu Ile Leu Thr  
145 150 155 160

50 Met Pro Ala Ser Met Ser Leu Glu Arg Arg Val Ile Leu Lys Ala Phe  
165 170 175

Gly Ala Glu Leu Val Leu Thr Asp Pro Ala Lys Gly Met Lys Gly Ala  
180 185 190

55 Val Ser Lys Ala Glu Glu Ile Leu Asn Asn Thr Pro Asp Ala Tyr Ile  
195 200 205

Leu Gln Gln Phe Asp Asn Pro Ala Asn Pro Lys Ile His Tyr Glu Thr  
210 215 220

60 Thr Gly Pro Glu Ile Trp Glu Asp Thr Lys Gly Lys Ile Asp Ile Leu  
225 230 235 240

Val Ala Gly Ile Gly Thr Gly Gly Thr Ile Thr Gly Thr Gly Arg Phe  
245 250 255

65

# ES 2 372 071 A1

	Leu	Lys	Glu	Gln	Asn	Pro	Asn	Ile	Lys	Ile	Ile	Gly	Val	Glu	Pro	Thr
				260					265					270		
5	Glu	Ser	Asn	Val	Leu	Ser	Gly	Gly	Lys	Pro	Gly	Pro	His	Lys	Ile	Gln
			275					280					285			
10	Gly	Ile	Gly	Ala	Gly	Phe	Ile	Pro	Gly	Asn	Leu	Asp	Gln	Asp	Val	Met
		290					295					300				
15	Asp	Glu	Val	Ile	Glu	Ile	Ser	Ser	Asp	Glu	Ala	Val	Glu	Thr	Ala	Lys
	305					310					315					320
20	Gln	Leu	Ala	Leu	Gln	Glu	Gly	Leu	Leu	Val	Gly	Ile	Ser	Ser	Gly	Ala
					325					330					335	
25	Ala	Ala	Leu	Ala	Ala	Ile	Gln	Val	Gly	Lys	Arg	Pro	Glu	Asn	Ala	Gly
				340					345					350		
30	Lys	Leu	Ile	Gly	Val	Val	Phe	Pro	Ser	Tyr	Gly	Glu	Arg	Tyr	Leu	Ser
			355					360					365			
35	Ser	Ile	Leu	Phe	Gln	Ser	Ile	Arg	Glu	Glu	Cys	Glu	Lys	Met	Lys	Pro
		370					375					380				
40	Glu	Leu														
	385															
45																
50																
55																
60																
65																



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201000499

②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.04.2010

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A01N63/02** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	RYU, CHOONG-MIN., et al. Bacterial volatiles promote growth in <i>Arabidopsis</i> . <i>PNAS</i> . Vol. 100, no. 8, páginas 4927-4932. Páginas 4928 y 4929.	1-3,9,10,14
X	VESPERMANN, A., et al. Rhizobacterial volátiles affect the growth of fungi and <i>Arabidopsis thaliana</i> . <i>Applied and Environmental Microbiology</i> , páginas 5639-5641. Página 5639.	1-3,7,9,10,14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
21.12.2011

Examinador  
I. Rueda Molins

Página  
1/4

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

A01N

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.12.2011

#### Declaración

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 4-6, 8, 11-13	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-3, 7, 9, 10 y 14	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 4-6, 8, 11-13	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-3, 7, 9, 10 y 14	<b>NO</b>

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

#### Base de la Opinión.-

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

**1. Documentos considerados.-**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	RYU, CHOONG-MIN., et al. Bacterial volatiles promote growth in <i>Arabidopsis</i> . <i>PNAS</i> . Vol. 100, no. 8, páginas 4927-4932. Páginas 4928 y 4929.	2003
D02	VESPERMANN, A., et al. Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and <i>Arabidopsis thaliana</i> . <i>Applied and Environmental Microbiology</i> , páginas 5639-5641. Página 5639.	2007

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

En la solicitud de patente se hace referencia a un método para incrementar el crecimiento de una planta y/o alterar su patrón de desarrollo caracterizado por que la planta se cultiva en presencia de un cultivo de un microorganismo que produce compuestos volátiles, sin que exista contacto entre la planta y el microorganismo, o en presencia de los volátiles emitidos por el microorganismo, en el que el microorganismo es distinto de los aislados *Bacillus subtilis* GB03 y *Bacillus amyloliquefaciens* IN937.

Los documentos D01 y D02 divulgan como determinados compuestos volátiles sintetizados por bacterias promueven el crecimiento en *Arabidopsis thaliana*.

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

En las reivindicaciones 1-3, 9, 10, 14 se reivindica un método para incrementar el crecimiento de una planta y/o alterar su patrón de desarrollo caracterizado por que la planta (que puede ser la especie vegetal *Arabidopsis thaliana*) se cultiva en presencia de un cultivo de un microorganismo que produce compuestos volátiles, sin que exista contacto entre la planta y el microorganismo, o en presencia de los volátiles emitidos por el microorganismo, en el que el microorganismo es distinto de los aislados *Bacillus subtilis* GB03 y *Bacillus amyloliquefaciens* IN937 pudiendo ser, dicho microorganismo, una bacteria perteneciente a un género distinto de *Bacillus* o *Paenibacillus*.

El documento D01 muestra (en las páginas 4928 y 4929) como los volátiles producidos *Enterobacter cloacae* JM22 promueven el crecimiento en *Arabidopsis thaliana* sin que exista contacto entre la planta y el microorganismo. Por tanto, teniendo en cuenta la información divulgada en el documento D01 las reivindicaciones 1-3, 9, 10, 14 no presentan novedad ni actividad inventiva según lo establecido en los Artículos 6 y 8 LP 11/1986

El documento D02 divulga (en la página 5639) como los volátiles sintetizados por *Bacillus cepacia* y *Staphylococcus epidermidis* inducen crecimiento en la especie vegetal *Arabidopsis thaliana* sin que exista contacto entre la planta y dichos microorganismos. Por lo que, teniendo en cuenta la información divulgada en el documento D02 las reivindicaciones 1-3, 7, 9, 10, 14 no presentan novedad ni actividad inventiva según lo establecido en los Artículos 6 y 8 LP 11/1986.