

①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



①1 Número de publicación: **2 376 734**

②1 Número de solicitud: 201001068

⑤1 Int. Cl.:
A01N 31/02 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE ADICIÓN A LA PATENTE

A1

②2 Fecha de presentación: **13.08.2010**

④3 Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2012**

④3 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.03.2012

⑥1 Número de solicitud de la patente principal:
P 201000499

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

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

⑦4 Agente/Representante:
Buceta Facorro, Luis

⑤4 Título: **Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal nº P 201000499 por: "Procedimiento para alterar el patrón de desarrollo, y aumentar el crecimiento en plantas".**

⑤7 Resumen:

Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal nº P 201000499 por: "Procedimiento para alterar el patrón de desarrollo y aumentar el crecimiento en plantas". La mejora consiste en la identificación de los ácidos fórmico, acético, propiónico y butírico y del acetaldehído como volátiles capaces de incrementar el crecimiento e inducir la floración en plantas cultivadas en atmósferas con al menos uno de dichos compuestos, posibilitando un método de incrementar el crecimiento y la floración en plantas consistente en cultivarlas en atmósferas con uno o más de dichos volátiles, sin necesidad producir los volátiles mediante un cultivo microbiano.

DESCRIPCIÓN

Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal nº P 201000499 por: "Procedimiento para alterar el patrón de desarrollo, y aumentar el crecimiento en plantas".

Campo técnico

La presente solicitud de adición a la patente principal introduce mejoras en el procedimiento de la invención descrito en la solicitud de patente principal P201000499, perfeccionando la puesta en práctica del procedimiento de la invención referido al incremento del crecimiento de las plantas por acción de volátiles microbianos. Se delimitan los volátiles implicados en el aumento del crecimiento y en la inducción de la floración, mejorando la puesta en práctica del procedimiento de la invención referido al cultivo de plantas en presencia de una atmósfera en la que están presentes compuestos volátiles.

Antecedentes de la técnica

Hasta la divulgación de las enseñanzas de la solicitud de patente principal P201000499, se conocía poco sobre cómo pueden afectar las emisiones de volátiles microbianos a la fisiología de las plantas en ausencia de contacto físico. Se conocía, por una parte, que microorganismos tales como *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp., *Botrytis cinerea* y distintas trufas producen etileno (Splivallo *et al.*, 2007b; 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. Además, recientemente, Splivallo *et al.* (Splivallo *et al.* 2009: 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 describía 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: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 4927-4932; Ryu *et al.* 2004: Plant Physiol 134, 1017-1026; Vespermann *et al.* 2007; Appl. Environ. Microbiol. 73, 5639-5641, Xie *et al.* 2009: Plant Signal. Behav. 10, 948-953). En concreto, Ryu *et al.* (Ryu *et al.* 2003: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 4927-4932) describen que los volátiles orgánicos liberados por cepas específicas de PGPR, concretamente *Bacillus subtilis* GB03 y *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a, son capaces de provocar un incremento del crecimiento de plántulas de *Arabidopsis thaliana*. El efecto se observa cuando las citadas cepas de bacterias son cultivadas en el medio rico en aminoácidos agar con tripticasa de soja, en esas condiciones, ambas bacterias liberan 3-hidroxi-2-butanona (acetoína) y 2,3-butanediol. Dichos compuestos parecen ser los responsables del efecto observado, porque no son emitidos por las otras PGPR ensayadas que no mostraban efectos sobre el crecimiento de las plantas, pero, sin embargo, sí son liberados por otras cepas bacterianas con capacidad de incrementar la germinación y el crecimiento de plantas. Tal es el caso de la cepa de *Bacillus subtilis* WG6-14, objeto de la solicitud de patente US 2008/0152684 A1, que produce los mismos volátiles y es capaz de incrementar el crecimiento y la germinación de plantas como *Brassica oleraceo* sin existir contacto físico entre planta y bacteria. Sin embargo, existen muchas bacterias liberadoras de estas mismas sustancias (algunas pertenecientes al género *Bacillus*) que no promueven el crecimiento de la planta.

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 filamentosa.

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 isoamilo y acetato de butilo. 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.

5 En la solicitud de patente principal P201000499, se divulgaba el descubrimiento de que, al crecer plantas en presencia de cualquier tipo de microorganismo (bacterias Gram-positivas o Gram-negativas, levaduras u hongos), los volátiles emitidos por el microorganismo dan lugar a que se produzca una alteración el patrón de desarrollo y un aumento en el crecimiento, la fertilidad y el peso seco de las plantas, que iba acompañado de un incremento en la acumulación de almidón en las mismas. Estos efectos se observan tanto en plantas monocotiledóneas como
10 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 y, preferiblemente, cuando el microorganismo se hacía crecer en un medio que carezca
15 de compuestos orgánicos que presenten grupos amino, especialmente si el medio carece de aminoácidos, tal como los medios mínimos suplementados con al menos un compuesto orgánico como fuente de carbono. Dado que la aparición de los efectos descritos no requería de contacto físico entre la planta y el microorganismo, se concluía que los volátiles eran los responsables de los efectos observados.

20 Por ello, entre otros aspectos, la solicitud P201000499 divulgaba un método para incrementar la biomasa de una planta caracterizado por que la planta se cultiva en una atmósfera en la que están presentes los compuestos volátiles emitidos por un microorganismo, microorganismo que podía haber sido cultivado en un lugar diferente al lugar de cultivo de la planta, recogiendo la mezcla de volátiles emitidos por el mismo y cultivándose la planta en una atmósfera en la que estuvieran presentes esos volátiles. Sin embargo, la solicitud de patente principal P201000499
25 no mencionaba si, entre todos los volátiles emitidos por los distintos microorganismos, existían volátiles que fueran responsables del efecto de aumento del crecimiento de las plantas y otros que fueran responsables del efecto de incremento del almidón acumulado por las mismas, o si ambos efectos eran debidos a los mismos volátiles. El cultivo de plantas en atmósferas en las que estén presentes volátiles producidos por microorganismos, en ausencia de dichos microorganismos, podría verse facilitado si se dilucidara si ambos efectos se deben o no a los mismos compuestos y
30 cuáles son los compuestos concretos responsables de cada uno de los efectos. La presente solicitud de adición supone una mejora con respecto a la solicitud de patente principal, pues da una respuesta a este problema.

La solicitud P201000499, además, divulgaba cuáles eran las modificaciones en el metabolismo de las plantas mediante las cuales los volátiles microbianos provocan el incremento de la acumulación de almidón. Aprovechando
35 ese conocimiento, la solicitud P201000499 divulga un método alternativo para incrementar la acumulación de almidón en plantas, consistente en provocar la acumulación mediante el uso de plantas transgénicas, en las que el transgén o transgenes expresado(s) en sentido da(n) lugar a la sobreexpresión de alguna de las enzimas reguladas al alza por la exposición a los volátiles o en las que el transgén o transgenes expresado(s) en antisentido da(n) lugar a la reducción de la expresión de alguna de las enzimas reguladas a la baja por la exposición de los volátiles o en las que el transgén o transgenes consiste(n) en uno o más inhibidores de la actividad o de la expresión de alguna de las enzimas reguladas a la baja. Así, otro aspecto alternativo de la invención expuesta en la solicitud P201000499 es un método para incrementar
40 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).
45 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. Aunque se identifican perfectamente los genes preferidos para llevar a cabo ese aspecto de la invención, la solicitud de patente principal P201000499 no proporcionaba ejemplos de vectores con los que generar las plantas transgénicas. La presente solicitud de patente de adición aporta también una mejora en ese aspecto, pues proporciona plásmidos válidos para generar las plantas transgénicas indicadas.
50
55
60

Descripción de las mejoras de la invención

65 Las mejoras de la presente solicitud de adición están relacionadas, en un primer aspecto, con el descubrimiento de que no todos los volátiles producidos por los microorganismos tienen capacidad de influir sobre el incremento de la biomasa y la acumulación de almidón observada en las plantas que crecen en atmósferas en las que estén presentes dichos volátiles. En la presente solicitud de adición, se describe, además, que algunos volátiles que eran conocidos en el estado de la técnica como compuestos capaces de promover el crecimiento de las plantas, no afectan al contenido

de almidón acumulado por las mismas. Sin embargo, se identifican otros compuestos volátiles, tales como el ácido propiónico, el ácido acético, el acetaldehído, el ácido fórmico y el ácido butírico, que tienen un efecto positivo sobre la acumulación de almidón, y que parecen tenerlo igualmente sobre el crecimiento, la biomasa y la inducción de la floración: ése es el caso, por ejemplo, del ácido fórmico, para el cual se muestran ensayos que demuestran su capacidad de incrementar la acumulación de almidón y, también, el crecimiento de la planta. Además, se aportan datos que indican que su efecto es dependiente de dosis. Esto permite perfeccionar el método de incremento de la cantidad de almidón acumulada por una planta al crecerla en presencia de volátiles microbianos, identificando volátiles concretos que son capaces de producir ese efecto, así como el método para incrementar el crecimiento de una planta y/o alterar su patrón de desarrollo en el que la planta se cultiva en presencia de volátiles emitidos por un microorganismo, creando igualmente ejemplos de compuestos volátiles que puedan dar lugar a ese efecto, compuestos que son los mismos que los compuestos volátiles válidos para dar lugar al aumento de la acumulación de almidón en una planta completa. De esta manera, la aplicación de cualquiera de estos métodos de la invención no necesita la presencia de un cultivo de un microorganismo en el lugar de cultivo de la planta, sino que es posible elegir uno o más compuestos volátiles que no necesariamente tienen que haber sido emitidos por un microorganismo, sino que puede tener otro origen y puede hacerse presente en la atmósfera de cultivo de la planta por otros diversos medios, desde la presencia en el lugar de cultivo de una disolución desde la cual se evapora el compuesto o por insuflarse al lugar de cultivo la atmósfera desde el exterior de dicho lugar de cultivo, conteniendo ya el compuesto volátil como parte de la atmósfera insuflada, o porque el propio compuesto volátil se administre a la atmósfera del lugar de cultivo de la planta desde el exterior.

Así, en un primer aspecto, las mejoras de la presente solicitud de adición se refieren 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 una atmósfera en la que está presente al menos un compuesto volátil que se selecciona entre ácido propiónico, ácido acético, acetaldehído, ácido fórmico y ácido butírico. De entre ellos, se tiene especial preferencia por el ácido fórmico. En una posible realización de este aspecto de las mejoras de la invención, el compuesto volátil está presente en la atmósfera por evaporación de una disolución que lo contiene que se encuentra en el lugar de cultivo de la planta. En otra posible realización, el compuesto volátil se suministra a la atmósfera de cultivo. En cualquiera de los casos, como se describía en la solicitud de patente principal P201000499, el incremento del crecimiento puede manifestarse en aumento de la longitud de la planta y/o en aumento del tamaño de las hojas, y la alteración del patrón de crecimiento puede manifestarse en incremento del número de hojas, incremento del número de ramas y/o del número de flores y semillas de plantas angiospermas, en la inducción de la floración, o en combinaciones de los anteriores.

En un segundo aspecto, las mejoras se refieren a un método para incrementar la cantidad de almidón acumulado en una planta, caracterizado porque la planta se cultiva en una atmósfera en la que está presente al menos un compuesto volátil que se selecciona entre ácido propiónico, ácido acético, acetaldehído, ácido fórmico y ácido butírico. Como en el caso anterior, en una posible realización de este aspecto de las mejoras de la invención, el compuesto volátil está presente en la atmósfera por evaporación de una disolución que lo contiene que se encuentra en el lugar de cultivo de la planta. En otra posible realización, el compuesto volátil se suministra a la atmósfera de cultivo.

Por otra parte, la presente solicitud de adición a patente principal proporciona plásmidos adecuados para generar las plantas transgénicas propuestas en la solicitud de patente principal P201000499. Así, en un aspecto más, las mejoras de la invención se refieren a un método para incrementar la producción de almidón en una planta, caracterizado por que el método incluye una etapa en el que se introduce un transgén en una planta mediante un plásmido que comprende al menos una secuencia que se selecciona entre las representadas por SEQ ID NO:1 (secuencia codificante del inhibidor de proteinasas, secuencia que debe ir unida operativamente a un promotor de forma que su expresión se produzca en el sentido que da lugar a la proteína natural), SEQ ID NO:3 (secuencia codificante de la nitrito reductasa, secuencia que debe ir unida operativamente a un promotor de tal forma que su expresión se produzca en antisentido) y SEQ ID NO: 5 (secuencia codificante de la cisteína sintasa, secuencia que debe ir unida operativamente a un promotor de tal forma que su expresión se produzca en antisentido). El plásmido puede ser utilizado para transformación biolística de las plantas o mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Se prefiere particularmente que el plásmido contenga secuencias *Tnos*. En otra posible realización del método de incremento de la acumulación de almidón mediante el uso de plantas transgénicas, la secuencia codificante representada por SEQ ID NO:1, la secuencia antisentido a la representada por SEQ ID NO:3 o la secuencia antisentido a la representada por SEQ ID NO:5 está unida operativamente al promotor constitutivo S35 del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Se prefiere que el plásmido comprenda al menos un marcador de selección, que puede ser un gen de resistencia a un antibiótico, tal como kanamicina, cloranfenicol, ampicilina, zeomicina o higromicina y, más preferiblemente, que comprende al menos dos marcadores de selección, tales como, por ejemplo, un gen que confiere resistencia a kanamicina y un gen que confiere resistencia a higromicina. Una posible realización del método de incremento de la producción mediante el uso de plantas transgénicas consistiría en utilizar al menos uno de los plásmidos cuyo proceso de obtención se describe en el Ejemplo 4 de la presente invención, es decir, un plásmido que comprende la secuencia representada por SEQ ID NO:1, la secuencia antisentido a la representada por SEQ ID NO:3 ó la secuencia antisentido a la representada por SEQ ID NO:5, operativamente unida al promotor 35S de CaMV, que adicionalmente comprende secuencias *Tnos* de *Agrobacterium tumefaciens*, un gen de resistencia a kanamicina y un gen de resistencia a higromicina.

Por último, merece mencionarse que la presente solicitud de adición a patente principal divulga ensayos en los que se demuestra que el amonio, cuando las plantas se cultivan en una atmósfera en la que dicho compuesto está presente, es responsable de la despigmentación de las plantas y de la inhibición de su crecimiento. Este resultado refuerza la idea, expuesta en la solicitud de patente principal P201000499, de que los microorganismos cultivados en

medios ricos en aminoácidos (y, en general, de compuestos orgánicos que presenten grupos amino), producen volátiles (amonio) que inhiben el crecimiento; tales compuestos, sin embargo, no se producen cuando los microorganismos son cultivados en medios mínimos tales como el M9 o MOPS, que carecen de aminoácidos. Este hallazgo refuerza la utilidad de ciertas realizaciones del método de la invención para incrementar el crecimiento de una planta y/o

5 alterar su patrón de desarrollo en el 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: aquellas realizaciones en las que el crecimiento del microorganismo se produce en un medio que carece de compuestos orgánicos que presenten grupos amino, particularmente aminoácidos y/o proteínas, especialmente cuando el crecimiento del microorganismo se produce en un medio mínimo suplementado con un compuesto orgánico como fuente de carbono.

10 Las mejoras de la invención se describen ahora con más detalle por medio de las Figuras y Ejemplos que se presentan a continuación.

15 Breve descripción de las figuras

Fig. 1: Cuantificación del almidón obtenido de plantas de *Arabidopsis thaliana* incubadas en presencia de distintos compuestos volátiles:

20 - Panel A: cuantificación del contenido de almidón en hojas de plantas de *Arabidopsis*, cultivadas en atmósfera en la que están presentes los compuestos volátiles que se indican bajo cada una de las barras (indol, DTT (ditiotreitól), NAA (ácido 1-naftalenoacético), β -mercaptoetanol, ácido salicílico, ácido jasmónico, cisteína, acetofina, etileno, etanol, metanol, β -hidroxibutirato, butanediol, ácido propiónico, ácido acético, acetaldehído, ácido fórmico o ácido butírico), por evaporación de una disolución que los contiene.

25 - Panel B: cuantificación del contenido de almidón en hojas de plantas de *Arabidopsis*, cultivadas en una atmósfera en la que están presentes los compuestos volátiles que se indican bajo cada grupo de barras (ácido propiónico, ácido acético, ácido fórmico, ácido butírico), por evaporación de una disolución que los contiene en el porcentaje, expresado en volumen/volumen, que se indica mediante un número bajo cada una de las barras.

30 En ambos casos, el almidón se expresa como micromoles (μmol) de glucosa por gramo de peso fresco (FW).

Fig. 2: Fotografía de plantas de *Arabidopsis* control y plantas cultivadas durante 4 días en MS sólido dentro de una caja de plástico de 500 centímetros cúbicos junto a una disolución de 2 centímetros cúbicos al 0,2% de ácido fórmico. Claramente, la presencia de ácido fórmico promueve el crecimiento de la planta y la floración.

Fig. 3: cuantificación del contenido de almidón en hojas de plantas de *Arabidopsis*, cultivadas en una atmósfera en la que están presentes o ausentes (control) los compuestos volátiles producidos por un cultivo de *Escherichia coli* existente en la misma caja sellada, sin que exista contacto físico con la planta, dependiendo de si el cultivo de *Escherichia coli* es de tipo silvestre (barras con la leyenda WT) o un mutante con una delección en el gen de la piruvato quinasa F (barras con la leyenda ΔpykF). El almidón se expresa como micromoles (μmol) de glucosa por gramo de peso fresco (FW).

Fig. 4: Cinética de la acumulación de almidón y del balance entre la concentración de ácido 3-fosfoglicérico (3PGA) y ortofosfato (Pi) en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

50 - Panel A: cuantificación del contenido de almidón en hojas de plantas de *Arabidopsis thaliana* según el tiempo transcurrido, expresado en horas en abscisas, de exposición a la luz o a la oscuridad y ausencia o presencia de volátiles fúngicos. La barra blanca bajo el gráfico indica período de luz (16 primeras horas), mientras que la barra con relleno oscuro indica período de oscuridad (6 horas siguientes). El almidón se expresa como micromoles (μmol) de glucosa por gramo de peso fresco (FW).

55 - Panel B: relación entre la concentración de ácido 3-fosfoglicérico (3PGA) y ácido fosfórico (Pi) según las horas de cultivo transcurridas.

En ambos paneles, los símbolos situados sobre cada una de las curvas indican las condiciones de cultivo, de la siguiente manera: Círculos negros: cultivo en presencia de volátiles fúngicos durante todo el día (las 16 horas de luz y las 8 horas de oscuridad); círculos sin relleno: cultivo en presencia de volátiles fúngicos durante las 16 horas de luz; ausencia de volátiles fúngicos durante las 8 horas de oscuridad; cuadrados con relleno oscuro: cultivo sin volátiles, incluso durante el período de luz; triángulos con relleno oscuro: cultivo con volátiles, en ausencia de luz durante las 24 horas de cultivo.

Fig. 5: Cinética de la acumulación de almidón y de la actividad de la enzima sacarosa sintasa (SuSy) en plantas de patata.

65 - Panel A: cuantificación del contenido de almidón en hojas de plantas de *Arabidopsis thaliana* según el tiempo transcurrido, expresado en horas en abscisas, de exposición a la luz y a volátiles fúngicos producidos por un cultivo de *Alternaria alternata*. El almidón se expresa como micromoles (μmol) de glucosa por gramo de peso fresco (FW).

- Panel B: cuantificación de la actividad de la enzima sacarosa sintasa (SuSy), expresada en miliunidades (mU) por gramo de peso fresco (FW), detectada en hojas de plantas de *Arabidopsis thaliana* según el tiempo transcurrido, expresado en horas en abscisas, de exposición a la luz y a volátiles fúngicos producidos por un cultivo de *Alternaria alternata*.

Fig. 6: Cinética de acumulación de almidón en hojas cortadas de *Arabidopsis* incubadas en placas de Petri con MS sólido con 90 mM sacarosa y en presencia o ausencia de 50 μM de cicloheximida (Sigma) o 200 μM de cordicepina (Sigma). Las placas fueron depositadas en una caja de 500 centímetros cúbicos en la que previamente se había introducido un cultivo de *A. alternata*.

Fig. 7: Proceso de obtención de plásmidos útiles para la transformación de plantas mediante la tecnología Gateway, que contienen las secuencias codificantes que se indican en la parte superior izquierda de los esquemas, a partir de productos de PCR que incorporan las secuencias de reconocimiento de recombinasa attB1 y attB2. Panel A: inhibidor de proteasas; Panel B: nitrito reductasa en antisentido; Panel C: cisteína sintasa en antisentido.

Fig. 8: Fotografías de plantas de *Arabidopsis* cultivadas durante 4 días en MS sólido dentro de una caja de plástico de 500 centímetros cúbicos junto a 2 centímetros cúbicos de agua (fotografía superior, marcada como 0%) o 2 centímetros cúbicos de una disolución acuosa de amoníaco al 2% (fotografía intermedia) o al 5% (fotografía inferior), v/v.. Claramente, la presencia de amoníaco conlleva a una despigmentación de las hojas e inhibe el crecimiento de las plantas.

Ejemplos

- Ejemplo 1

Identificación de compuestos volátiles implicados en el incremento de la acumulación de almidón

1.1. Identificación de las sustancias con capacidad de incrementar la acumulación de almidón

Con el fin de dilucidar si las mezclas de volátiles producidos por microorganismos contenían compuestos específicos responsables del aumento del crecimiento y compuestos responsables del incremento de la acumulación de almidón, o si existían compuestos capaces de producir ambos efectos, se llevaron a cabo ensayos de cultivos de plantas de *Arabidopsis thaliana* (cv. Columbia) similares a los que se llevaron a cabo en la solicitud de patente principal, aunque sustituyendo los cultivos microbianos por disoluciones de los volátiles a ensayar. Para ello, las plantas se cultivaron en placas Petri que contenían medio MS sólido con sacarosa 90 mM. Las plantas germinaron y se hicieron crecer durante dos semanas en cámaras de crecimiento con un fotoperíodo de 16 h de luz ($300 \mu\text{mol fotones s}^{-1} \text{ m}^{-2}$) y a una temperatura constante de 24°C.

Las placas Petri que contenían plantas completamente desarrolladas se colocaron en cajas de cultivo de 500 centímetros cúbicos idénticas a las utilizadas en la solicitud de patente principal, con la diferencia de que en dichas cajas, en lugar de cultivos microbianos, se introdujeron, en cada caso, placas de petri que contenían 2 centímetros cúbicos de disoluciones acuosas al 5% de uno de los siguientes compuestos: indol, DTT (ditiotreitól), NAA (ácido 1-naftalenoacético), β -mercaptoetanol, ácido salicílico, ácido jasmónico, cisteína, acetofina, etanol, metanol, β -hidroxibutirato, butanediol, ácido propiónico, ácido acético, acetaldehído, ácido fórmico o ácido butírico, sin que existiera contacto físico entre la planta y la disolución. El etileno se aportó en forma de polvos de etefón. Las cajas se sellaron y las hojas se recogieron tras dos días de incubación para realizar el análisis del contenido de almidón. Las hojas se recogieron al final de período de luz. Como control negativo, las placas Petri que contenían plantas completamente desarrolladas se cultivaron durante dos días en cajas de plástico selladas junto con una placa de Petri que contenía 2 centímetros cúbicos de agua en ausencia de cualquiera de los compuestos volátiles ensayados.

El almidón se midió utilizando un kit de ensayo basado en la amiloglucosidasa (Boehringer Mannheim, Alemania).

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 1A.

Tal como se ilustra en la misma, ni la acetofina ni el butanediol, compuestos previamente implicados en aumento del crecimiento de las plantas, están implicados en MIVOISAP (**m**icrobial **v**olátiles **i**nduced **s**tarch **a**ccumulation **p**rocess: proceso de acumulación de almidón inducido por volátiles microbianos). Como se comentó previamente, ambas sustancias volátiles son emitidas por algunos aislados del género *Bacillus* y ambas están implicadas en la promoción del crecimiento de las plantas ejercido por estos microorganismos. Esto demuestra que MIVOISAP no tiene nada que ver con la promoción del crecimiento por productos neutros, tales como la acetofina y el butanediol, que son producidos por algunos microorganismos a partir del ácido pirúvico como alternativa a las vías de metabolización de este compuesto, sino que está determinado por algunas sustancias ácidas procedentes también de la metabolización del ácido pirúvico siguiendo rutas metabólicas diferentes tales como acetato, ácido fórmico, etc.

De todas las sustancias volátiles analizadas, sólo el ácido propiónico, el ácido acético, el acetaldehído, el ácido fórmico y el ácido butírico promueven la sobreacumulación del almidón. Además, disoluciones al 0.2% de ácido fórmico promueven el crecimiento y floración de la planta (Fig. 2), lo cual indica fuertemente que el efecto MIVOISAP

divulgado en la patente principal P201000499 (consistente en el incremento de la acumulación de almidón, incremento del crecimiento y modificaciones en el patrón de crecimiento entre las que se incluye la inducción de la floración) es debido a la liberación de pequeñas cantidades de estas sustancias ácidas por parte de los microorganismos.

5

1.2. Efecto de la concentración de los volátiles en la acumulación de almidón

Para demostrar si este efecto era dependiente de la dosis del compuesto, se repitió el ensayo del apartado anterior, creciendo las plantas en presencia de disoluciones acuosas de 2 centímetros cúbicos de ácido propiónico, ácido acético, 10 acetaldehído o ácido butírico, ensayando para cada uno de ellos tres concentraciones diferentes, cada uno en distintas cajas: al 1%, 2% ó 5% (v/v).

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 1B. El ensayo corrobora el efecto positivo sobre la acumulación de almidón de estos compuestos y, además, demuestra que el efecto es dependiente de la dosis del compuesto volátil 15 presente.

- Ejemplo 2

20 *Influencia de los defectos en la síntesis de ácido pirúvico sobre la acumulación de almidón producida por mezclas de volátiles emitidas por microorganismos*

Tal como se divulga en la solicitud de patente principal P201000499, el incremento en la acumulación de almidón se observa cuando las plantas se cultivan en presencia de distintos microorganismos capaces de producir volátiles: 25 bacterias, levaduras y mohos. Entre ellos, el cultivo de plantas de *Arabidopsis thaliana* en presencia de un cultivo de la bacteria *Escherichia coli* BW25113 mostraba igualmente el efecto de incremento de acumulación del almidón, cuando dicha bacteria se cultivó en placas Petri que contenían medio mínimo M9 sólido (95 mM Na₂HPO₄/44 mM KH₂PO₄/17 mM NaCl/37 mM NH₄Cl/0,1 mM CaCl₂/2 mM MgSO₄, agar bacteriológico al 1,5%) suplementado con glucosa 50 mM.

30

Para corroborar los resultados obtenidos en el Ejemplo 1 de la presente solicitud de adición a la patente principal P201000499, se procedió a repetir el ensayo de medida de la acumulación de almidón por mezclas de volátiles producidos por microorganismos, utilizando una cepa mutante de *Escherichia coli*, *E. coli* Δ*pykF* (Baba, T., 35 Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L. and Mori, H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. Mol. Syst. Biol. doi: 10.1038/msb4100050), que es mutante en el gen *pykF* que codifica para la piruvato quinasa y que, debido a ello, produce menos cantidades de piruvato y, en consecuencia, también menor cantidad de sustancias tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico y acetaldehído que las cepas silvestres de *E. coli*.

40

Así, se repitió el ensayo del Ejemplo 1 anterior, aunque en este caso las plantas se colocaron en cajas de plástico estériles de 500 centímetros cúbicos que contenían cultivos microbianos de *Escherichia coli* BW25113 (control de cepa silvestre) o bien de *Escherichia coli* Δ*pykF*.

45

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 3. En la misma se demuestra que este mutante, con defectos en la síntesis de ácido pirúvico y compuestos derivados de su metabolismo tales como el ácido acético, el ácido fórmico, el ácido propiónico o el acetaldehído, ejerce un efecto parcial en MIVOISAP.

50 - Ejemplo 3

Cinética de la acumulación de almidón

Para investigar (a) cómo se producía la acumulación de almidón a lo largo del tiempo desde el momento de exposición a los volátiles microbianos, (b) la posible implicación de mecanismos de regulación a nivel transcripcional y post-transcripcional del proceso y (c) la influencia que la luz pudiera tener en la acumulación, se realizaron ensayos de cinética de acumulación de almidón en dos plantas diferentes: *Arabidopsis thaliana* (cv. Columbia) y patata (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée). Como en el Ejemplo 1, las plantas se cultivaron en placas Petri que contenían medio MS sólido con sacarosa 90 mM. Las plantas se hicieron crecer en cámaras de crecimiento con un fotoperíodo de 16 h de luz (300 μmol fotones s⁻¹ m⁻²), 8 horas de oscuridad y a una temperatura constante de 24°C. Tras aproximadamente 2 semanas de crecimiento después del momento de la germinación, las plantas se colocaron en cajas de plástico de 500 centímetros cúbicos en las que previamente se había introducido cultivos de *Alternaria alternata* en placas Petri que contenían medio MS sólido suplementado con sacarosa 90 mM. A los tiempos indicados en las Figs. 4 y 5 se recolectaron las hojas para posteriores análisis del contenido de almidón, 3PGA, Pi y actividad 65 SuSy.

ES 2 376 734 A1

3.1. Cinética de *Arabidopsis thaliana*

Se llevó a cabo la incubación de las plantas de *Arabidopsis thaliana* como se ha comentado en la introducción, con 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (salvo en uno de los ensayos en los que el paso de la luz fue evitado envolviendo la caja de plástico con papel de aluminio), utilizando varias condiciones de presencia o ausencia de cultivo *Alternaria alternata* y, por tanto, de presencia o ausencia de volátiles microbianos, dando lugar a los gráficos que se representan en la Fig. 4. Las condiciones fueron las siguientes:

- Cultivo en presencia de volátiles fúngico durante todo el día (las 16 horas de luz y las 8 horas de oscuridad) (curva con círculos negros en el gráfico).
- Cultivo en presencia de volátiles fúngicos durante las 16 horas de luz; ausencia de volátiles fúngicos durante las 8 horas de oscuridad (curva con círculos sin relleno en el gráfico).
- Cultivo sin volátiles, incluso durante el período de luz (curva con cuadrados rellenos en el gráfico).
- Cultivo con volátiles, en ausencia de luz durante las 16 primeras horas de cultivo. Aunque el cultivo tuvo lugar durante el período de 16 horas de iluminación, la caja de plástico fue envuelta en papel de aluminio, evitando así el contacto con la luz.

Los resultados obtenidos al evaluar el almidón acumulado (Fig. 4A) muestran que en ausencia de luz, incluso en presencia de volátiles y sacarosa en el medio de cultivo de la planta, no hay síntesis de almidón. En presencia de luz sin volátiles microbianos la tasa de acumulación de almidón es de aproximadamente 8 nanomoles de glucosa transferida al almidón por gramo de peso fresco y minuto. En presencia de luz y volátiles microbianos, durante las 2 primeras horas de cultivo la tasa de acumulación de almidón es de aproximadamente 100 nanomoles de glucosa transferida al almidón por gramo de peso fresco y minuto. Tras 2 horas de incubación de las hojas en presencia de volátiles microbianos, la tasa de acumulación de almidón es de aproximadamente 500 nanomoles de glucosa transferida al almidón por gramo de peso fresco y minuto. Concluidas las 16 horas de luz, la ausencia de la misma hace disminuir el almidón acumulado.

Los resultados demuestran la conexión existente entre los procesos metabólicos implicados en MIVOISAP y la luz.

Adicionalmente, haciendo uso de las plantas cultivadas en las mismas condiciones, se comprobó el balance 3PGA/Pi según se describe en Muñoz *et al.*, 2005: Plant Cell Physiol. 46: 1366-1376. 3-PGA (ácido 3-fosfoglicérico) es un activador alostérico de la ADPglucosa pirofosforilasa, mientras que el ortofosfato (Pi) es un regulador negativo de esta enzima implicada en la producción plastidial de ADPglucosa. Los resultados se muestran en la Fig. 4B, en la que puede observarse que la relación 3PGA/Pi se incrementa en el caso de plantas cultivadas en presencia de luz con volátiles fúngicos; la curva parece indicar, además, una relación entre el incremento de almidón y el incremento con el tiempo del valor obtenido de esta relación. En cambio, en ausencia de volátiles y presencia de luz, o en presencia de volátiles y ausencia de luz, los valores obtenidos a lo largo de tiempo vienen a ser similares para los dos tipos de condiciones de cultivo, con pequeñas oscilaciones a lo largo del tiempo. Los resultados presentados en la Fig. 4B parecen indicar que MIVOISAP es debido, al menos en parte, a mecanismos de regulación post-transcripcional tales como la activación alostérica de la ADPglucosa pirofosforilasa.

3.2. Cinética en plantas de patata

Se repitió el experimento del apartado 3.1., utilizando en este caso plantas de patata. En este caso, se midió la acumulación de almidón durante las 16 horas de luz y, adicionalmente, se comprobó también la actividad de la enzima sacarosa sintasa (Susy).

La medida de la actividad de la enzima SuSy se realizó de forma idéntica a la descrita en la solicitud de patente principal. Brevemente, 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. La suspensión se desaló y se ensayó en ella la actividad enzimática, tal como ha sido descrito por Baroja-Fernández *et al.* (Baroja Fernández *et al.*, 2009: Plant Cell Physiol. 50: 1651-1662).

Los resultados se representan en la Fig. 5, en la que aparecen sólo los datos correspondientes a plantas incubadas en presencia de luz y de volátiles fúngicos. El panel A corresponde a la acumulación de almidón y el panel B a la actividad de SuSy.

Los datos obtenidos demuestran que existen mecanismos transcripcionales (incremento de la expresión de SuSy) que regulan MIVOISAP.

ES 2 376 734 A1

3.3 Cinética de la acumulación de almidón en presencia o ausencia de inhibidores transcripcionales y traduccionales

Se repitió el experimento del apartado 3.1, utilizando en este caso hojas cortadas de *Arabidopsis* incubadas en placas de Petri con medio MS sólido suplementado con 90 mM sacarosa y, en su caso, con 50 micromolar (μM) del inhibidor de traducción cicloheximida (Sigma) y 200 micromolar (μM) del inhibidor de transcripción cordicepina (Sigma) (Fritz, C.C. *et al.*, 1991: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 4458-4462; Hayashi, T. and Takagi, S., 2003; Plant Cell Physiol. 44: 1027-1036; Dhonukshe *et al.*, 2006: Developmental Cell 10: 137-150). Las placas fueron depositadas en cajas de 500 centímetros cúbicos en las que previamente se habían depositado cultivos de *Alternaria alternata*. Los resultados presentados en la Fig. 6 según los cuales ambas sustancias inhiben fuertemente la acumulación de almidón a partir de las 2 horas de incubación en presencia de volátiles fúngicos emitidos por *Alternaria alternata* sugieren aún más que MIVOISAP está regulado, al menos en parte, transcripcionalmente.

15 - Ejemplo 4

Plásmidos útiles para la preparación de plantas transgénicas con capacidad incrementada de acumulación de almidón

MIVOISAP está regulado transcripcionalmente. Por lo tanto, tal como se ha comentado previamente, la reproducción mediante transgénesis de los cambios metabólicos inducidos por MIVOISAP debería dar lugar a plantas transgénicas en las que la acumulación de almidón se incrementara con respecto a las plantas de tipo silvestre de la misma especie. Para producir esas plantas, ese necesario contar con vectores adecuados.

Para ello, se recurrió al protocolo Gateway de construcciones de vectores para la transformación de plantas (Nakagawa *et al.*, 2007: Journal of Bioscience and Bioengineering 104: 34-41), que se basa en la inserción de fragmentos de secuencias de ADN bicatenario en sitios específicos de vectores, aprovechando las propiedades específicas de sitio del bacteriófago lambda, el uso de recombinasas y en la presencia de secuencias de reconocimiento para las mismas tanto en el fragmento a insertar, como en los vectores en los que desea insertarse. El proceso requiere la presencia de secuencias de recombinación de ADN del fago lambda (sitios att) flanqueando, por una parte, el fragmento que se quiere insertar, y por otra, la presencia de las secuencias att complementarias en el vector en el que se desee insertar dicho fragmento de ADN. El proceso requiere, necesaria, la presencia de la recombinasa capaz de reconocer las secuencias att del fragmento que se quiere insertar (attB: attB1 y attB2, equivalentes a los sitios que se encuentran de manera natural en el genoma de *E. coli*) y las correspondientes secuencias en el vector en el que se desean insertar (attP: attP1 y attP2, respectivamente, correspondientes a las secuencias presentes en el bacteriófago lambda). La recombinasa reconocerá ambos pares de secuencias y producirá la inserción del fragmento de ADN en el vector, entre las secuencias attP1 y attP2; el empalme se produce de tal forma que desaparecen en las secuencias attB y attP, generándose en el vector recombinante secuencias attL (attL1 y attL2); este paso sería el equivalente a la inserción del bacteriófago lambda en el genoma de la bacteria. Si estas secuencias, a su vez, son reconocidas por una segunda recombinasa, una segunda reacción de recombinación en presencia de un vector que poseyera la pareja complementaria de sitios att reconocidos por esa segunda recombinasa (attR: attR1 y attR2), permitiría un segundo evento de recombinación.

En el presente ejemplo, se recurrió al uso de la tecnología Gateway, de Invitrogen, siguiendo las instrucciones del fabricante (protocolo de Gateway® Technology: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cloning/Gateway-Cloning/GatewayC-Misc/Protocols.html#bp>). Para producir las construcciones necesarias para expresar en antisentido la nitrito reductasa y la cisteína sintasa plastidial, se partió del vector comercial pDONR/Zeo, de Invitrogen, que posee las secuencias de recombinación attP1 y attP2, y de productos de PCR que poseían, en 5', una secuencia attB2 y en 3' una secuencia attB1, tal como puede observarse en las Fig. 7B (nitrito reductasa en antisentido) y 7C (cisteína sintasa en antisentido). En el caso de la construcción necesaria para expresar el inhibidor de la proteasa, el producto de PCR poseía en el extremo 5' una secuencia attB1 y en el extremo 3' una secuencia attB2 (Fig. 7A). Estos productos de PCR se obtienen realizando las reacciones de PCR con cebadores attB: Los cebadores attB se diseñan con la siguiente disposición:

Cebador para la inserción de la secuencia attB1:

5'-GGG-ACA-AGT-TTG-TAC-AAA-AAA-GCA-GGC-TNN- (secuencia específica para el molde de ADN a amplificar)-3'

Cebador para la inserción de la secuencia attB2:

5'-GGGG-AC-CAC-TTT-GTA-CAA-GAA-AGC-TGG-GTN- (secuencia específica para el molde de ADN a amplificar)-3'

En ambos casos, el fragmento subrayado representa a las secuencias attB1 y attB2 propiamente dichas y N representa cualquier nucleótido.

ES 2 376 734 A1

Esta misma estrategia se siguió para la amplificación de los fragmentos de ADN codificantes correspondientes a los genes de la planta de patata (*Solanum tuberosum*) del inhibidor de proteasas (SEQ ID NO:1), nitrito reductasa en antisentido (SEQ ID NO:3) y cisteína sintasa en antisentido (SEQ ID NO:5). Los cebadores específicos utilizados en cada caso fueron los siguientes:

5 - Inhibidor de proteasa:

 - proteínase inh attB1 (SEQ ID NO:7): 5'-

10 GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGAGTCAAAGTGTGCTC
ACATC-3'

15 - proteínase inh attB2 (SEQ ID NO:8): 5'-

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTAACCAACCACAGGAATCT
GTAC-3'

20 - Nitrito reductasa:

 - Nitrito reductasa attB1 (SEQ ID NO:9): 5'-

25 GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTATTAATCTTCTGTTTCTTCTC
TTTCTC-3'

30 - Nitrito reductasa attB2 (SEQ ID NO:10): 5'-

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAATGGCATCTTTTTCTATCAA
ATTTTTG-3'

35 - Cisteína sintasa:

 - pCys synthase attB1 (SEQ ID NO:11): 5'-

40 GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTATCACAATTCTGGCTTCATT
TTCTC-3'

45 - pCys synthase attB2 (SEQ ID NO:12): 5'-

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAATGGCATCTTTCATCAACAA
TCC-3'

50 Los fragmentos de las secuencias en negrita son los correspondientes a los genes amplificados, mientras que las partes subrayadas corresponden a las secuencias attB1 (secuencias con número de orden impar) o a las secuencias attB2 (secuencias con número de orden par).

55 De esta forma, se amplificaron las secuencias bicatenarias representadas por SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:5. Las secuencias que codifican para la nitrito reductasa y la cisteína sintasa (SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:5, respectivamente), presentaban en su extremo 5' una secuencia attB2 y en su extremo 3' una secuencia attB1, mientras que la secuencia que codifica para el inhibidor de proteasas presentaba en su extremo 5' una secuencia attB1 y en su extremo 3' una secuencia attB2.

60 El protocolo de inserción de estos fragmentos en plásmidos Gateway se basa en llevar a cabo dos reacciones de recombinación sucesivas; reacciónBP (para producir el vector de introducción) y reacción LR (que da lugar al vector de expresión) siguiendo las instrucciones del fabricante, Invitrogen). Para ello, se partió en todos los casos del vector comercial pDON/Zeo (Invitrogen; estructura. Pág. 50 del Protocolo de Gateway® Technology), que contiene entre los sitios de recombinación attP un gen de resistencia a cloranfenicol (Cm^R) y la secuencia del gen *ccdB*. Fuera de la región de recombinación presenta un gen de resistencia a zeocina (Zeo^R), bajo el control del promotor de EM7 que permite
65 la selección de las bacterias transformadas con este vector. La incubación de las secuencias bicatenarias representadas por SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 ó SEQ ID NO:5, flanqueadas por las correspondientes secuencias attB, con dicho factor pDON/Zeo, en presencia de la BP Clonasa® de Invitrogen, siguiendo las indicaciones del fabricante (pág. 22

del Protocolo de Gateway® Technology) dio lugar a un vector de recombinación en el que el fragmento de ADN bicatenario deseado había quedado insertado entre las secuencias attP1 y attP2 del plásmido, generando secuencias attL1 y attL2 y haciendo desaparecer el fragmento en el que se encontraban los genes de resistencia a cloranfenicol y el gen *ccdB* (plásmidos: pDONR Prot-Inhb, pDONR NR y pDONR Cys-Synth, respectivamente). Cada uno de estos plásmidos se amplificó tras su transformación en células competentes *E. coli* TOP 10, seleccionando las transformantes mediante el uso de la resistencia a zeocina conferida por el plásmido.

Una vez amplificado el plásmido recombinante, se llevó a cabo su inserción en el plásmido pGWB2 (Nakagawa T, Kurose T, Hiño T, Tanaka K, Kawamukai M, Niwa Y, Toyooka K, Matsuoka K, Jinbo T, Kimura T. 2007 Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. J. Biosci. Bioeng. 104(1): 34-41), que contiene las secuencias de recombinación attR1 y attR2, que permiten la inserción entre las mismas de un fragmento flanqueado por secuencias attL1 y attL2 en presencia de la recombinasa LR Clonase® (Invitrogen). Este vector permite la expresión constitutiva de secuencias codificantes mediante el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Este vector posee dos marcadores de selección de plantas transformadas: el gen de la higromicina fosfotransferasa (*Hyg*) bajo el control del promotor 35S de CaMV, y un gen de resistencia a kanamicina (*Kan*) bajo el control del promotor Nos. Las secuencias attR1 y attR2 flanquean un fragmento del vector en el que se encuentran los genes *ccdB* y *cat*, que serán reemplazados por los genes de interés después de la reacción de recombinación llevada a cabo por la recombinasa LR. La reacción de recombinación da lugar a la inserción del gen de interés entre las secuencias attR1 y attR2, regenerándose las secuencias attB1 y attB2 flanqueando los extremos del gen de interés y perdiéndose los genes *ccdB* y *cat*, pero manteniendo el plásmido final el gen de resistencia a kanamicina (*Kan*) y el gen de la higromicina fosfotransferasa (*Hyg*). Cuando *Agrobacterium tumefaciens* transforma una célula vegetal va a transferir al genoma de la planta un fragmento de ADN del plásmido pGWB2 comprendido entre las secuencias denominadas LB (left border) y RB (right border), el cual incluye los genes de resistencia a kanamicina e higromicina y el gen de interés.

Estos plásmidos serían adecuados para la generación de plantas transgénicas que expresaran al menos una secuencia nucleotídica seleccionada entre el gen que codifica para un inhibidor de proteasas y los antisentidos de los genes que codifican para la nitrito reductasa plastidial y la cisteína sintasa, lo que permitiría utilizar dichas plantas para obtener un incremento en la acumulación de almidón.

- Ejemplo 5

Influencia del amoníaco en el crecimiento y color de las plantas

Con el fin de obtener más información sobre la teoría, expuesta en la solicitud de patente principal, de que los microorganismos que crecen en medios ricos en compuestos que presentan grupos amino, especialmente si son medios ricos en aminoácidos, producen volátiles que afectan negativamente al crecimiento y el desarrollo de las plantas, volátiles que no se producen cuando los microorganismos se hacen crecer en medios mínimos que carecen de aminoácidos, se repitió el ensayo de los apartados 1.1 y 1.2. del Ejemplo 1, creciendo las plantas en presencia de disoluciones acuosas de 2 centímetros cúbicos de amoníaco, ensayando dos concentraciones diferentes, cada una en distintas cajas: al 2% ó 5% (v/v). Se incluyó también un control en el que las plantas crecieron en presencia de agua a la que no se le había añadido otro compuesto.

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 8. Se observa que la presencia de amoníaco en la atmósfera de crecimiento da lugar a despigmentación de las plantas e inhibición del crecimiento, efectos que son más acusados en el caso de las plantas que se crecieron en presencia de mayor concentración de amoníaco y que no se observan en ausencia de este compuesto (fotografías marcadas con la leyenda "0%"), pues las plantas control presentaban color verde y mayor tamaño que las crecidas en presencia de amonio.

Este resultado, como se comentó previamente, constituye una prueba importante de que los microorganismos cultivados en medios ricos en aminoácidos producen volátiles, tales como el amoníaco, que inhiben el crecimiento y afectan negativamente el color; tales compuestos, sin embargo, no se producen cuando los microorganismos son cultivados en medios mínimos que carecen de aminoácidos.

ES 2 376 734 A1

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 una atmósfera en la que está presente al menos un compuesto volátil que se selecciona entre ácido propiónico, ácido acético, acetaldehído, ácido fórmico y ácido butírico.

10 2. Método según la reivindicación 1, en el que la planta se cultiva en una atmósfera en la que está presente al menos ácido fórmico.

15 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el compuesto volátil está presente en la atmósfera por evaporación de una disolución que lo contiene que se encuentra en el lugar de cultivo de la planta.

20 4. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el compuesto volátil se suministra a la atmósfera de cultivo desde el exterior al lugar de cultivo de la planta.

25 5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el incremento del crecimiento se manifiesta en aumento de la longitud de la planta y/o en aumento del tamaño de las hojas, tallos y raíces.

30 6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, 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 y semillas de plantas angiospermas, en la inducción de la floración, o en combinaciones de los anteriores.

35

40

45

50

55

60

65

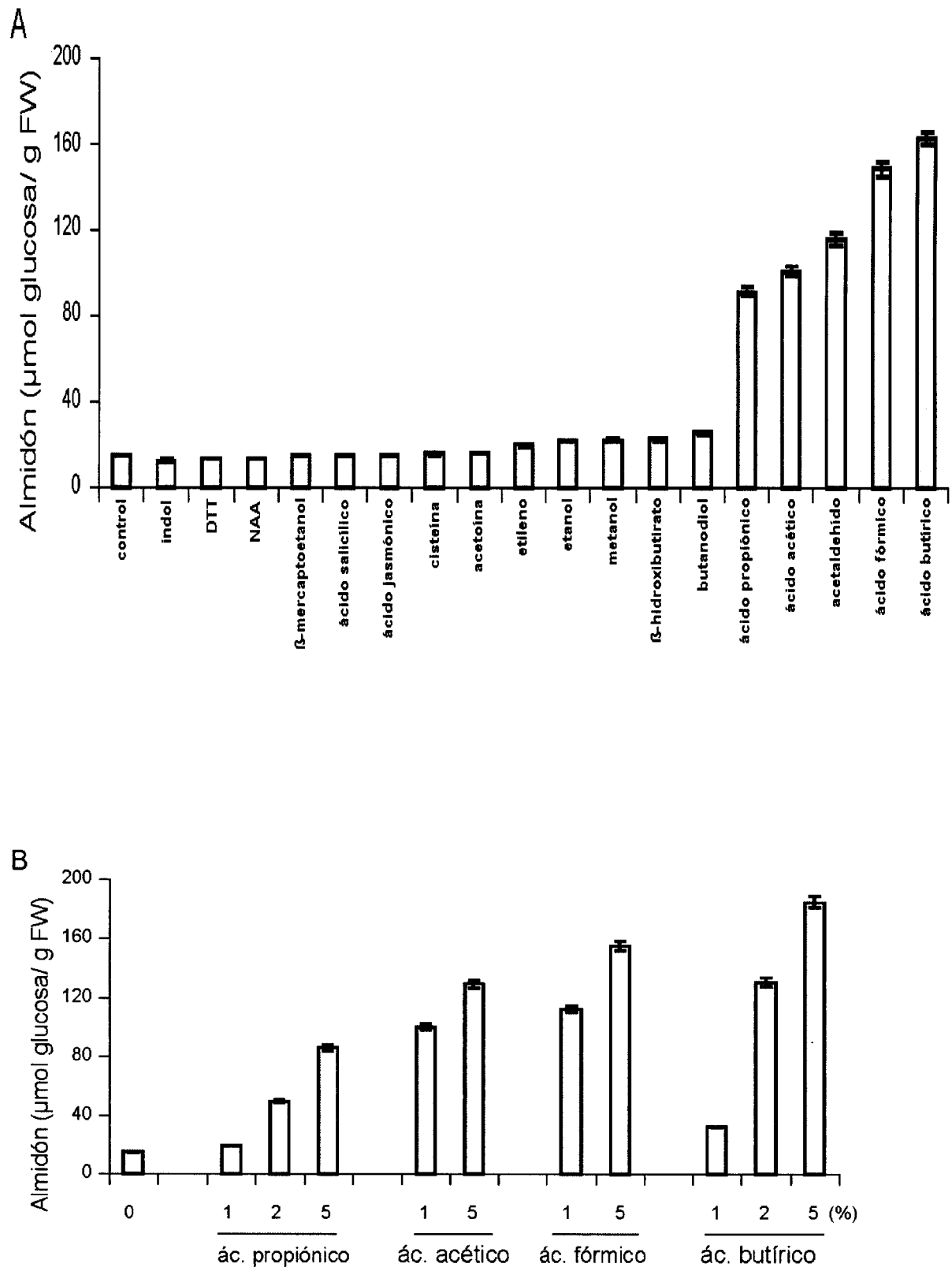


Fig. 1



Fig. 2

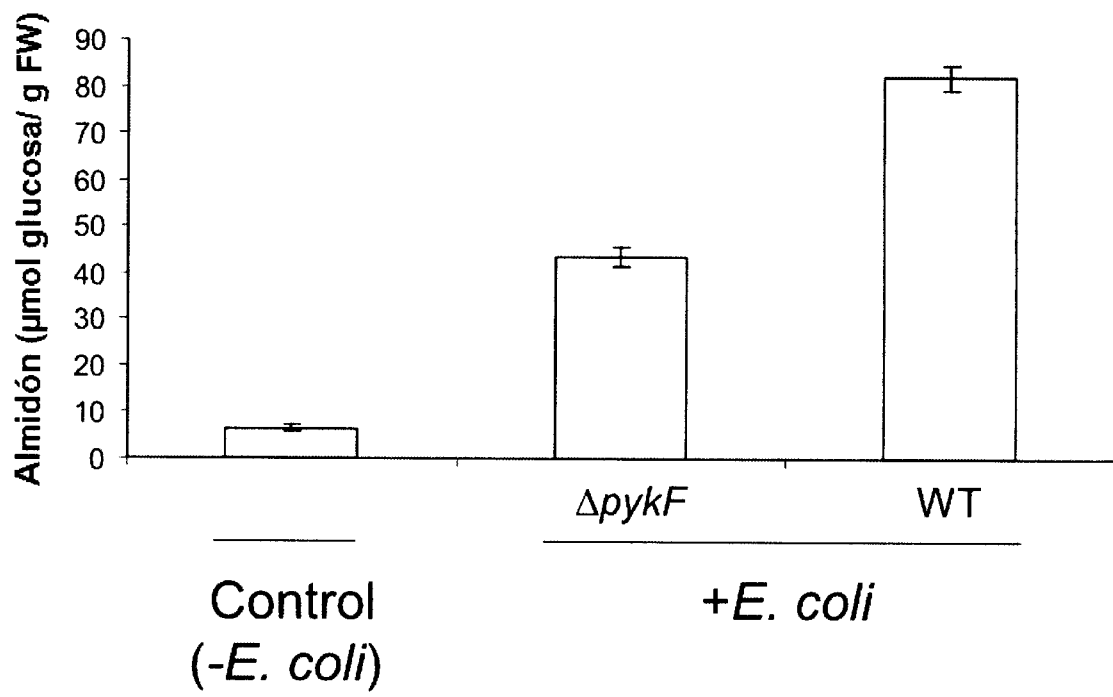
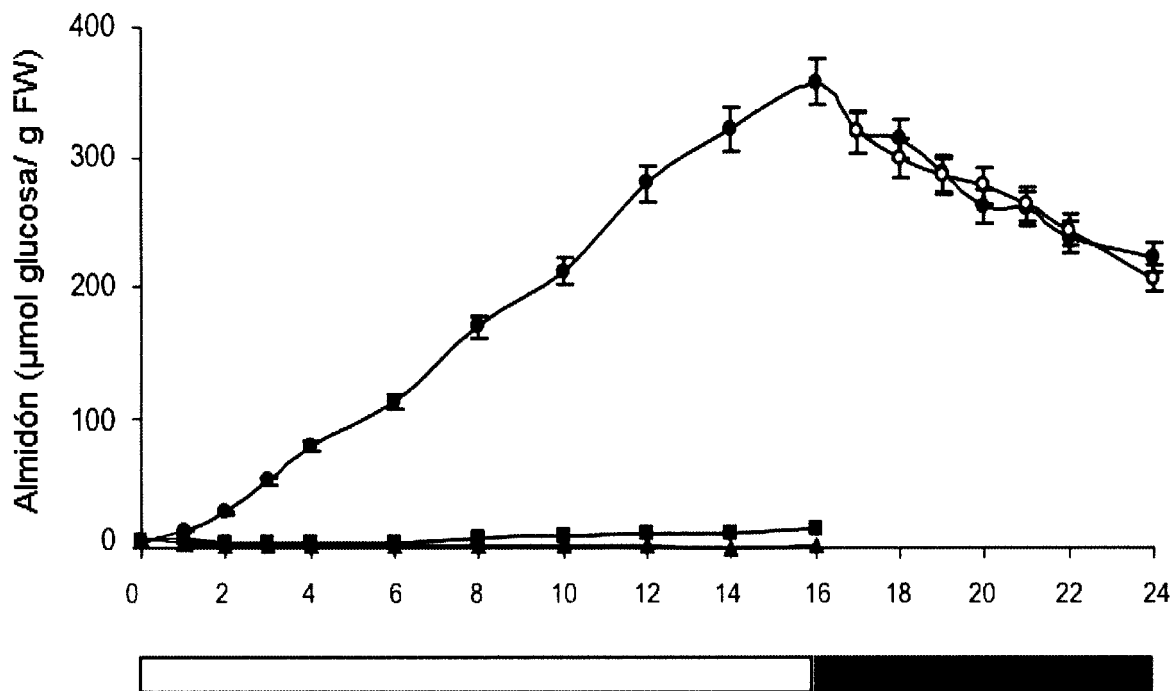


Fig. 3

A



B

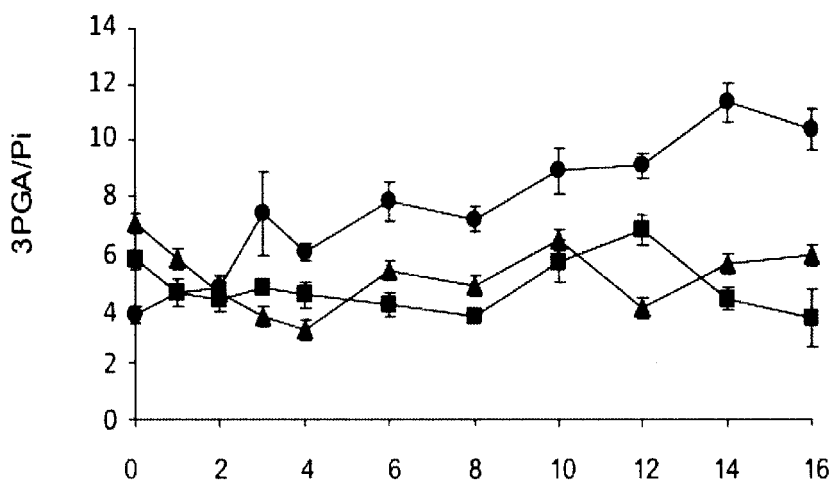
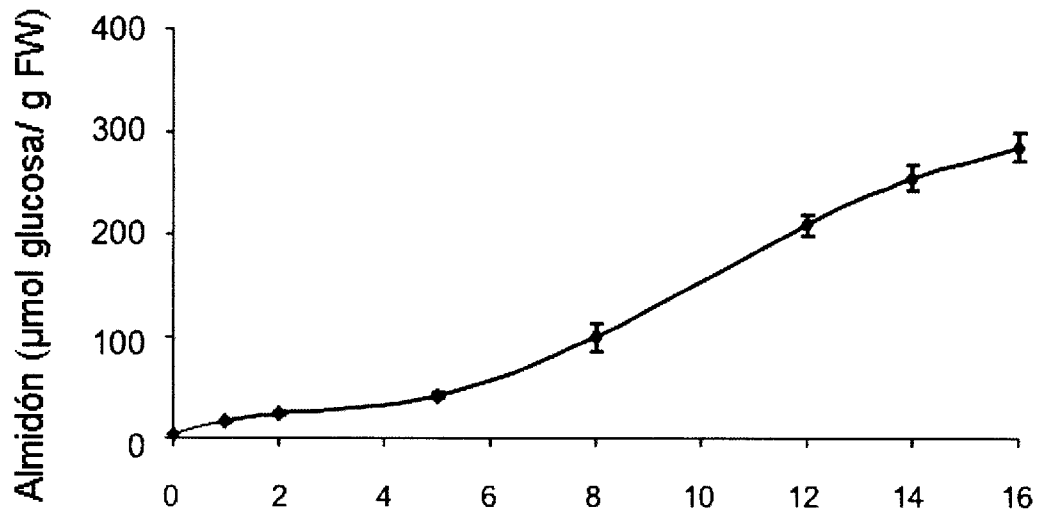


Fig. 4

A



B

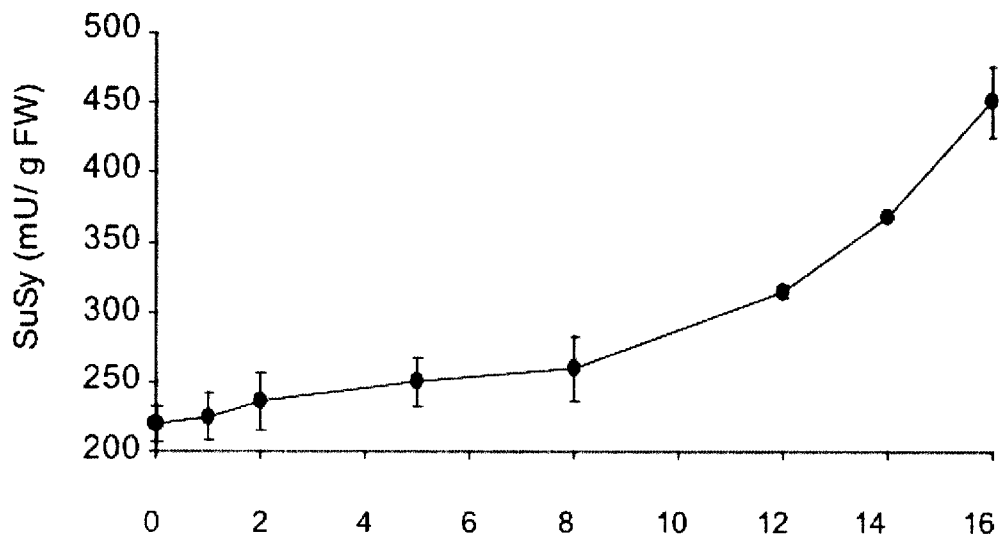


Fig. 5

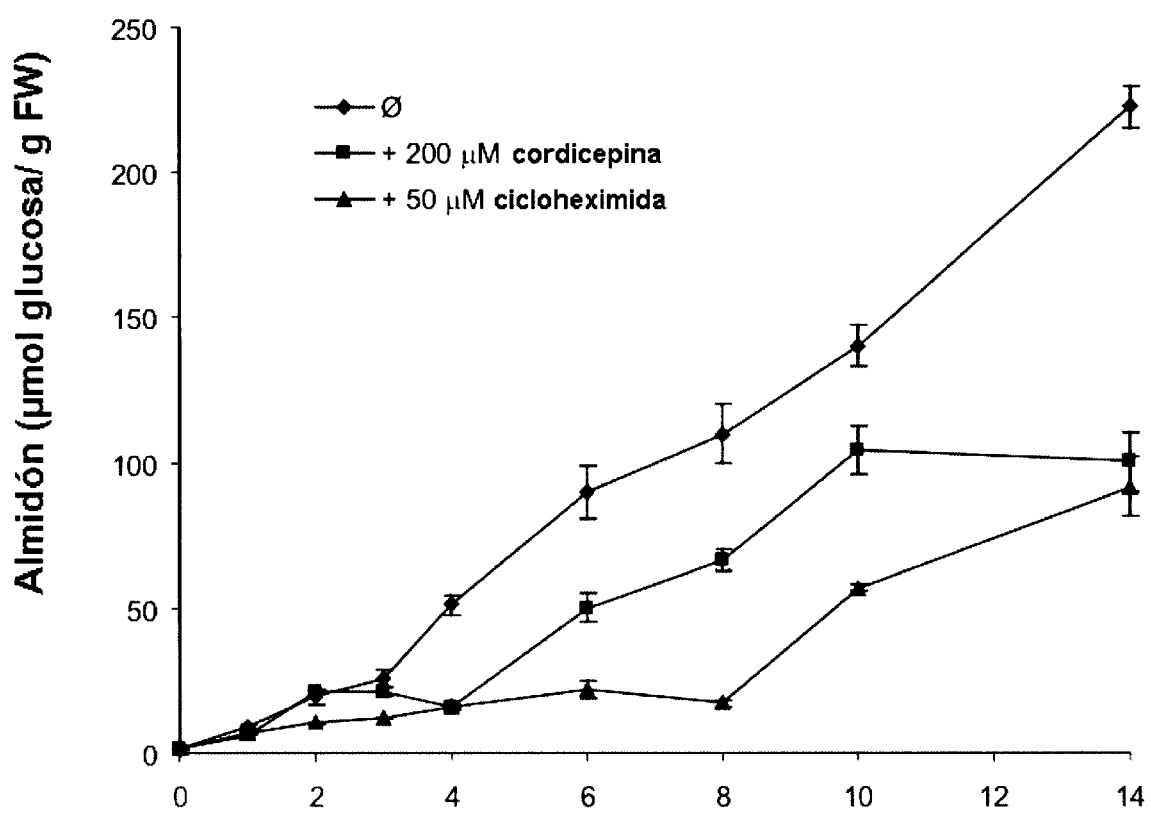


Fig. 6

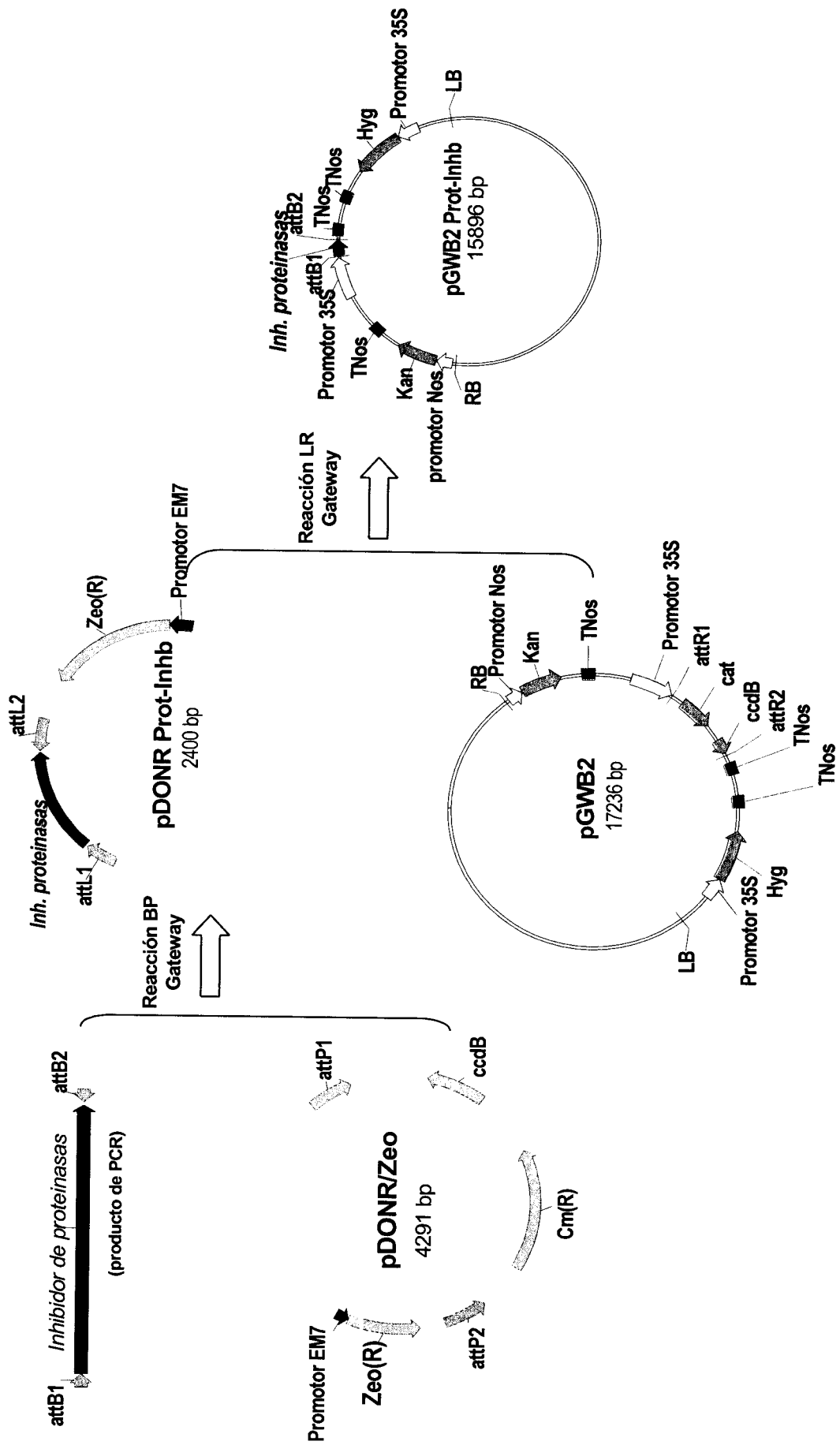


Fig. 7 A

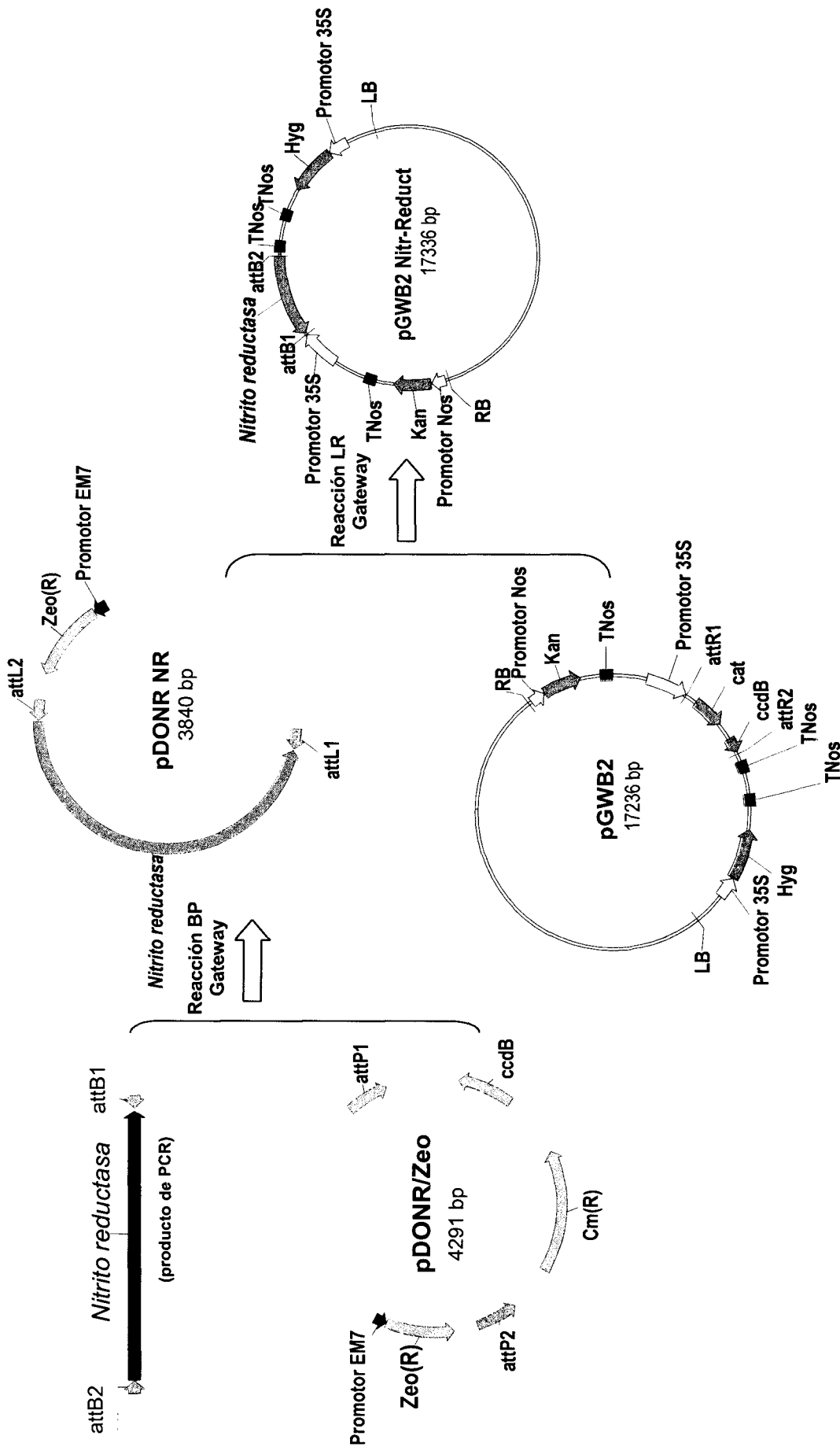


Fig 7B

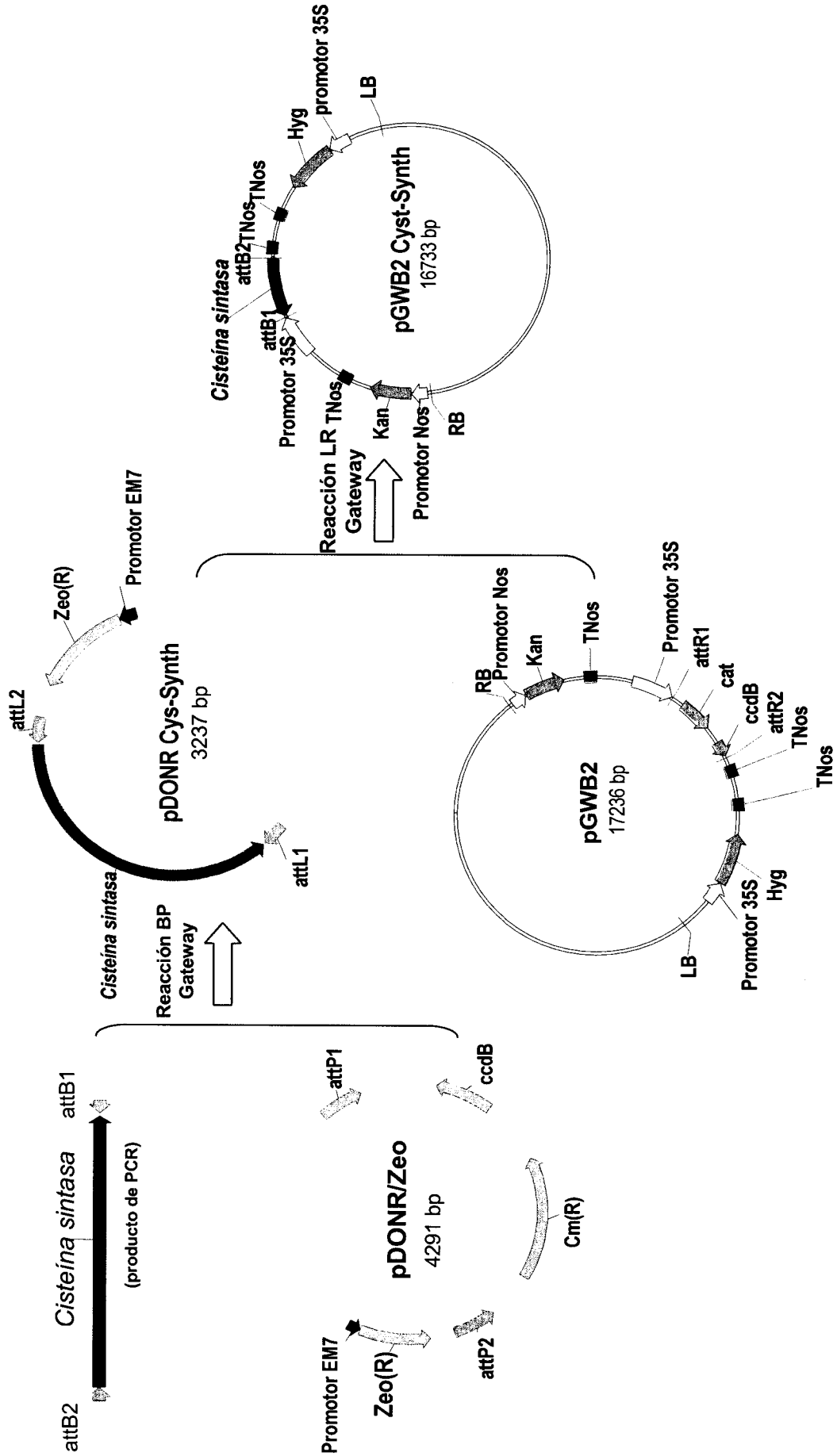
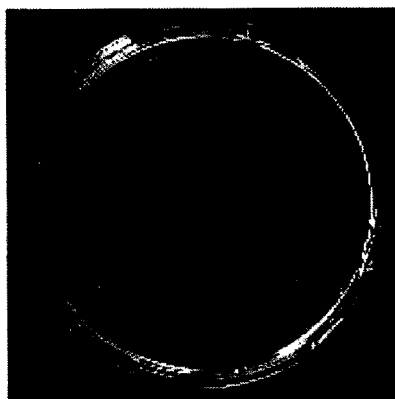


Fig. 7C

0 %



2 %



5 %



Fig. 8

ES 2 376 734 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> IDEN BIOTECHNOLOGY, S.L.

5 <120> MEJORAS INTRODUCIDAS EN EL OBJETO DE LA PATENTE PRINCIPAL Nº P2010004 99 POR 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-32622

<160> 12

15 <210> 1

<211> 324

<212> DNA

<213> *Solanum tuberosum*

20

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

25

<223> Secuencia codificante del Inhibidor de proteasas de patata

<400> 1

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

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

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

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

50 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

55 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

60 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

65

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

65

<213> *Solanum tuberosum*

ES 2 376 734 A1

<400> 2

```

Met Glu Ser Lys Cys Ala His Ile Ile Val Phe Phe Leu Leu Ala Thr
1          5          10          15
5  Ser Phe Glu Thr Leu Met Ala Gln Lys Glu Ser Asp Gly Leu Glu Ala
          20          25          30
10 Ile Glu Leu Leu Lys Glu Phe Glu Cys Lys Gly Lys Leu Ser Trp Pro
          35          40          45
15 Glu Leu Ile Gly Val Pro Thr Lys Leu Ala Lys Gly Ile Ile Glu Lys
          50          55          60
20 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
25 Leu Gly Ser Val Val Gln Ile Pro Val Val Gly
          100          105

```

<210> 3

25 <211> 1764

<212> DNA

<213> *Solanum tuberosum*

30 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1764)

35 <223> Secuencia codificante de la nitrito reductasa de patata

<400> 3

```

atg gca tct ttt tct atc aaa ttt ttg gca cct tca ttg cca aat cca      48
40 Met Ala Ser Phe Ser Ile Lys Phe Leu Ala Pro Ser Leu Pro Asn Pro
1          5          10          15
    act aga ttt tcc aag agt act att gtc aag ctc aat gca act ccg ccg      96
45 Thr Arg Phe Ser Lys Ser Thr Ile Val Lys Leu Asn Ala Thr Pro Pro
          20          25          30
    cag aca gtg gct gcg gtg ggg cct cca gag gtt gct gct gag aga cta      144
50 Gln Thr Val Ala Ala Val Gly Pro Pro Glu Val Ala Ala Glu Arg Leu
          35          40          45
    gaa cca aga gtt gag gaa aaa gat gga tat tgg ata caa aaa gag cag      192
55 Glu Pro Arg Val Glu Glu Lys Asp Gly Tyr Trp Ile Gln Lys Glu Gln
          50          55          60
    ttt agg caa ggt att aat cct caa gag aag gtg aag att gag aag gaa      240
60 Phe Arg Gln Gly Ile Asn Pro Gln Glu Lys Val Lys Ile Glu Lys Glu
          65          70          75          80
    cct atg aag ttg ttc atg gaa aat ggt att gaa gag tta gct aag att      288
65 Pro Met Lys Leu Phe Met Glu Asn Gly Ile Glu Glu Leu Ala Lys Ile
          85          90          95
    cca att gaa gag ata gat caa tct aag ctt act aag gat gac atc gat      336
65 Pro Ile Glu Glu Ile Asp Gln Ser Lys Leu Thr Lys Asp Asp Ile Asp
          100          105          110

```


ES 2 376 734 A1

	Lys	Arg	Met	Pro	Gln	Gln	Glu	Leu	Glu	Arg	Ala	Ser	Pro	Glu	Asp	Leu	
			355					360					365				
5	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					380					
10	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					395					400	
15	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					415		
20	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					430			
25	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					445				
30	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					460					
35	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					475					480	
40	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					495		
45	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					510			
50	gtt	caa	gtt	gca	gac	att	gga	ttc	atg	gga	tgc	ctg	act	aga	gat	aag	1584
	Val	Gln	Val	Ala	Asp	Ile	Gly	Phe	Met	Gly	Cys	Leu	Thr	Arg	Asp	Lys	
			515				520						525				
55	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					
60	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	
65	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		
65	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							
65	<210> 4																
	<211> 587																

ES 2 376 734 A1

<212> PRT

<213> *Solanum tuberosum*

5 <400> 4

1	Met	Ala	Ser	Phe	Ser	Ile	Lys	Phe	Leu	Ala	Pro	Ser	Leu	Pro	Asn	Pro
	1				5				10						15	
10	Thr	Arg	Phe	Ser	Lys	Ser	Thr	Ile	Val	Lys	Leu	Asn	Ala	Thr	Pro	Pro
			20						25					30		
15	Gln	Thr	Val	Ala	Ala	Val	Gly	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Ala	Glu	Arg	Leu
			35					40					45			
20	Glu	Pro	Arg	Val	Glu	Glu	Lys	Asp	Gly	Tyr	Trp	Ile	Gln	Lys	Glu	Gln
		50					55					60				
25	Phe	Arg	Gln	Gly	Ile	Asn	Pro	Gln	Glu	Lys	Val	Lys	Ile	Glu	Lys	Glu
	65					70					75					80
30	Pro	Met	Lys	Leu	Phe	Met	Glu	Asn	Gly	Ile	Glu	Glu	Leu	Ala	Lys	Ile
					85					90					95	
35	Pro	Ile	Glu	Glu	Ile	Asp	Gln	Ser	Lys	Leu	Thr	Lys	Asp	Asp	Ile	Asp
			100						105					110		
40	Val	Arg	Leu	Lys	Trp	Leu	Gly	Leu	Phe	His	Arg	Arg	Lys	Asn	Gln	Tyr
			115					120					125			
45	Gly	Arg	Phe	Met	Met	Arg	Leu	Lys	Leu	Pro	Asn	Gly	Val	Thr	Thr	Ser
		130					135					140				
50	Ala	Gln	Thr	Arg	Tyr	Leu	Ala	Ser	Val	Ile	Arg	Lys	Tyr	Gly	Glu	Glu
	145					150					155					160
55	Gly	Cys	Ala	Asp	Ile	Thr	Thr	Arg	Gln	Asn	Trp	Gln	Ile	Arg	Gly	Val
				165						170					175	
60	Val	Leu	Pro	Asp	Val	Pro	Glu	Ile	Leu	Lys	Gly	Leu	Glu	Glu	Val	Gly
				180					185					190		
65	Leu	Thr	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Met	Asp	Asn	Val	Arg	Asn	Pro	Val	Gly
			195					200					205			
70	Asn	Pro	Leu	Ala	Gly	Ile	Asp	Pro	Glu	Glu	Ile	Val	Asp	Thr	Arg	Pro
		210					215					220				
75	Tyr	Thr	Asn	Leu	Leu	Ser	Gln	Phe	Ile	Thr	Gly	Asn	Ser	Arg	Gly	Asn
	225					230					235				240	
80	Pro	Ala	Val	Ser	Asn	Leu	Pro	Arg	Lys	Trp	Asn	Pro	Cys	Val	Val	Gly
				245						250					255	
85	Ser	His	Asp	Leu	Tyr	Glu	His	Pro	His	Ile	Asn	Asp	Leu	Ala	Tyr	Met
				260					265					270		
90	Pro	Ala	Ile	Lys	Asp	Gly	Arg	Phe	Gly	Phe	Asn	Leu	Leu	Val	Gly	Gly
			275					280					285			
95	Phe	Phe	Ser	Ala	Lys	Arg	Cys	Asp	Glu	Ala	Ile	Pro	Leu	Asp	Ala	Trp

ES 2 376 734 A1

	290		295		300											
5	Val 305	Pro	Ala	Asp	Asp	Val 310	Val	Pro	Val	Cys	Lys 315	Ala	Ile	Leu	Glu	Ala 320
	Phe	Arg	Asp	Leu	Gly 325	Phe	Arg	Gly	Asn	Arg 330	Gln	Lys	Cys	Arg	Met	Met 335
10	Trp	Leu	Ile	Asp	Glu 340	Leu	Gly	Val	Glu 345	Gly	Phe	Arg	Ala	Glu	Val	Glu 350
15	Lys	Arg	Met	Pro	Gln	Gln	Glu	Leu	Glu 360	Arg	Ala	Ser	Pro	Glu	Asp	Leu 365
	Val	Gln	Lys	Gln	Trp	Glu	Arg	Arg	Asp	Tyr	Leu	Gly 380	Val	His	Pro	Gln
20	Lys	Gln	Glu	Gly	Tyr	Ser	Phe	Ile	Gly	Leu	His	Ile	Pro	Val	Gly	Arg 400
	Val	Gln	Ala	Asp	Asp	Met	Asp	Asp	Leu	Ala	Arg	Leu	Ala	Asp	Glu	Tyr 415
25	Gly	Ser	Gly	Glu	Leu	Arg	Leu	Thr	Val	Glu	Gln	Asn	Ile	Ile	Ile	Pro 430
	Asn	Ile	Glu	Asn	Ser	Lys	Ile	Glu	Ala	Leu	Leu	Lys	Glu	Pro	Ile	Leu 445
30	Ser	Lys	Phe	Ser	Pro	Asp	Pro	Pro	Ile	Leu	Met	Lys	Gly	Leu	Val	Ala 460
35	Cys	Thr	Gly	Asn	Gln	Phe	Cys	Gly	Gln	Ala	Ile	Ile	Glu	Thr	Lys	Ala 480
40	Arg	Ser	Leu	Lys	Ile	Thr	Glu	Glu	Val	Gln	Arg	Gln	Val	Ser	Leu	Thr 495
	Arg	Pro	Val	Arg	Met	His	Trp	Thr	Gly	Cys	Pro	Asn	Thr	Cys	Ala	Gln 510
45	Val	Gln	Val	Ala	Asp	Ile	Gly	Phe	Met	Gly	Cys	Leu	Thr	Arg	Asp	Lys 525
50	Asp	Lys	Lys	Thr	Val	Glu	Gly	Ala	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Gly	Arg	Ile 540
55	Gly	Ser	Asp	Ser	His	Leu	Gly	Glu	Val	Tyr	Lys	Lys	Ala	Val	Pro	Cys 560
	Asp	Glu	Leu	Val	Pro	Leu	Ile	Val	Asp	Leu	Leu	Val	Asn	Asn	Phe	Gly 575
60	Ala	Val	Pro	Arg	Glu	Arg	Glu	Glu	Thr	Glu	Asp					

<210> 5

65 <211> 1161

<212> DNA

<213> *Solanum tuberosum*

ES 2 376 734 A1

	210		215		220		
5	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
10	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
15	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	
20	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	
25	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	
30	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
35	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
40	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	
45	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	
50	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						
		370		375		380	
55	gaa ttg tga						1161
	Glu Leu						
	385						
	<210> 6						
	<211> 386						
	<212> PRT						
	<213> <i>Solanum tuberosum</i>						
	<400> 6						
60	Met Ala Ser Phe Ile Asn Asn Pro Leu Thr Ser Leu Cys Asn Thr Lys						
	1		5		10		15
65	Ser Glu Ala Asn Asn Leu Phe Lys Ile Ser Pro Leu Arg Ala Gln Ser						
		20		25		30	
	Leu Gly Phe Ser Lys Leu Asn Gly Ser Arg Lys Val Ala Phe Pro Ser						

ES 2 376 734 A1

Ser Ile Leu Phe Gln Ser Ile Arg Glu Glu Cys Glu Lys Met Lys Pro
370 375 380

5 Glu Leu
385

<210> 7

10 <211> 55

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Cebador de PCR para el inhibidor de proteasas de patata

20 <220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(29)

<223> secuencia attB1

25

<220>

<221> misc_feature

<222> (32)..(55)

30 <223> secuencia complementaria al gen del inhibidor de proteasas de patata

<400> 7

35 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggcct aatggagtca aagtgtgctc acatc 55

<200> 8

<211> 54

<212> DNA

40 <213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Cebador de PCR para el inhibidor de proteasas de patata

<220>

<221> misc_feature

50 <222> (1)..(29)

<223> secuencia attB2

<220>

55 <221> misc_feature

<222> (31)..(54)

<223> secuencia complementaria al gen del inhibidor de proteasas de patata

60 <400> 8

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggta ttaaccaacc acaggaatct gtac 54

<200> 9

65 <211> 57

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

ES 2 376 734 A1

<220>

<223> Cebador de PCR para la nitrito reductasa de patata

5 <220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(29)

<223> secuencia attB1

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (32)..(57)

15

<223> secuencia complementaria al gen de la nitrito reductasa de patata

<400> 9

20

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggcctt attaatcttc tgtttcttct ctttctc

57

<210> 10

<211> 57

25

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

30

<223> Cebador de PCR para nitrito reductasa de patata

<220>

<221> misc_feature

35

<222> (1)..(29)

<223> secuencia attB2

<220>

40

<221> misc_feature

<222> (31)..(57)

<223> secuencia complementaria al gen de la nitrito reductasa de patata

45

<400> 10

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggta atggcatctt tttctatcaa atttttg

57

<210> 11

50

<211> 55

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Cebador de PCR para la cisteína sintasa de patata

<220>

60

<221> misc_feature

<222> (1)..(29)

<223> secuencia attB1

65

<220>

<221> misc_feature

ES 2 376 734 A1

<222> (32)..(55)
<223> secuencia complementaria al gen de la cisteína sintasa de patata

5 <400> 11
ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggcgtt atcacaattc tggcttcatt ttctc 55

<210> 12
10 <211> 53
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador de PCR para nitrito reductasa de patata

<220>
20 <221> misc_feature
<222> (1)..(29)
<223> secuencia attB2

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(53)

30 <223> secuencia complementaria al gen de la cisteína sintasa de patata

<400> 12
35 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggta atggcatctt tcatcaacaa tcc 53

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 201001068

②² Fecha de presentación de la solicitud: 13.08.2010

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: **A01N31/02** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	JP 2004256508 A (TAKAHASHI TATESHI) 16.09.2004, (resumen) (en línea) (recuperado el 04.11.2011). Recuperado de: EPOQUENET.	1-4
A	WALLACE, J.M., et al. Adverse synergistic effects between acetic, propionic, butyric and valeric acids on the growth of wheat seedling roots. 1980. <i>Soil Biol. Biochem.</i> , páginas 445 y 446.	1-6
A	CN 101167452 A (YONG HUANG) 30.04.2008, (resumen) (en línea) (recuperado el 04.11.2011). Recuperado de: EPOQUENET.	1-6

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
05.03.2012

Examinador
I. Rueda Molíns

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: 05.03.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 5, 6	SI
	Reivindicaciones 1-4	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 5, 6	SI
	Reivindicaciones 1-4	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	JP 2004256508 A (TAKAHASHI TATESHI) (resumen) (en línea) (recuperado el 04.11.2011). Recuperado de: EPOQUENET.	2004
D02	WALLACE, J.M., ET AL. Adverse synergistic effects between acetic, propionic, butyric and valeric acids on the growth of wheat seedling roots. <i>Soil Biol. Biochem.</i> , páginas 445 y 446.	1980
D03	CN101167452 A (YONG HUANG) (resumen) (en línea) (recuperado el 04.11.2011). Recuperado de: EPOQUENET.	2008

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 una atmósfera en la que está presente al menos un compuesto volátil que se selecciona entre ácido propiónico, ácido acético, acetaldehído, ácido fórmico y ácido butírico.

El documento D01 muestra una composición para aumentar el crecimiento de una planta que contiene ácido acético, ácido fórmico y ácido propiónico.

El documento D02 divulga los efectos que producen el ácido propiónico, ácido acético y ácido butírico en el crecimiento de las raíces de trigo.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Artículos 6 y 8 LP11/86)

En las reivindicaciones 1-4 se reivindica un método para incrementar el crecimiento de una planta y/o alterar su patrón de desarrollo caracterizado por que la planta se cultiva en una atmósfera en la que está presente al menos un compuesto volátil que se selecciona entre ácido propiónico, ácido acético, acetaldehído, ácido fórmico y ácido butírico. Dicho compuesto volátil está presente en la citada atmósfera por evaporación de una disolución que lo contiene.

El documento D01 divulga una composición para incrementar el crecimiento de una especie vegetal que comprende diferentes elementos entre los que se encuentran el ácido acético, el ácido fórmico y el ácido propiónico. Se indica en este documento como los componentes de dicha composición se pueden disolver en agua. Por tanto, teniendo en cuenta la información divulgada en el documento D01 las reivindicaciones 1-4 no presentan novedad ni actividad inventiva según lo establecido en los Artículos 6 y 8 LP11/1986.