

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 097**

51 Int. Cl.:

A01N 63/02 (2006.01)
A01N 63/04 (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)
A01N 35/02 (2006.01)
A01N 37/02 (2006.01)
A01N 25/00 (2006.01)
A01P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2011 PCT/ES2011/000125**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2011 WO11135121**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2011 E 11774436 (7)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2561760**

54 Título: **Método para aumentar la resistencia al estrés hídrico en plantas**

30 Prioridad:

07.04.2011 ES 201100405
13.08.2010 ES 201001068
19.04.2010 ES 201000499

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.01.2018

73 Titular/es:

IDEN BIOTECHNOLOGY S.L. (100.0%)
Edificio AIN - Carretera Pamplona, 1
31191 Cordovilla, Navarra, ES

72 Inventor/es:

BAROJA FERNÁNDEZ, MIREN EDURNE;
LI, JUN;
POZUETA ROMERO, JAVIER;
EZQUER GARIN, IGNACIO;
BAHAJI, ABDELLATIF;
MUÑOZ PEREZ, FRANCISCO JOSÉ y
OVECKA, MIROSLAV

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 651 097 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para aumentar la resistencia al estrés hídrico en plantas

5 **Sector de la técnica**

La invención se refiere a un método para aumentar la resistencia de las plantas a condiciones estresantes tales como el estrés hídrico.

10 **Estado de la técnica**

Las plantas perciben estímulos bióticos reconociendo multitud de diferentes compuestos señalizadores producidos por 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 diferentes estructuras incluyendo hidratos de carbono, proteínas, glicoproteínas, péptidos, lípidos y esteroides (Hahlbrock et al. 2003: Proc Nat. Acad. Sci USA 100 (supl 2), 14569-14576).

Los microorganismos también sintetizan y emiten muchos compuestos volátiles con pesos moleculares menores que 300 Da, polaridad baja, y una elevada presión de vapor (Schölller et al. 2002: J. Agric. Food Chem. 50, 2615-2621; Schultz and Dickschat 2007: Nat. Prod. Rep. 24, 814-842; Splivallo et al. 2007a: Phytochemistry 68, 2584- 2598). El contacto con microorganismos o agentes desencadenantes de reacciones de defensa de plantas no solo 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 estado de sumidero (en el que se importan dichos compuestos asimilables de tejidos en los que están almacenados) (como revisión, véase Berger et al. 2007: J. Exp. Bot. 58, 4019-4026). Una indicación del estado de sumidero en hojas infectadas es la regulación positiva 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 positivamente 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: Plant Signaling & Behavior 3, 885-887). El contacto con patógenos también puede dar como resultado la regulación negativa de genes implicados en el metabolismo del almidón (Cartieaux et al. 2008: Mol. Plant-Microbe Interact. 21, 244-259; Fabro et al. 2008: 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.

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: FEBS Lett 581, 2947-2953; Montero et al. 2009: 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 ARN 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: 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: 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: 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 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101,4320-4324).

La degradación del almidón en plantas es principalmente hidrolítica, jugando papeles importantes en la degradación del almidón de endospermos y cereales de hojas las α -amilasas y las β -amilasas, respectivamente (Scheidig et al. 2002: Plant J. 30, 581-591; Fulton et al. 2008: Plant Cell 20, 1040- 1058) al contrario que en bacterias, donde la degradación del glucógeno tiene lugar a través de la ruta fosforolítica. 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 (Figura 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: Trends Plant Sci. 10, 154-156; Streb et al. 2009: 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: 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: Plant Cell Physiol. 46, 1366-1376; Baroja-Fernández et al., 2009: 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 Figura 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: 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. Solo 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 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 denominan rizobacterias a ciertas bacterias simbiotes 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 un aumento 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 (acetoina) 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 aumentar 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. solo mencionan que el efecto de aumento 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: Plant Phyllo 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 diferentes 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, un 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 aumentar 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, se refiere 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 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.

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. (2008: 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 aumento de la fotosíntesis, proceso este último que normalmente se ve inhibido cuando se aumentan los niveles de azúcares solubles acumulados en las plantas. Las plantas que entran en contacto con los volátiles emitidos por *B. subtilis* GB03 muestran aumentos de 50-62 % del contenido de azúcares solubles sobre las plantas control que, aproximadamente, acumulan 2 micromoles de hexosa por gramo de peso fresco (consúltese la Figura 2, Zhang et al. 2008: The Plant Journal 56, 264-273). El aumento del contenido de azúcares solubles generalmente está asociado con una disminución de los niveles intracelulares de almidón (Caspar et al. (1985) *Plant Physiol.* 79: 11-17; Jones et al. (1986) *Plant Physiol.* 81: 367-371; Lin et al. (1988) *Plant Physiol.* 86: 1131-1135; Neuhaus and Stitt (1990) *Planta* 182: 445- 454; Szydlowski et al. (2009) *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. solo 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: Proc. Nati. 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 aumentar 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. Otra de las bacterias incluidas en el mismo ensayo, *Escherichia coli* DH5a, se utilizó en el mismo ensayo como control, por estar reconocida como una cepa que no aumenta 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: New Phytologist 175, 417-424, Tarkka and Piechulla 2007: New Phytologist 175, 381-383).

También se ha mostrado que las rizobacterias que promueven el crecimiento vegetal son capaces de inducir

tolerancia a sal y a la sequía, cuando se asocian a las raíces. Jungwook et al. (Jungwook, Y. et al., 2009, Trends in Plant Science 14(1), 1-4) han descrito que las bacterias de la rizosfera ayudan a las plantas a tolerar el estrés abiótico, induciendo algunos cambios en la planta que dan lugar a una tolerancia sistémica a estreses abióticos. Con respecto a la tolerancia a la sequía, se menciona algún efecto positivo que resulta de la inoculación de raíces de algunas rizobacterias, incluyendo posibles efectos sinérgicos de combinaciones de algunas cepas particulares. Además se describe la actividad de algunas enzimas bacterianas en los volátiles producidos por las propias plantas, tales como el etileno. Pero no se mencionan compuestos orgánicos volátiles emitidos por los propios microorganismos en conexión con la resistencia inducida a la sequía.

Cho et al. (Cho, Song Ml. et al., 2008, Molecular Plant-Microbe Interactions, Vol. 21, n.º 8, páginas 1067-1075) han informado los resultados de ensayos llevados a cabo con una rizobacteria particular promotora del crecimiento vegetal, *Pseudomonas chloraphis* 06. Dichos ensayos se llevaron a cabo de nuevo con las bacterias que colonizan la raíz y, por lo tanto, que están en contacto con la planta. La tolerancia sistémica a sequía inducida en la planta se atribuye a un compuesto volátil particular, 2R,3R-butanodiol, que se sabía previamente que se producía por las bacterias mencionadas, debido a que dicho compuesto se ha mostrado inducir ciertos cambios en la planta en ensayos adicionales donde se aplica directamente a cortezas epidérmicas. Pero no se demostró si el compuesto puede tener o no los mismos efectos cuando no se aplica directamente, si tiene que llegar a las hojas por la vía sistémica. No se menciona o se analiza, si el compuesto podría evaporarse desde el suelo a la atmósfera, o posibles condiciones de cultivo de *Pseudomonas chloraphis* 06 donde se espera que se produzca 2R,3R-butanodiol.

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, y aumentar su crecimiento, resistencia biológica y mecánica mediante el uso de volátiles microbianos y, preferentemente, para aumentar la síntesis de almidón en las plantas, por ser éste en la actualidad un producto de gran interés en algunas industrias. Sería especialmente interesante que el procedimiento fuera aplicable a todo tipo de plantas y/o, especialmente, a plantas de interés agrícola en general, y que, además, fuera sencillo de aplicar. La presente invención proporciona una solución al problema de aumentar la resistencia al estrés hídrico en una planta.

Objeto de la invención

En la presente memoria descriptiva se describe que, al crecer plantas en presencia de cualquier tipo de microorganismo (bacterias Gram-positivas o Gram-negativas, levaduras u hongos), sin que exista ningún contacto entre la planta y el microorganismo, los volátiles emitidos por el microorganismo resultan en un cambio 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 términos de 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, pimiento...) 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.

El aumento del crecimiento puede ser evidente en un aumento de la longitud de la planta, en un aumento del tamaño de las hojas, en aumento del grosor del tallo y/o en un aumento del tamaño de las raíces. Merece destacarse que, como puede observarse más adelante en los Ejemplos de la presente solicitud, el efecto de la presencia de volátiles fúngicos sobre el desarrollo radicular de plantas de pimiento es espectacular.

La alteración del patrón de crecimiento se puede manifestar en aumento del número de hojas, aumento del número de ramas, aumento del número de brotes florales, flores y semillas de plantas angiospermas, inducción de la floración o combinaciones de los anteriores.

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 estado 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 ocurre no solo 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 obtenidos previamente 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, en algunos ensayos contenidos en la presente memoria descriptiva 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 Komberg), 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. De hecho, en la presente solicitud se divulgan 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, 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.

Cuando las plantas se crecen en presencia de volátiles microbianos no solo se observan cambios relativos al crecimiento, el patrón de desarrollo o la acumulación de almidón, sino que, tal como se demuestra más adelante en los Ejemplos de la presente solicitud, el aumento del crecimiento y la alteración del patrón de desarrollo observados cuando las plantas se crecen en presencia de volátiles microbianos van acompañados de un aumento en la cantidad de clorofila.

Además, los datos aportados en la presente solicitud de patente demuestran que el crecimiento de las plantas en presencia de volátiles microbianos tiene otro efecto: el aumento de la resistencia de las plantas al estrés hídrico. Se observa que, si se hace crecer plantas de *Arabidopsis thaliana* en un medio de cultivo en el que la cantidad de agua es inferior a la que sería adecuada para un óptimo crecimiento, el crecimiento de las plantas que crecen en presencia de volátiles microbianos (concretamente, volátiles fúngicos producidos por *Alternaria alternata*) se ven afectadas en su crecimiento en menor medida que las plantas control, que crecen en ausencia de tales volátiles microbianos.

El estrés hídrico es la situación que se da en las plantas cuando hay sequía, es decir, cuando el agua que hay en la tierra es insuficiente y determina que la planta tenga dificultades para absorber agua del suelo. La capacidad de la planta para absorber agua viene determinada por el llamado potencial hídrico, Ψ_w que viene determinado por el potencial osmótico, el potencial de pared, el potencial de matriz y la fuerza de la gravedad. El potencial hídrico define la dificultad de la planta para obtener agua. Un mecanismo de resistencia al estrés por déficit hídrico es la disminución de la presión osmótica y mantener constante la presión de pared, es decir, la turgencia de las células, con lo cual disminuye el potencial hídrico que, si es menor que el del suelo con sequía, permitirá a la planta captar agua.

Es conocido que uno de los principales efectos del estrés hídrico es la disminución del crecimiento celular. El crecimiento en el tejido vegetal se origina por la división y alargamiento de los componentes celulares, dando como resultado las formas adaptativas de las plantas. En este contexto, la pérdida de presión de turgencia como una consecuencia del desbalance del contenido de agua, puede resultar en crecimiento reducido o ausencia total de crecimiento bajo condiciones secas en el suelo. Además, las plantas bajo estrés hídrico tienen una menor capacidad de transpiración, porque cierran las estomas, impidiendo pérdidas de agua a través de los mismos, pero dificultando también el paso del CO_2 , lo cual es una de las razones de que disminuya la fotosíntesis.

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, la acumulación de almidón, así como la alteración estructural de este polímero en las plantas que crecen bajo su efecto, y que, incluso, sean capaces de provocar un aumento de la acumulación de clorofila y un aumento de la resistencia de las plantas al estrés hídrico. 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, así como también un efecto positivo en lo que se refiere a la resistencia al estrés hídrico y a la acumulación de clorofila

5 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 solo sobre el crecimiento, sino también sobre la acumulación de almidón en las plantas que entran en contacto con dichos volátiles.

15 En cuanto al aumento de la cantidad de almidón acumulada, se observa en distintos órganos de la planta: hojas (no solo 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...).

20 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 aumento 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/amilopectina 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. Además, los ensayos realizados con la proteína verde fluorescente (GFP) unida a la sintasa que se une al gránulo de almidón (GBSS) confirman que las plantas que crecen en presencia de volátiles microbianos no solo acumulan más cantidad de almidón, sino que este aumento se ve acompañado por un aumento en la cantidad de proteínas unidas a los gránulos de almidón en dichas plantas. Así, el cultivo de plantas en atmósferas que contienen volátiles emitidos por microorganismos permite obtener plantas que no solo 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.

45 Los autores de la presente invención han dado un paso más y han intentado dilucidar si, entre todos los volátiles emitidos por los distintos microorganismos, existen volátiles responsables, por ejemplo, del efecto de aumento del crecimiento de las plantas, y otros volátiles responsables de otros efectos, tales como el efecto de aumento del almidón acumulado por las mismas, o si ambos efectos eran debidos a los mismos volátiles. En la presente invención se presentan ensayos que demuestran que no todos los volátiles producidos por los microorganismos tienen capacidad de influir sobre el aumento de la biomasa y la acumulación de almidón observada en las plantas que crecen en atmósferas en las que estén presentes dichos volátiles. Dichos ensayos demuestran, 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 son compuestos producidos, por ejemplo, por varias especies de bacterias), 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 aumentar la acumulación de almidón y, también, el crecimiento de la planta. Además, se aportan datos que indican que su efecto es dependiente de dosis.

60 La identificación de compuestos volátiles concretos que tienen efectos positivos sobre el crecimiento y la acumulación de almidón tiene varios puntos de interés. Por una parte, corrobora la utilidad de cultivos de ciertos microorganismos concretos, conocidos productores de alguno o varios de los volátiles citados, para provocar un aumento del crecimiento y/o la acumulación de almidón cuando las plantas se crecen en presencia de un cultivo de dichos microorganismos, sin necesidad de que exista contacto entre las plantas y dichos cultivos. Estos microorganismos pueden incluir:

- 65
- Microorganismos productores de ácido fórmico y ácido acético:

- *Escherichia coli*. Estas dos sustancias son dos de los productos que *E. coli* produce en la fermentación ácido mixta (Clark DP 1989: FEMS Microbiol Rev. 5(3), 223-234 (revisión); Maupin et al. 1990: J Bacteriol. 172(9): 4798-4806).

5 ■ Microorganismos productores de acetaldehído:

- *Escherichia coli*. Normalmente, *E. coli* no produce acetaldehído, aunque se pueden encontrar trabajos donde se describen estirpes que lo producen (Salaspuro et al. 1999: Scand J Gastroenterol. 34(19), 967-973).

10 ■ Bacterias que acumulan ácido butírico:

- Algunas especies de los géneros *Clostridium* y *Butyrivibrio*, así como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella loescheii* y *Fusobacterium nucleatum* (Kopeck et al.2003: Int J Syst Evol Microbiol 53, 201-209; Zhu et al. 2005: Biotechnol Bioeng 90(2), 154-166; David White: "The physiology and biochemistry of prokaryotes", 2a edición, Oxford University Press).

15 ■ Bacterias que acumulan ácido propiónico: Algunas especies de los géneros *Clostridium* y *Propionibacterium*, así como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella loeschei* y *Fusobacterium nucleatum* (Leaver et al. 1955: J Bacteriol 70(5):521-30; Jin et al., 1998: Biotechnol Prog. 14(3):457-465; David White: "The physiology and biochemistry of prokaryotes", 2a edición, Oxford University Press).

20 ■ Bacterias que producen múltiples compuestos volátiles:

25 Los actinomicetos producen más de 120 compuestos volátiles, incluyendo algunos del grupo de los ácidos fórmico, acético, propiónico y butírico y acetaldehído, y algunos alcoholes, ásteres, cetonas, isoprenoides, etc. (Schöller et al., 2002: J. Agric. Food Chem. 50, 2615-2621).

30 - *Myxococcus xanthus* también es un buen productor de volátiles (Dicjshat et al., 2004: Chem. Biol. Chem. 5, 778-787).

Un resumen de todos los compuestos (346) volátiles conocidos emitidos por bacterias puede encontrarse en Schulz et al., 2007: Nat. Prod. Rep. 24, 814-842).

35 Además, el conocimiento de los compuestos volátiles que dan lugar a un aumento del crecimiento de la planta y/o un aumento de la acumulación de almidón permite obtener dichos efectos sin ser necesaria 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 se conozca que tienen el efecto deseado y provocar su presencia en la atmósfera de cultivo por diversos medios, desde la evaporación desde una disolución presente en el lugar de cultivo de la planta o insuflando al lugar de cultivo, desde el exterior del mismo, una atmósfera que contiene ya el compuesto o compuestos volátiles 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.

45 Con respecto a los cambios metabólicos que dan lugar a los efectos observados, particularmente al aumento en la acumulación de almidón, los análisis de transcriptomas de, entre otros, hojas de plantas de patata expuestas a volátiles de origen fúngico (específicamente, 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:

- 50 - la regulación positiva de: sacarosa sintasa, inhibidores de invertasas, sintasa de almidón de clase IV, enzima ramificadora 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;
- 55 - la regulación negativa de: invertasa ácida, tioredoxinas 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...

60 La Figura 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 ensayos contenidos en 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.

65 Como se analiza en los ensayos que aparecen más adelante en la presente memoria descriptiva, la regulación positiva 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

gliceraldehido-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 aumento en el contenido del almidón, sin necesidad de que se produzca un aumento en la actividad sacarosa sintasa.

5 Las pruebas mostradas en los ensayos de la presente solicitud aportan también datos que apoyan una implicación de la activación alostérica de la ADPglucosa pirofosforilasa en el aumento de la acumulación de almidón provocada por la presencia de volátiles microbianos en la atmósfera de cultivo. Así, se aportan datos que demuestran que la relación 3-PGA/Pi (relación de ácido 3-fosfoglicérico respecto al ortofosfato) se aumenta en el caso de plantas
10 cultivadas en presencia de luz y de volátiles fúngicos en la atmósfera de cultivo, pareciendo existir, además, una relación entre el aumento del almidón y el aumento con el tiempo del valor obtenido en esa relación.

Los autores de la presente invención han complementado los conocimientos sobre los mecanismos mediante los cuales se producen los efectos que se observan en las plantas cuando las mismas se crecen en presencia de
15 volátiles microbianos, así como de los factores que lo controlan, delimitando las plantas más adecuadas para llevar a cabo el procedimiento de la invención, así como el tipo de luz más idónea para ello. Así, por una parte, se aportan ejemplos en los que se demuestra que el aumento en la acumulación de almidón que muestran las plantas que crecen en presencia de volátiles microbianos está controlado por la luz, pues los mutantes deficientes en fitocromos activos y criptocromos acumulan menos almidón que las plantas tipo silvestre, por lo que los mutantes deficientes en
20 fitocromos activos y criptocromos pueden considerarse menos eficientes para aplicar el aspecto del método de la invención referido al aumento de la acumulación de almidón en plantas. Las deficiencias en otros genes influyen también en la acumulación de almidón: así, las plantas deficientes en NTRC, así como las plantas deficientes en las almidón sintasas solubles SSIV y/o SSIII, acumulan menos almidón, en presencia de volátiles microbianos, que las plantas de tipo silvestre, lo que demuestra el papel relevante de estos genes en el aumento de acumulación de
25 almidón cuando las plantas crecen en presencia de volátiles microbianos en la atmósfera. Además, se confirma la implicación de la β -amilasa en controlar la acumulación de almidón, pues (a) los mutantes deficientes en BAM4 y en SEX1 acumulan más almidón que las plantas tipo silvestre crecidas igualmente en presencia de volátiles microbianos y (b) las plantas silvestres acumulan maltosa cuando son sometidas a la acción de volátiles microbianos. Por último, se aporta un mayor conocimiento sobre la influencia de la luz, pues se demuestra que la acumulación de almidón bajo luz azul, o del rojo lejano, es menor que bajo luz blanca o roja, lo que indica que, si se desea obtener mayores rendimientos en el procedimiento de la invención de acumulación de almidón, conviene utilizar luz blanca o roja, siendo aconsejable la luz de longitud de onda correspondiente a la región de azul o del rojo lejano si se desea que la acumulación de almidón sea superior a la de las plantas que crecen en ausencia de volátiles microbianos, pero de menor magnitud que la observada bajo la acción de luz blanca.

35 Todos estos hallazgos abren la puerta para plantearse procedimientos para aumentar 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
40 la posibilidad de aumentar 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.). La aplicación a la atmósfera de cultivo de los volátiles producidos por microorganismos previamente cultivados podría hacer aplicándolos mediante técnicas de gran interés agronómico, como pueden ser la fumigación o la pulverización; ello posibilitaría, además, que su administración a la atmósfera de cultivo de la planta se realizara conjuntamente con otros compuestos de interés, como podrían ser fertilizantes o plaguicidas. Otra posible alternativa es suministrar junto con el agua de riego los compuestos volátiles producidos por algún microorganismo, volátiles que se evaporarán desde el agua de riego hasta la atmósfera de cultivo de la planta y producirán en la misma los efectos que se observarían si la planta se cultivara en presencia de un cultivo de un microorganismo que produjera esos mismos volátiles: los ensayos que se muestran más adelante en Ejemplos de la presente solicitud, en los que las plantas se regaron con un medio de cultivo filtrado de *Alternaria alternata*, demuestran la validez de esta segunda alternativa. A estas alternativas se une la posibilidad de suministrar a la atmósfera de cultivo de la planta uno o más volátiles específicos, seleccionados entre los que son producidos por
55 cultivos de microorganismos, para los cuales se conozcan que tienen un efecto positivo sobre el crecimiento y/o la acumulación de almidón de la planta, como pueden ser los ácidos fórmico, acético, propiónico o butírico o el acetaldehído; la administración a la atmósfera de cultivo de dichos compuestos puede hacerse, por ejemplo, insuflándolos en la misma o permitiendo su evaporación desde una disolución que los contenga presente en el lugar de cultivo de las plantas, disolución que puede ser el propio agua de riego. Como en el caso de la aplicación a la atmósfera de cultivo de la mezcla de volátiles producidos por microorganismos previamente cultivados, la introducción de estos compuestos específicos en la atmósfera de cultivo podría hacerse aplicándolos mediante técnicas de gran interés agronómico, como pueden ser la fumigación o la pulverización, lo que de nuevo facilitaría, además, que su administración a la atmósfera de cultivo de la planta se realizara conjuntamente con otros compuestos de interés, como podrían ser fertilizantes o plaguicidas. Además, el hecho de que las hojas acumulen
60 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 aumento 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
 5 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.

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
 10 el punto de vista industrial. En cuestión de 2-3 días, las hojas son capaces de producir enormes cantidades de almidón con tan solo 4 ingredientes, que podrían considerarse "baratos": un poco de agua, CO₂ 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
 15 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.

Por lo tanto, la presente solicitud describe 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
 20 creciendo la misma en presencia de los volátiles emitidos por un microorganismo, microorganismo que puede cultivarse en el mismo espacio que la planta, de tal manera que la planta entre en contacto con ellos debido al hecho de 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.

Por lo tanto, en la presente solicitud se describe un método para aumentar el crecimiento de una planta y/o cambiar su patrón de desarrollo, caracterizado por que la planta se cultiva en presencia de un microorganismo que produce
 25 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
 30 desarrollo, puede manifestarse como un aumento del número de hojas, aumento del número de ramas, o en efectos más estrechamente relacionados con la fertilidad, como el aumento del número de flores y semillas de plantas angiospermas, y/o la inducción de la floración, o en combinaciones de los efectos anteriores.

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
 35 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.

Dado que se han identificado también compuestos volátiles concretos cuya presencia en la atmósfera en la que
 40 crece la planta da lugar también a un aumento del crecimiento de la planta y/o a la alteración de su patrón de desarrollo, siendo también capaces de producir un aumento del almidón acumulado en la planta completa, en la presente solicitud se describe también un método para aumentar 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
 45 compuesto volátil que se selecciona de ácido propiónico, ácido acético, acetaldehído, ácido fórmico y ácido butírico. De entre ellos, se prefiere el ácido fórmico. Es posible que el compuesto volátil esté presente en la atmósfera a través de la evaporación de una disolución que lo contiene que se encuentra en el lugar de cultivo de la planta, disolución que puede ser, por ejemplo, el agua de riego de la planta. Otra posibilidad es que el compuesto volátil se
 50 suministre a la atmósfera de cultivo; las posibilidades para hacerlo incluyen: la posibilidad de insuflar el compuesto volátil a la atmósfera de cultivo (una posibilidad especialmente interesante si la planta se cultiva en un invernadero); la aplicación mediante fumigación o pulverización. Cualquiera que sea el método de aplicación a la atmósfera de cultivo, preferentemente se hará conjuntamente con uno o más compuestos de interés, como podría ser un
 55 fertilizante, un plaguicida, o mezclas de los mismos. En cualquiera de los casos, como sucede con la variante del método que se lleva a cabo con una atmósfera que contiene la mezcla de volátiles producidos por un microorganismo, cultivado o no en el mismo lugar que la planta, sin que haya contacto físico entre ellos, el aumento 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 aumento del número de hojas, aumento del número de ramas y/o del número de flores y semillas de plantas angiospermas, en la inducción de la floración, o en
 60 combinaciones de los anteriores

Debido al efecto observado, específicamente sobre el aumento de la acumulación de almidón, en la presente
 65 solicitud también se describe un método para aumentar 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. Adicionalmente, en particular, el almidón producido tiene preferentemente 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, específicamente, 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 ensayos de la presente solicitud, se ha observado en distintos órganos de la planta (hojas, tallos, raíces y tubérculos), aquellas en las que el aumento de la producción de almidón se produce al menos en un órgano de la planta, preferentemente seleccionado de hoja, tallo, raíz, semillas o, en las plantas que lo presenten, el tubérculo, son posibilidades para realizar el método descrito para aumentar la acumulación de almidón, preferentemente con estructura modificada. Como sucede cuando se busca un aumento del crecimiento y/o la alteración del patrón de desarrollo, cuando el objeto específico es la acumulación de almidón la planta puede 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.

Aprovechando el conocimiento adquirido por los autores sobre las modificaciones en el metabolismo de las plantas mediante los cuales los volátiles microbianos provocan el aumento de la acumulación de almidón, una alternativa al método de aumento de acumulación de almidón consiste en provocar la acumulación directamente mediante el uso de plantas transgénicas, basadas en el mismo principio en las que el transgén o transgenes expresados dan lugar a la sobreexpresión de alguna de las enzimas reguladas positivamente por la exposición a los volátiles o que consiste en un inhibidor de la actividad o de la expresión (mediante ARN de interferencia, por ejemplo) inhibiendo alguna de las enzimas reguladas negativamente. Por lo tanto, en la presente solicitud se describe también un método para aumentar 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 ramificadora del almidón, un inhibidor de la invertasa ácida (tal como por ejemplo, el que presenta el número de acceso en GenBank FN691928), un ARN 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 ARN antisentido dirigido contra la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa plastidial (tal como por ejemplo, el que presenta el número de acceso en GenBank FN691929), un ARN 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 ARN antisentido dirigido contra la nitrito reductasa (tal como por ejemplo, el que presenta el número de acceso en GenBank FN691930). Son alternativas preferidas aquellas 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 ARN antisentido dirigido contra la cisteína sintasa o un ARN 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 (secuencia codificante 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) o en el que el ARN antisentido expresado por el transgén está dirigido contra la cisteína sintasa cuya secuencia codificante está representada por SEQ ID NO:71 (secuencia codificante que debe ir unida operativamente a un promotor de tal forma que su expresión se produzca en antisentido) o contra la nitrito reductasa cuya secuencia codificante está representada por SEQ ID NO:69 (secuencia codificante que, al igual que en el caso anterior, debe ir unida operativamente a un promotor de tal forma que su expresión se produzca en antisentido). Se prefiere especialmente que la planta exprese más de un transgén de cualquiera de los citados anteriormente y/o aquellas 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 ARNm 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).

En la presente solicitud se proporcionan también plásmidos adecuados para generar algunas de las plantas transgénicas que se mencionan en el párrafo anterior. Por lo tanto, una posible realización del aspecto de la invención referido a un método para aumentar la producción de almidón en una planta mediante el uso de plantas transgénicas, donde la realización se caracteriza 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:67 (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:69 (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: 71 (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 biológica de las plantas o mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Se prefiere particularmente que el plásmido contenga secuencias Tnos. Otra posibilidad

para realizar el método de aumento de la acumulación de almidón mediante el uso de plantas transgénicas, la secuencia codificante representada por SEQ ID NO:67, la secuencia antisentido a la representada por SEQ ID NO:69 o la secuencia antisentido a la representada por SEQ ID NO:71 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 preferentemente, 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 aumento 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 16 de la presente invención, es decir, un plásmido que comprende la secuencia representada por SEQ ID NO:67, la secuencia antisentido a la representada por SEQ ID NO:69 o la secuencia antisentido a la representada por SEQ ID NO:71, 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.

Otra posible alternativa para conseguir un aumento del contenido de almidón en una planta es recurrir a la presencia en la atmósfera en la que crece la planta de alguno de los volátiles específicos, que pueden ser producidos por microorganismos, para los cuales se conoce que tienen ese efecto. Por lo tanto, en la presente solicitud se describe también un método para aumentar 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 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; dentro de esa posible realización, una posibilidad es que la disolución sea, por ejemplo, el agua de riego de la planta. En otra posible realización, el compuesto volátil se suministra a la atmósfera de cultivo; entre las posibilidades para hacerlo así merecen mencionarse: la posibilidad de insuflar el compuesto volátil a la atmósfera de cultivo (posibilidad especialmente interesante si la planta se cultiva en un invernadero); la aplicación mediante fumigación o pulverización. Cualquiera que sea el método de aplicación a la atmósfera de cultivo, preferentemente se hará conjuntamente con uno o más compuestos de interés, como podría ser un fertilizante, un plaguicida, o mezclas de los mismos.

Además, el hecho de que el aumento 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.

En la presente solicitud también se describe un método para aumentar la cantidad de proteínas asociadas al almidón en una planta, 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. Este aspecto tiene un especial interés en que las plantas son plantas genéticamente modificadas que expresan proteínas que se unen al gránulo de almidón (tal como la GBSS) fusionadas con otras proteínas de interés, especialmente si es la proteína que se une al gránulo de almidón la que se encuentra en la parte de la proteína de interés que contiene el grupo amino pues, como se describe en la solicitud de patente española P201001115, la totalidad de la proteína de fusión quedará también ligada al gránulo de almidón. Esto, por una parte, facilita el aislamiento de la proteína de fusión. Si, además, la parte que corresponde a una proteína que se asocia al gránulo de almidón (tal como, por ejemplo, la GBSS) está unida a la parte correspondiente a la proteína de interés por una secuencia de aminoácidos que contiene la secuencia de reconocimiento de una proteasa, el tratamiento de los gránulos de almidón con la proteasa permitiría liberar la proteína de interés. Es por ello que una realización preferida de este aspecto de la invención es aquella en la que las plantas son plantas genéticamente modificadas, que expresan una proteína de fusión en cuyo extremo amino se encuentra una proteína que se une al gránulo de almidón (que puede ser la GBSS) y, dentro de dicha realización, aquella realización específica en la que la proteína que se une al gránulo de almidón y la otra proteína están unidas por una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de reconocimiento de una proteasa, que puede ser, por ejemplo, la tripsina (que corta detrás de los aminoácidos lisina o arginina).

En la presente solicitud se describe también un método para aumentar la cantidad de clorofila acumulada por una planta, 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 una posible realización de este aspecto de la invención, el método para aumentar la cantidad de clorofila acumulada por una planta puede caracterizarse, por ejemplo por que la planta es una planta de maíz o una planta de pimiento, 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 hongo, tal como se describe en ensayos descritos en los Ejemplos de la presente solicitud.

Finalmente, un aspecto adicional de la presente invención es un método para aumentar en una planta la resistencia al estrés hídrico 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, o en presencia de los volátiles emitidos por el microorganismo. Esto es así, como se ha mencionado más arriba, puesto que, en condiciones de

5 estrés hídrico, las plantas que crecen en presencia de volátiles microbianos ven menos reducido su crecimiento respecto a las plantas control que en los casos en los que los volátiles microbianos no están presentes, por lo cual el procedimiento de la invención de cultivo de plantas en presencia de volátiles microbianos puede también describirse como un procedimiento para aumentar en las plantas la resistencia al estrés hídrico.

10 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

15 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, preferentemente en un medio sólido. El recipiente común de cultivo de la planta y el microorganismo puede ser un invernadero en el

20 que, preferentemente, 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

25 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. La mezcla de volátiles puede llegar a la atmósfera por evaporación de una disolución que la contiene y que se encuentra en el lugar de cultivo de la planta, realización que permite que la mezcla de volátiles utilizada sea la mezcla de los volátiles presentes en el medio de cultivo del microorganismo, tras filtrar el mismo y mezclarlo con la disolución desde la cual se van a evaporar, tal como se hace en uno de los

30 Ejemplos que se muestra más adelante, posibilidad que puede llevarse a cabo preferentemente cuando el medio de cultivo del microorganismo ha sido un medio líquido; en cuanto a la disolución desde la que se evaporan los volátiles, una posibilidad es que la disolución sea, por ejemplo, el agua de riego de la planta. En otra posible realización, la mezcla de compuestos volátiles se suministra a la atmósfera de cultivo; entre las posibilidades para hacerlo así merecen mencionarse: la posibilidad de insuflar la mezcla de compuestos volátiles a la atmósfera de cultivo (posibilidad especialmente interesante si la planta se cultiva en un invernadero); la aplicación mediante fumigación o pulverización. Cualquiera que sea el método de aplicación a la atmósfera de cultivo, se prefiere que los

40 volátiles se administren conjuntamente con otro compuesto de interés o una mezcla de varios compuestos de interés, como podrían ser un fertilizante, un plaguicida, o mezclas de los mismos.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "microorganismo" incluye bacterias, levaduras, algas y protozoos, todos ellos generalmente unicelulares, así como hongos microscópicos pluricelulares como los mohos,

45 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*

50 (por ejemplo *Penicillium chartesii*, *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 o GV2260) o *Pseudomonas* (especialmente, *Pseudomonas syringae* y, muy particularmente, *Pseudomonas syringae* 1448A9, 49a/90 o PK2).

Tal como se ha descrito 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

65 mínimos suplementados con una fuente de carbono orgánico, produciendo también un aumento en la acumulación

de almidón.

Adicionalmente, la inducción de la acumulación de almidón, no había sido descrita previamente para mezclas de volátiles emitidas por microorganismos y, como se demuestra más adelante en los ensayos 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 el método de la invención (método para aumentar la resistencia al estrés hídrico) y los distintos métodos descritos en la solicitud que no se refieren a la utilización específica de plantas transgénicas (métodos para el aumento el crecimiento de la planta, método para aumentar la acumulación de almidón, método para aumentar la acumulación de clorofila, método para aumentar la cantidad de proteínas asociadas al almidón en una planta), 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. Así se ha hecho, por ejemplo, en los ensayos presentados en los ejemplos de referencia de la presente solicitud en los que se ha utilizado el hongo *Alternaria alternata* como productor de los volátiles fúngicos que dan lugar a los efectos deseados de aumento del crecimiento, modificación del patrón de crecimiento e aumento de la acumulación de almidón: para el cultivo de dicho hongo, se ha recurrido al medio MS sólido suplementado con sacarosa 90 mM.

En el método de la invención y los otros métodos descritos en la solicitud, como ya se ha mencionado, la planta puede ser una angiosperma, una monocotiledónea o una dicotiledónea. Los ejemplos concretos de las mismas pueden ser los de las plantas utilizados en los ensayos de la presente solicitud, tales como maíz, pimiento, *Arabidopsis thaliana*, patata, tabaco u otras plantas, preferentemente plantas de interés agrícola o industrial.

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 describir en la solicitud 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.

Descripción de las figuras

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

- El panel (A) ilustra el "modelo clásico", según el cual el proceso de biosíntesis del almidón tiene lugar exclusivamente en el cloroplasto, separadamente 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).

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': fosfoglucoisomerasa; 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).

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

- 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, se introdujeron placas Petri que contenían plantas completamente desarrolladas 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.

Figura 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 (FV) en el número de flores, vainas, longitud del brote y número de ramas en plantas expuestas durante 6 días a los FV. *A. alternata* fue cultivada en medio MS sólido suplementado con 90 mM sacarosa.

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

- 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.

- 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 FV florecen antes.

- Panel D: Fotografías que 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.

Figura 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.

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.

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

- 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.

- 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 aumento de almidón solo 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 (Ø) 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.

Figura 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.

Figura 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 FV, 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 FV, 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 FV.

Barra = 5 µm en E, F, G; Barra = 100 µm en C y D.

Figura 9: Ubicuidad del efecto de los volátiles microbianos entre las plantas.

Son 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.

Figura 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 FV emitidos por *A. alternata* cultivada en medio MS sólido suplementado con 90 mM sacarosa.

Figura 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.

Figura 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*.

Figura 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 FV. Las plantas se cultivaron durante 3 días en presencia de FV 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.

Figura 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 matriz de oligos 60-méros POCI 44K (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/poci>). Los transcritos regulados significativamente de forma positiva y negativa (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 positivamente aparecen en barras con relleno más claro y los genes regulados negativamente aparecen en barras con relleno más oscuro. Los genes de la categoría "ningún efecto encontrado" no se incluyeron en el gráfico

Figura 15: Análisis de AGP en transferencias tipo Western de hojas de plantas de patata, en condiciones no reductoras (sin ditiotreitól 10 mM: -DTT) y reductoras (con ditiotreitól 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

Figura 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 plantas 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.

Figura 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.

Figura 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 FV emitidos por *A. alternata* crecido en medio MS sólido suplementado con 90 mM sacarosa.

Figura 19: Gráfico donde se representa el contenido de almidón (expresado como milimoles 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.

Figura 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 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 FV (barras negras y 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 FV menos el perfil en ausencia de FV.

Figura 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 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, aumento; líneas grises continuas, disminución; líneas negras, sin diferencias significativas).

Figura 22: 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*.

- 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)

- 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 periodo de luz; triángulos con relleno oscuro: cultivo con volátiles, en ausencia de luz durante las 24 horas de cultivo.

Figura 23: Cinética de los niveles de 3-fosfoglicerato (3-PGA) (panel A), ortofosfato (Pi) (panel B) y de la relación 3-PGA/Pi en hojas de plantas tipo silvestre de *Arabidopsis thaliana* sometidas a horas de iluminación bajo luz blanca, y 8 horas de oscuridad, para plantas crecidas en atmósfera con presencia (curvas con circunferencias sin relleno) o en ausencia (curvas con circunferencias con relleno) de volátiles fúngicos emitidos por *A. alternata* crecido en medio MS sólido suplementado con 90 mM sacarosa.

Figura 24: Cinética de la acumulación de almidón y de la actividad de la enzima sacarosa sintasa (SuSy) en plantas de patata.

- 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*.

Figura 25: 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*.

Figura 26: Cuantificación del almidón obtenido de plantas de *Arabidopsis thaliana* incubadas en presencia de distintos compuestos volátiles:

- 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), NA A (ácido 1-naftalenoacético), P-mercaptoetanol, ácido salicílico, ácido jasmónico, cisteína, acetoina, etileno, etanol, metanol, P-hidroxibutirato, butanodiol, ácido propiónico, ácido acético, acetaldehído, ácido fórmico o ácido butírico), por evaporación de una disolución que los contiene.

- 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.

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

Figura 27: 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.

Figura 28: 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)

Figura 29: 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 una despigmentación de las hojas e inhibe el crecimiento de las plantas.

Figura 30: fotografías de plantas de maíz crecidas junto con un cultivo de *Alternaria alternata*, sin que exista contacto entre la planta y el hongo (planta de la derecha en todas las fotografías) y plantas de maíz crecidas en condiciones control, en ausencia de volátiles fúngicos. Los números junto a cada fotografía indican los días transcurridos desde el inicio del cultivo.

Figura 31: efecto de la presencia (+FV) o ausencia (-FV) de los volátiles fúngicos sobre la altura (panel A), el número de hojas (panel B), la cantidad de clorofila acumulada respecto al peso fresco (miligramos por gramo de

peso fresco) (panel C) y el grosor del tallo (panel D) en plantas de maíz cultivadas trascurrido el tiempo de cultivo que se indica, en días, en el eje de abscisas, cuando las plantas se cultivan en presencia de un cultivo del hongo *Alternaria alternata* (barras con relleno gris) o en ausencia del mismo (barras blancas, sin relleno).

Figura 32: fotografías de plantas de pimienta crecidas junto con un cultivo de *Alternaria alternata*, sin que exista contacto físico con dicho cultivo (planta de la derecha en todas las fotografías) y plantas de pimienta crecidas en condiciones control, en ausencia de volátiles fúngicos. Los números junto a cada fotografía indican los días transcurridos desde el inicio del cultivo.

Figura 33: efecto de la presencia (+FV) o ausencia (-FV) de los volátiles fúngicos sobre la altura (panel A), la cantidad de clorofila acumulada respecto al peso fresco (miligramos por gramo de peso fresco) (panel B), el grosor del tallo (panel C), el número de hojas (panel D) y el número de brotes florales (panel E) presentes en plantas de pimienta cultivadas trascurrido el tiempo de cultivo que se indica, en días, en el eje de abscisas, cuando las plantas se cultivan en presencia de un cultivo del hongo *Alternaria alternata* (barras con relleno gris) o en ausencia del mismo (barras blancas, sin relleno).

Figura 34: fotografías de raíces de plantas de pimienta crecidas junto con un cultivo de *Alternaria alternata*, sin que exista contacto físico con dicho cultivo (par de raíces situado más a la izquierda, marcado como "+FV") y de plantas de pimienta crecidas en condiciones control, en ausencia de volátiles fúngicos emitidos por *Alternaria alternata* (par de raíces situado más a la derecha, marcado como "-FV"), transcurridos 40 días de cultivo.

Figura 35: fotografías que demuestran el aumento de resistencia al estrés hídrico de las plantas que crecen en una atmósfera en la que están presentes volátiles microbianos, con respecto a las que crecen en ausencia de dichos volátiles. En el día 0 de cultivo, las plantas que están creciendo en ausencia de volátiles fúngicos producidos por el hongo *Alternaria alternata* (-FV) muestran un tamaño similar al de las plantas que están creciendo en presencia de volátiles fúngicos; en el día 7 (momento en el que el agua del medio de cultivo se ha reducido muy notablemente), las plantas tratadas con volátiles fúngicos (+FV) muestran mayor tamaño que las plantas que crecen en ausencia de los mismos (-FV), lo que indica mayor resistencia al estrés hídrico.

Figura 36: gráficos que demuestran el control de los fotorreceptores en la acumulación de almidón en plantas de *Arabidopsis thaliana*. El panel A muestra la relación entre el contenido de almidón encontrado en plantas cultivadas en presencia de volátiles fúngicos producidos por *Alternaria alternata* (+FV) o en ausencia de los mismos (-FV), para plantas de tipo silvestre (WT) o mutantes *hy1/cry2*, *hy1/cry1* y *hy1/cry1/cry2*, cultivadas en medio sólido MS durante 16 horas bajo luz blanca. El panel B muestra también la relación entre el contenido de almidón encontrado en plantas silvestres cultivadas en presencia de volátiles fúngicos producidos por *Alternaria alternata* (+FV) o en ausencia de los mismos (-FV), dependiendo del tipo de luz bajo el cual crecieron las plantas (roja, del rojo lejano, azul o blanca).

Figura 37: impacto de las enzimas de degradación del almidón en la acumulación de almidón promovida por volátiles microbianos en plantas de *Arabidopsis thaliana*. El panel A muestra el contenido de almidón (expresado como micromoles de glucosa por gramo de peso fresco) de hojas crecidas en ausencia (-FV) o en presencia (+FV) de volátiles fúngicos producidos por *Alternaria alternata*, de plantas de tipo silvestre (WT) o mutantes de inserción de T-ADN en los genes de enzimas implicadas en la degradación del almidón: *BAM5*, *AMY3*, *SEX1*, *BAM4*, tras 16 horas de iluminación con luz blanca. El panel B muestra el contenido de maltosa, (expresado como micromoles de la misma por gramo de peso fresco) observado en plantas de tipo silvestre, cultivadas en presencia (circunferencias sin relleno) o en ausencia (circunferencias con relleno) de volátiles fúngicos producidos por *Alternaria alternata*, así como en el mutante *BAM4* de inserción de T-ADN (cuadrados sin relleno y con relleno en plantas crecidas en presencia o ausencia de volátiles fúngicos, respectivamente), durante 16 horas de iluminación; los resultados representados son la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes).

Figura 38: relación entre el contenido de almidón detectado en plantas cultivadas durante 16 horas en medio sólido MS bajo luz blanca, en presencia (+FV) de volátiles fúngicos producidos por *Alternaria alternata* con respecto a los obtenidos en ausencia de dichos volátiles. Se muestran los aumentos en el contenido de almidón detectados en plantas tipo silvestre (WT) y mutantes de inserción de T-DNA *SSII*, *SSIV*, *SSI/SSIV*, *SSII/SSIV*, *SSIII/SSIV*, *SSI/SSII/SSIV* y *SSI/SSII/SSIII*, expresados como la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

Figura 39: fotografía correspondiente al análisis de la presencia de GFP (*green fluorescent protein*: proteína verde fluorescente) en transferencias tipo Western en hojas de plantas de *Arabidopsis thaliana* que expresaban una proteína de fusión GBSS-GFP cultivadas durante 16 horas en presencia (FV+) o ausencia (FV-) de volátiles fúngicos emitidos por *A. alternata* crecido en medio MS sólido suplementado con 90 mM sacarosa. En ambos carriles se cargó proteína extraída a partir del almidón existente en una misma cantidad de extracto vegetal (30 microgramos de proteína total).

Figura 40: 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.

Figura 41: Efecto de los volátiles microbianos suministrados en el agua de riego. Los paneles A y B corresponden a plantas de pimienta de 3 semanas de edad, regadas con el medio obtenido tras dejar durante 2 días en MS líquido un micelio de *Alternaria alternata* (fotografías con la leyenda "medio de cultivo") o con agua (marcadas con la etiqueta "+H2O"). Las plantas de los paneles C y D tienen 45 días de edad. En la última de las fotografías (panel D) puede apreciarse una planta regada con agua, pero cultivada durante 2 semanas al lado de

un recipiente que contenía "medio de cultivo" de *A. alternata* filtrado (planta con la leyenda "+ volátiles del medio de cultivo).

Figura 42: Gráfico de acumulación de almidón en plantas de pimiento, regadas con agua (barra "+H2O"), con el medio obtenido tras dejar durante 2 días en MS líquido un micelio de *Alternaria alternata* (barra con la leyenda "+medio de cultivo de *Alternaria alternata*") o regadas con agua pero cultivadas durante 2 semanas al lado de un recipiente que contenía "medio de cultivo" de *A. alternata* filtrado (barra con la leyenda "+ volátiles del medio de cultivo de *Alternaria alternata*").

Descripción detallada de la invención

Ejemplos

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

- 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) y pimiento (*Capsicum annum*, cv. Dulce italiano).

Se usaron los mutantes de *Arabidopsis thaliana* que se muestran en la siguiente Tabla, en los que las siglas NASC hacen referencia al European Arabidopsis Stock Center (<http://arabidopsis.info/>) como fuente de procedencia de los mutantes, y las referencias completas citadas en la penúltima columna son las siguientes: Fulton et al., (2008): Plant Cell 20, 1040-1058; Laby et al. (2001): Plant Physiol. 127, 1798-1807; Yu et al. (2001): J. Biol. Chem. 280, 9773-9779; Yano et al. (2005): Plant Physiology 138:837-846; Michalska et al. (2009): Proc. Nati. Acad. Sci. USA 106(24): 9908-9913.

Tabla 1: Mutantes de *Arabidopsis thaliana* utilizados

Mutante	Locus	Descripción	Referencia	Fuente
<i>hy1/cry2</i>	At26670/Atl g04400	Deficiente en PHY fotoactivo y en CRY		NASC (N9856)
<i>hy1/cry1</i>	At26670/At4g08920	Deficiente en PHY fotoactivo y en CRY		NASC (N9855)
<i>hy1/cry1/cry2</i>	At26670/At4g08920/Atlg04400	Deficiente en PHY fotoactivo y en CRY		NASC (N3732)
<i>bam4</i>	At5g55700	Carece de la isoforma 4 de la β -amilasa plastidial	Fulton et al. (2008)	NASC (N660386)
<i>bam5</i>	At4gl5210	Carece de la isoforma 5 de la β -amilasa extraplastidial	Laby et al. (2001)	NASC (N532057)
<i>amy3</i>	Atlg69830	Carece de la B-amilasa plastidial	Yu et al. (2005)	NASC (N65602)
<i>sex1</i>	Atgl0760	Carece de la diquinasa de α -glucanos y agua	Yano et al. (2005)	NASC (N3093)
<i>ntrc</i>	At2g41680	Deficiente en NADP-tiorredoxina reductasa C plastidial	Michalska et al. (2009)	Dr. Cejudo

Para proceder a su cultivo, las plantas se cultivaron inicialmente 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 fotoperiodo de 16 h de luz ($300 \mu\text{mol fotones s}^{-1} \text{m}^{-2}$) y a una temperatura constante de 24 °C.

En el caso concreto de las plantas en las que se comprobó su respuesta a luz continua monocromática roja (600-700 nm), del rojo lejano (680-740 nm) o azul (400- 520 nm), las plantas se hicieron crecer durante 16 horas en una cámara de crecimiento equipada con una lámpara halógena de 400 W Son-T Agro (Royal Philips Electronics) filtrada a través de una capa de uno de los siguientes filtros de policarbonato: Supergel 19 para la luz roja, Supergel 27 para la luz del rojo lejano y Superfel 69 para la luz azul (Rosco Ibérica SA, Madrid, España). La lámpara halógena proporcionaba una radiación fotosintéticamente activa de $560 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. La radiación fotosintéticamente activa bajo las diferentes luces monocromáticas fue de 283, 80 y $76 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ para los filtros que daban lugar a luz roja, del rojo lejano y azul, respectivamente.

E. coli BW25113, *A. tumefaciens* EHA105 y GV2260, *Salmonella enterica* LT2, *Bacillus subtilis* 168 (*Bacillus* 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 Na_2HPO_4 mM KH_2PO_4 /17 mM NaCl /37 mM NH_4Cl /0,1 mM CaCl_2 /2 mM 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 *Penicillium*

aurantiogriseum o de *Alternaria alternata* se cultivaron en placas Petri que contenían medio MS sólido suplementado con sacarosa 90 mM.

5 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 de cultivo de 500 centímetros cúbicos. En los casos en los que se deseaba comprobar el efecto de los volátiles fúngicos, se colocaron en las mismas cajas de cultivo placas Petri destapadas que contenían cultivos microbianos, tal como se ilustra en la Figura 2. Las cajas se sellaron y las hojas se recogieron tras los tiempos de incubación indicados para realizar los análisis bioquímicos y de transcriptomas. 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.

- Análisis de transferencias tipo Western

15 Para producir antisueros policlonales contra Sus4, un ADNc 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-(3-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.

25 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: Proc. Nati. Acad. Sci. USA 102: 11118-11123).

35 Para los análisis de la proteína de fusión GBSS-GFP, se obtuvieron como extractos los sedimentos obtenidos a partir de un homogeneizado de planta (10 mg de peso fresco) tras un paso de centrifugación a 1000 x g. Tales extractos contienen almidón, al que se une la GBSS y, con ello, la proteína de fusión GBSS. Los extractos se separaron en PAGE con SDS al 10 % y se transfirieron a filtros de nitrocelulosa. La detección de la proteína GBSS asociada a GFP se llevó a cabo haciendo uso de un anticuerpo comercial específico anti-GFP, obtenido en conejos (ab290, de AbCam), siguiendo la metodología de Western Blot descrita por Towbin et. al (Towbin et al., 1979). El complejo antígeno-anticuerpo se detectó mediante incubación con un anticuerpo secundario IgG de cabra anti-conejo conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma) como anticuerpo secundario.

- Ensayos enzimáticos

45 Todas las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo a 37 °C. 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: Plant Cell Physiol. 50: 1651-1662). El ensayo de la β -amilasa se realizó como ha sido descrito por Liu et al. (Liu et al., 2005: 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: Plant Physiol. 90: 75-84). La nitrito reductasa se midió siguiendo el método descrito por Rao et al. (Rao et al., 1981: Plant Cell Physiol, 22: 577-582). La pG6PDH se midió según Hauschild et al. (Hauschild et al., 2003: Plant Physiol. 133: 47-62). El ensayo de la fructosa-1,6-bifosfatasa citosólica se realizó tal como ha sido descrito por Lee and Hahn (Lee and Hahn, 2003: Plant Cell Rep. 21:611-618). Una unidad (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la producción de 1 μ mol de producto por min.

- Determinación de ADPG, UDPG y 3-fosfoglicerato

60 Una alícuota de 0,5 g del tejido vegetal pulverizado congelado en nitrógeno líquido se resuspendió en 4 ml de HClO4 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 K2CO3 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: 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. (2005).

65 - Procedimientos analíticos

El almidón se midió utilizando un kit de ensayo basado en la amiloglucosidasa (adquirido a Boehringer Mannheim, Alemania, salvo en el caso de los ensayos realizados con mutantes de *Arabidopsis thaliana*, en los cuales se adquirió a Sigma-Aldrich Chemical Co, St. Louis, Mo, EE.UU.). El contenido de amilosa del almidón se midió yodométricamente según Hovenkamp-Hermelink et al. (Hovenkamp-Hermelink et al., 1988: 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: Plant J. 10: 981-991) utilizando un sistema DX-500 (Dionex) acoplado a una columna CarboPac PA 10. La maltosa se midió tal como ha sido descrito por Ezquer et al. (Ezquer et al. 2010: Plant Cell Physiol. 51:1674- 1693). La clorofila se midió tal como ha sido descrito en Wintermans and De Mots (Wintermans, J.F.G.M. and de Mots. A. (1965). *Biochim. Biophys. Acta* 109: 448-453). Los niveles de 3-PGA y Pi se determinaron tal como ha sido descrito por Lytovchenko et al. (Lytovchenko, et al., 2002. *Planta* 215: 802-811).

En todos los casos, los resultados mostrados corresponden a la media \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes.

- Micromatrices

El ARN 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 ARN se llevaron a cabo básicamente como ha sido descrito por Adié et al. (Adié et al., 2007: *Plant Cell* 19: 1665-1681). Para la hibridación se utilizaron portaobjetos con micromatrices Agilent POCI 4 x 44K (015425) (G2519, Agilent Technologies) que contienen 246.000 etiquetas de secuencia expresadas que corresponden a 46.345 unigenes (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/poci>) (Kloosterman et al. 2008: *Funct Integr. Genomics* 8: 329-340). Las condiciones de mareaje e hibridación fueron las descritas en "The manual two color microarrays based gene expression Analysis" ("El manual del análisis de la expresión de genes basado en micromatrices 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: *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 ARN total se extrajo de las hojas de patata como se hizo para los experimentos de micromatrices. El ARN se trató con ADNasa libre de ARNasas (Takara). Se realizó la transcripción inversa de 1,5 μ g de ARN 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 μ l de la primera cadena de ADNc en un volumen total de 20 μ l. La especificidad de la amplificación por PCR se comprobó con una curva de calor de disociación (de 60 $^{\circ}$ C a 95 $^{\circ}$ C). Los valores comparativos del umbral se normalizaron con respecto a un control interno de ARN 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 2: 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

Proteína codificada	Cebadores utilizados	SEQ ID NO:
B-amilasa BMYI	Directo: GAGGTAACACGAGGCTTCCA	15
	Inverso: CACAACCTGCAACCTCTGCAT	16
Tiorredoxina M4	Directo: AAGTTACCCGTCCTGGTTGA	17
	Inverso: ACTTGCCAGCGTATTCTGT	18
Nitrito reductasa	Directo: TGCAGACATTGGATTCATGG	19
	Inverso: CTCCCAAATGTGAATCACTCC	20
Cisteína sintasa	Directo: TGCCTGCATCAATGAGTCTT	21
	Inverso: CAGCCTTTGAAACAGCTCCT	22
Pirofosfatasa inorgánica	Directo: ACAGCCCGAAACCCCTAGATT	23
	Inverso: TGAAAACACCATCACCCAAA	24
Invertasa ácida	Directo: AATGGAGCAGCAGACTCTT	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: ATCCGGGACAATTAATTCCA	34
ARN 18S	Directo: GGGC ATTTCGT ATTTTC ATAGTC AGAG	35
	Inverso: CGGTTCTTGATTAATGAAAACATCCT	36
Translocador de glucosa-6-fosfato	Directo: TGACTGGAGATGGATGTGGA	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: ATCCGACTCCGACTTACGA	48
Sacarosa sintasa 4	Directo: TGGGAATACATCCGTGTGAA	49
	Inverso: GCTCCGTCGACAAGTTCTTC	50
Chaperona tipo dnaK Hsc70	Directo: TGCAAGCTGCAATCTTGAGT	51
	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: TTTTGGTCTCTCCATGAGC	62
Fructosa-1,6-bifosfatasa citosólica	Directo: TATCCCGCTGATGGTTCTTC	63
	Inverso: CTCCGGGTACAAGAAGATG	64
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (isoforma plastidial)	Directo: CACACCGTGACTTGAGGAGA	65
	Inverso: CCCTTGAGCTGAGGTAGCAC	66

- Tinción de yodo y localización microscópica de gránulos de almidón

- 5 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) I2 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.
- 10 Se obtuvieron criosecciones de 10 μ m 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).

5 - 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.

10 - 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 (Ejemplo de referencia)

15 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 o 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 Figura 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 Figura 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 Figura 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 Figura 3, todos estos parámetros se vieron aumentados 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 Figura 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: Proc. Nati. Acad. Sci. USA 100, 4927-4932), quienes mostraron que *E. coli* DH5a 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 contenían extractos de levadura, ricos en aminoácidos, tales como los medios LB o Komberg, 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 Figura 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 Figura 5B) o *Pseudomonas syringae* (véase la Figura 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, Komberg 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 desaminación de los aminoácidos existentes en el medio.

5 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 amiloglicosidasa/hexoquinasa/glucosa-6P deshidrogenasa (Figura 6A). Tal como se pueden observar en la Figura 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 Figura 6B, el efecto "positivo" de los microorganismos sobre la acumulación de almidón solo tiene lugar cuando éstos son crecidos en un medio mínimo (M9, MOPS o incluso 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 Figura 6. Los paneles F y G muestran el aumento 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* (Figura 7 A y 7C), efecto positivo que se refleja también en un aumento en la acumulación de almidón (Figura 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) (Szydlowski et al., 2009: *Plant Cell* 21, 2443-2457) cultivadas en presencia y en ausencia de FV (volátiles fúngicos) emitidos por *Alternaria alternata*. Tal como se muestra en las Figura 8A y 8B, estos análisis revelaron que la tinción con yodo de hojas de plantas cultivadas en presencia de FV fue mucho más oscura que la de las plantas control. Los análisis de microscopía óptica (Figura 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 FV que en las condiciones control (Figura 8E, 8F y 8G). Estos análisis demuestran que el aumento del contenido de almidón no es debido al aumento del número de gránulos por plastidio, sino al espectacular aumento de tamaño de los gránulos de almidón.

Se confirmó si la existencia del proceso de acumulación de almidón inducido por volátiles microbianos (**m**icrobial **v**olatile**s** **i**nduced **s**tarch **a**ccumulation **p**rocess: 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 FV 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 Figura 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 FV con respecto a la ausencia de FV. Merece destacarse que los niveles de almidón en las plantas de patata cultivadas en presencia de FV (aproximadamente 500-600 μ mol glucosa/g de peso fresco) eran comparables a los que se conocen para los tubérculos de patata (Baroja-Fernández et al., 2009: *Plant Cell Physiol.* 50, 1651-1662). Además, tal como se muestra en la Figura 10, la presencia de FV estimula el acúmulo 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 FV promueven la acumulación de almidón en hojas desprendidas (Ejemplo de referencia)

5 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 FV emitidos por la especie fúngica *Alternaria alternata*.

10 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 (Figura 11), mostrando así los datos globales que los FV 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 (Figura 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 FV

20 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 FV emitidos por *Alternaria alternata* utilizando la matriz de oligos 60-meros POCI 44K (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/poci>) (Kloosterman et al. 2008: Funct. Integr. Genomics 8, 329-340).

25 Cuando las plantas se cultivaron en MS suplementado con sacarosa, se encontró que 3019 genes estaban desregulados en presencia de FV (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 positivamente y 1827 genes estaban regulados negativamente.

30 Cuando las plantas se cultivaron en MS sin sacarosa, se encontró que 2856 genes estaban desregulados en presencia de FV, 1109 de los cuales eran genes clasificados como "sin función asignada". Entre esta población, 1671 genes estaban regulados positivamente y 1185 genes estaban regulados negativamente. Los análisis de PCR con transcripción cuantitativa en tiempo real, (RT)-PCR, de algunos de los genes identificados (Figura 13) validaron los resultados de los análisis del matriz.

35 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: Plant J. 37, 914-939) (<http://gabi.rzpd.de/projects/MapMan/>). Tal como se refleja en los gráficos de la Figura 14, este estudio reveló que los FV 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 estado 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 Figura 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.

45 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 (3-glucano/agua diquinasa, 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: Análisis detallado de funciones ligadas al metabolismo del almidón (Ejemplo de referencia)

55 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 3:

60 Tabla 3: Actividad enzimática de enzimas del metabolismo del almidón

Actividad enzimática (mU/ g FW)	-FV	+ FV
AGP (con DTT)	126,0 ± 13,2	161,3 ±20,5
SuSy	27,2 ± 2,9	255,0 ±5,9
SS total	2,40 ± 0,52	8,11 ±0,04

Actividad enzimática (mU/ g FW)	-FV	+ FV
(3-amilasa)	2,00 ± 0,24	1,31 ± 0,27
PPasa	2,22 ± 0,12	1,67 ± 0,10
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
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 FV, 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: Trends Plant Sci. 10, 154-156; Streb et al. 2009: 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: 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 positivamente (aumento de 14,98 veces), mientras que otro de los genes que también codifica la subunidad mayor, APL3, estaba regulado negativamente (disminución de 8,8 veces) tal como se confirmó además mediante análisis de RT-PCR cuantitativa (Figura 13).

Tal como se refleja en la Tabla 3 anteriormente expuesta, la actividad total de la AGP se vio ligeramente alterada por el tratamiento con FV (aumento 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 FV (Figura 15).

El tratamiento con FV 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 FV frente a $674,1 \pm 127,5 \mu\text{mol/ g FW}$ en presencia de FV), 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 (Figura 13) y los análisis de transcriptomas revelaron que el tratamiento con volátiles fúngicos dio como resultado la regulación negativa de la PPasa (reducción de 3,72 veces), que fue acompañada de una reducción en la actividad PPasa (véase la Tabla 3). 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 rédox postraduccional de AGP mediada por tiorredoxinas (Ballicora et al. 2000: J. Biol. Chem. 275, 1315-1320), que está promovida por la trehalosa-6-fosfato formada en el citosol (Kolbe et al. 2005: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 11118-11123). Merece destacarse que los análisis de RT-PCR cuantitativa (Figura 13) y los análisis de transcriptomas revelaron que la trehalosa-6-fosfato sintasa y las tiorredoxinas plastidiales se veían fuertemente reguladas negativamente cuando las plantas se cultivaban en presencia de FV (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 estado rédox de la AGP, se separaron extractos de hojas de patata control y tratadas con FV 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: Plant Physiol. 133, 838-849; Kolbe et al. 2005:

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 11118- 11123). Tal como se muestra en la Figura 15, las hojas de patata tratadas con FV 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) (Figura 15), indicando así los datos globales que la AGP está en su mayor parte oxidada (inactiva) en las hojas tratadas con FV.

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-Róber et al. 1992: EMBO J. 11, 1229-1238)) cultivadas en presencia y en ausencia de FV. Tal como se ilustra en la Figura 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 FV. Merece destacarse que el tratamiento con FV dio como resultado una potenciación drástica de la acumulación de almidón (Figura 16B), y un aumento de aprox. 70 % en el contenido de ADPG (Figura 16C) en hojas AGP62. Los contenidos de almidón y ADPG en hojas AGP62 tratadas con FV fueron comparables a los observados en hojas WT tratadas con FV.

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 de forma positiva SuSv y regulan negativamente 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 adicional o rutas adicionales 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 FV revelaron que el tratamiento con FV dio como resultado una drástica potenciación de la expresión de Sus4 (aumento 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: Plant Cell Physiol. 46, 1366-1376; Baroja-Fernández et al. 2009: 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 FV reveló una correlación positiva entre los patrones de actividad de SuSy y los contenidos de almidón, UDPG y ADPG (Figura 17). Esta potenciación drástica de la expresión de SuSy mediante el tratamiento con FV se confirmó adicionalmente mediante análisis de transferencias tipo Western (Figura 18), RT-PCR cuantitativa (Figura 13), y mediante análisis de medida de la actividad enzimática (aumento de 10 veces: véase la Tabla 3).

La invertasa ácida es una enzima sacarolítica cuya actividad está regulada de forma postraduccional por un inhibidor proteínico (Bracho and Whitaker 1990: 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: Plant Cell Physiol. 50, 1651-1662). Merece destacarse que los análisis del perfil de ARN revelaron que el tratamiento con FV dio como resultado una regulación negativa 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 (aumento de 17,78 y 18,1 veces en presencia y ausencia de sacarosa, respectivamente), lo que se confirmó adicionalmente mediante RT-PCR cuantitativa (Figura 13) y mediante análisis de actividad enzimática (véase la Tabla 3).

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 FV (Figura 17), los datos globales indicaban también que los altos niveles de ADPG, UDPG y almidón producidos en hojas de patata tratadas con FV 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 negativamente 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 (Figura 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 FV dio como resultado una regulación negativa 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 (Figura 13), y los análisis de transcriptomas revelaron que el tratamiento con FV 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 FV daba como resultado una marcada regulación negativa de la G6P deshidrogenasa (pG6PDH) plastidial (reducción de 6,17 veces) (véanse también la Figura 13 y la Tabla 3), 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 FV 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 Figura 13 y la Tabla 3).

La primera etapa 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 FV da como resultado a la regulación negativa de la PPasa. Así, es concebible que con el tratamiento con FV se acumule PPI en el cloroplasto, impidiendo así la biosíntesis de sulfoaminoácidos inhibiendo la ATP sulfurilasa. Merece destacarse que el tratamiento con FV da como resultado una regulación negativa 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 FV 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 (Figura 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 FV 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 FV 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 positivamente 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: 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: Plant J. 49, 492-504) han demostrado que la eliminación de SSIV determina que los cloroplastos acumulen solo 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: 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 FV dio como resultado un gran aumento de la expresión de SSIV (aumento de 7,00 y 4,68 veces en presencia y en ausencia de sacarosa, respectivamente) y un aumento moderado en la expresión de SSIII (aumento de 2,53 veces en presencia de sacarosa), resultados que se confirmaron mediante análisis de RT-PCR cuantitativa (Figura 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 FV daba como resultado un aumento de 3 veces en la actividad SS total (véase la Tabla 3). 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 aumentando 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 α -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 pululanasa que hidrolizan enlaces α -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 (Figura 13) y los análisis de transcriptomas revelaron que el tratamiento con FV dio como resultado un drástico aumento en la expresión de SBE (aumento de 32,66 y 2,5 veces en presencia y en ausencia de sacarosa, respectivamente) y un aumento moderado en la expresión tanto de pululanasa como de GBSS cuando las plantas se cultivaron en condiciones heterotróficas (aumento de 3,4 y 2,98 veces, respectivamente). Consistentemente, la actividad de la SBE en hojas tratadas con FV era marcadamente más elevada que en hojas no tratadas (Tabla 3). Merece destacarse que los cambios en la expresión de estos genes fueron acompañados por una importante reducción en el contenido relativo de amilosa (Figura 20A).

Para investigar si los cambios promovidos por los FV 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 FV 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 FV ejerce un efecto importante sobre la estructura de la amilopectina, puesto que la amilopectina de hojas tratadas con FV contenía más cadenas con un grado de polimerización (GP) menor que 20 monómeros, que la amilopectina de hojas no tratadas (Figura 20B, Figura 20C). Los datos globales indicaron así que los cambios estructurales que ocurren en las moléculas de almidón de plantas tratadas con FV se pueden adscribir, al menos en parte, a la potenciación de las actividades SS y SBE.

- 4.6. Los volátiles fúngicos regulan fuertemente de forma negativa las enzimas de degradación del almidón

Utilizando la técnica de los antisentido, Scheidig et al. (Scheidig et al., 2002: Plant J. 30, 581-591) demostraron que la β -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 FV daba como resultado una drástica regulación negativa 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 (Figura 13) y mediante análisis de actividad enzimática (Tabla 3).

Las plantas superiores contienen fosforilasas de almidón tanto citosólicas como plastidiales. Al contrario de lo que ocurre con las B-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: Plant Physiol. 135, 849- 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 (Figura 13) y los análisis de transcriptomas revelaron que el tratamiento con FV daba como resultado una marcada regulación negativa de la expresión de la fosforilasa del almidón plastidial cuando las plantas se cultivaban en condiciones heterotróficas (disminución de 5,14 veces).

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

- 5 - 4.7. Los volátiles fúngicos regulan de forma positiva genes implicados en la endocitosis y el tráfico de vesículas

10 Sintetizados a partir del fosfatidilinositol (PI) mediante la PI-3-fosfato (PI3P) 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 aumento del metabolismo del fosfoinosítido da como resultado un aumento en la utilización de azúcares de medio (Im et al. 2007), 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: *Plant Cell Physiol.* 47, 447-456). Consistentemente con estas observaciones, los análisis de RT-PCR (Figura 13) y los análisis de transcriptomas revelaron que los genes que codifican PI4K y PI3K se ven regulados positivamente por el tratamiento con FV (aumento 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 (Figura 13) y los análisis de transcriptomas revelaron que los genes que codifican la inositol-fosfato sintasa y el inositol monofosfatasa se ven regulados positivamente por el tratamiento con FV (aumento de 3,78 y 4,62 veces, respectivamente).

30 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: *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 (Duncan and Huber 2007: *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 (Figura 13) y los análisis de transcriptomas revelaron que la expresión del factor despolimerizante de la actina se ve regulada positivamente por el tratamiento con FV (aumento de 3,26 veces)

Los datos globales muestran así que, tal como se ilustra esquemáticamente en la Figura 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.

- 45 - 4.8. Los volátiles fúngicos promueven la regulación negativa de genes de fotosíntesis cuando las plantas se cultivan en condiciones heterotróficas

50 Una de las alteraciones más llamativas del transcriptoma de las plantas tratadas con FV 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 FV 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 Figura 13). Además, el tratamiento con FV de plantas cultivadas con sacarosa dio como resultado la represión del gen que codifica la fotoclorofilo 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 Figura 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).

- 65 - 4.9. Los FV 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 FV dio como resultado la regulación negativa de la ATP sintasa plastidial cuando las plantas se cultivaron en condiciones heterotróficas (reducción de 9,09 veces). En estas condiciones los FV promovieron la transcripción de genes que codifican enzimas glicolíticas tales como enolasa, piruvato quinasa, fosfoenol piruvato (PEP) carboxiquinasa y PEP carboxilasa (aumento 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 FV promueven la glicolisis y el flujo de carbono hacia el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), tal como se esquematiza en la Figura 21, especialmente cuando las plantas se cultivan en condiciones heterotróficas. A este respecto, merece destacarse que el tratamiento con FV dio como resultado un aumento en la expresión de los genes que codifican enzimas del ciclo de los TCA tales como succinato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa (aumento 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 positivamente por el tratamiento con FV, tanto en condiciones heterotróficas (aumento de 51,43 y 9,92 veces para la ADH y la aldehído deshidrogenasa, respectivamente), y condiciones autotróficas (aumento de 9,92 y 3,77 veces para ADH y piruvato descarboxilasa, respectivamente) (véase también la Tabla 3). El aumento 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 FV 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 positivamente 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: Plant J. 50, 293-304). Merece destacarse que los FV regulan positivamente la expresión del transportador plastidial de ATP/ADP cuando las plantas se cultivan en condiciones heterotróficas (aumento de 3,16 veces), lo que es consistente con la noción de que el ATP extraplástidial sostiene en gran medida rutas anabólicas que suceden en el cloroplasto de plantas tratadas con FV 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 (Figura 13) y transcriptomas revelaron que, independientemente de la presencia de sacarosa en el medio de cultivo, el tratamiento con FV 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 FV 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.

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 FV 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 (Figura 13) como mediante los análisis de transcriptomas (aumento de 30,23 y 22,08 veces cuando las plantas de cultivaron en presencia y en ausencia de sacarosa, respectivamente).

La implicación del translocador G6P/Pi en la importación de G6P citosólica al cloroplasto cuando las plantas se trataron con FV es cuestionable, puesto que, tal como se mostró más arriba, las enzimas implicadas en el metabolismo plastidial de la G6P están drásticamente reguladas negativamente. 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 3 y la Figura 13) (reducción de 9,87 y 3,61 veces en presencia 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 Figura 13) sugieren que, tal como se esquematiza en la Figura 21, en condiciones de tratamiento con FV,

el transportador de G6P/PÍ 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 procesos de endocitosis y tráfico de vesículas.

5 - 4.11. Influencia de los FV en otros genes de interés

10 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 positivamente durante MIVOISAP. Consistentemente con esta presunción, el análisis de transcritos de hojas de plantas de patata reveló que el tratamiento con FV daba como resultado la regulación positiva de la celulosa sintasa y la callosa sintasa (aumento de 9,78 y 2,1 veces, respectivamente).

15 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 FV promovía con fuerza la expresión de SNF4 (aumento de 6,64 veces) (véase también la Figura 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.

20 - Ejemplo 5: Cinética de la acumulación de almidón (Ejemplo de referencia)

25 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, véanse los ensayos de cinética de acumulación de almidón en dos plantas diferentes: *Arabidopsis thaliana* (cv. Columbia) y patata (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée).

30 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 ($300 \mu\text{mol fotones s}^{-1} \text{m}^{-2}$), 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 Figuras 22, 23 y 24 se recolectaron las hojas para posteriores análisis del contenido de almidón, 3PGA, Pi y actividad SuSy.

35 5.1. Cinética de *Arabidopsis thaliana*

40 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 Figura 22. Las condiciones fueron las siguientes:

- 45
- Cultivo en presencia de volátiles fúngicos 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)
 - 50 - 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 (Figura 22A) 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.
- 60

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

65 Adicionalmente, haciendo uso de las plantas cultivadas en las mismas condiciones, se comprobó el balance 3PGA/PÍ 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 (AGP), mientras que el ortofosfato (Pi) es un regulador negativo de esta enzima, implicada en la producción plastidial de ADPglucosa. La AGP está implicada en la producción de ADPG ligada a la biosíntesis de almidón. Se considera que la modulación alostérica de la AGP representa un determinante importante de la tasa de biosíntesis de almidón en los tejidos fotosintéticos, aunque algunos estudios no han conseguido encontrar una correlación entre los niveles de 3-PGA en el estroma y el contenido de almidón.

Los resultados se muestran en la Figura 22B, en la que puede observarse que la relación 3PGA/Pi se aumenta en el caso de plantas cultivadas en presencia de luz con volátiles fúngicos; la curva parece indicar, además, una relación entre el aumento de almidón y el aumento 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 Figura 22B 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.

5.2. Cinética de la concentración de 3-PGA y Pi en MIYOISAP

Para corroborar los datos del apartado anterior, se realizó un ensayo análogo al descrito en el apartado 5.1.: se llevó a cabo la incubación de las plantas de *Arabidopsis thaliana* tal como se ha descrito en el apartado de "Plantas, cultivos microbianos, condiciones de crecimiento y obtención de muestras", con 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, en presencia o en ausencia de cultivo *Alternaria alternata* y, por tanto, de presencia o ausencia de volátiles microbianos.

En este nuevo ensayo, en el que se determinaron los niveles de 3-PGA y Pi según ha sido descrito por Lytovchenko et al. (2002) se confirmaron los resultados previamente obtenidos. Tal como se puede ver en la Figura 23, el análisis de la cinética de acumulación de 3-PGA y Pi en hojas de *Arabidopsis thaliana* tratadas y no tratadas con volátiles microbianos confirmó los resultados previos, mostrando que la relación 3-PGA/Pi se aumentaba después de 6 horas de tratamiento con volátiles fúngicos producidos por *Alternaria alternata* (véase el panel C de la Figura 23; este aumento se debe principalmente a la acumulación de 3-PGA (panel A de la Figura 23), más que a las variaciones en el contenido de Pi (panel B de la Figura 23).

Estos datos confirman que MIYOISAP implica una activación alostérica de la AGP por el aumento del 3-PGA.

5.3. Cinética en plantas de patata

Se repitió el experimento del apartado 5.1., 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).

Los resultados se representan en la Figura 24, en la que aparecen solo 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 (aumento de la expresión de SuSy) que regulan MIYOISAP.

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

Se repitió el experimento del apartado 5.1, 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 Figura 25 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.

Ejemplo 6: Identificación de compuestos volátiles implicados en el aumento de la acumulación de almidón (Ejemplo de referencia)

6.1. Identificación de las sustancias con capacidad de aumentar 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 aumento 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 descritos en el apartado general de "Plantas, cultivos microbianos, condiciones de crecimiento y obtención de muestras", 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 μmol de fotones $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$) 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 con la particularidad 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), P-mercaptoetanol, ácido salicílico, ácido jasmónico, cisteína, acetoína, etanol, metanol, P-hidroxitirato, butanodiol, 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 amilogucosidasa (Boehringer Mannheim, Alemania).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 26A.

Tal como se ilustra en la misma, ni la acetoína ni el butanodiol, compuestos previamente implicados en aumento del crecimiento de las plantas, están implicados en MIVOISAP (microbial volátiles induced starch accumulation process: 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 acetoína y el butanodiol, 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, solo 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 (Figura 27), lo cual indica fuertemente que el efecto MIVOISAP divulgado en la patente principal P201000499 (consistente en el aumento de la acumulación de almidón, aumento 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.

6.2. 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, acetaldehído o ácido butírico, ensayando para cada uno de ellos tres concentraciones diferentes, cada uno en distintas cajas: al 1 %, 2 % o 5 % (v/v).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 26B. 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 presente.

Ejemplo 7: Influencia de los defectos en la síntesis de ácido pirúvico sobre la acumulación de almidón producida por mezclas de volátiles emitidas por microorganismos (Ejemplo de referencia)

Tal como se ha explicado previamente en la presente solicitud, el aumento en la acumulación de almidón se observa cuando las plantas se cultivan en presencia de distintos microorganismos capaces de producir volátiles: 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 aumento de acumulación del almidón, cuando dicha bacteria se cultivó en placas Petri que contenían medio mínimo M9 sólido (95 mM Na_2HPO_4 /44 mM KH_2PO_4 /17 mM NaCl /37 mM NH_4Cl /0,1 mM CaCl_2 /2 mM MgSO_4 , agar bacteriológico al 1,5 %) suplementado con glucosa 50 mM.

Para corroborar los resultados obtenidos en el Ejemplo 6 de la presente solicitud, 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* ApykF (Baba, T., 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*.

5 Así, se repitió el ensayo del Ejemplo 6 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*.

10 Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 28. 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.

- Ejemplo 8: Influencia del amoníaco en el crecimiento y color de las plantas

15 Con el fin de obtener más información sobre la posibilidad 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 6.1 y 6.2. del Ejemplo 6, 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 % o 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.

25 Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 29. 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 amoníaco.

30 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.

35 - Ejemplo 9: Patrón de crecimiento de plantas de maíz y pimiento crecidas en presencia de volátiles microbianos (Ejemplo de referencia)

40 Para comprobar el efecto sobre el patrón de crecimiento de plantas de maíz y pimiento de los volátiles microbianos, se cultivaron plantas de maíz (*Zea mays*, cv. Hill) y pimiento (*Capsicum annuum*, cv. Dulce italiano) simultáneamente con un cultivo de *Alternaria alternata*, iniciando el cultivo de la forma descrita en el apartado de "Plantas, cultivos microbianos, condiciones de crecimiento y obtención de muestras". En este caso, para comprobar si los efectos de los volátiles microbianos seguían siendo detectables a lo largo de un tiempo prolongado de cultivo, las plantas se cultivaron durante 54 días (caso del maíz) y 68 días (caso del pimiento).

45 Durante este tiempo, se tomaron cada semana datos de las plantas crecidas en presencia de volátiles fúngicos, así como de las plantas control crecidas en ausencia de cultivo de *Alternaria alternata*, controlando la altura de las mismas y el grosor del tallo, así como del número de hojas e, incluso, en el caso de pimiento, se hizo un recuento de brotes florales. También se tomaron muestras de hojas de las plantas para comprobar el contenido de clorofila de las mismas.

50 Las Figuras 30 y 32 muestran, respectivamente, las fotografías obtenidas de las plantas de maíz y pimiento transcurridos distinto número de días desde el comienzo del cultivo. Se observa que, desde los primeros días de cultivo, las plantas crecidas junto con un cultivo de *Alternaria alternata*, sin que exista contacto entre ellos (planta de la derecha en todas las fotografías) presentan un mayor tamaño que las plantas crecidas en condiciones control, en ausencia de volátiles fúngicos. Los números junto a cada fotografía indican los días transcurridos desde el inicio del cultivo. También el número de hojas es superior en las plantas sometidas al efecto de los volátiles fúngicos.

55 Las Figuras 31 y 33 muestran los gráficos correspondientes a los parámetros de cuya evolución se tomó registro para comparar las plantas sometidas al efecto de volátiles fúngicos (+FV) y las plantas control (-FV): altura (en centímetros), número de hojas, clorofila (en miligramos por g de peso fresco) y grosor del tallo (en centímetros) para el caso del maíz (Figura 31) y altura (en centímetros), clorofila (en miligramos por g de peso fresco), grosor del tallo (en centímetros), número de hojas y número de brotes florales para el caso del pimiento (Figura 33). Los números que aparecen en abscisas corresponden al tiempo transcurrido, en días, desde el comienzo del cultivo cuando se tomó el correspondiente valor.

65

Se observa que, en general, el valor de todos los parámetros controlados es superior en las plantas sometidas al efecto de volátiles fúngicos respecto al encontrado en las plantas control: solo en el caso de la altura de las plantas de maíz se observa levemente superior para la altura de las plantas control en la medida tomada a los 14 días. Salvo en ese caso, la altura de las plantas sometidas al efecto de volátiles fúngicos es siempre claramente superior a la altura de las plantas control, diferencia que se va aumentando con el aumento de los días de cultivo, especialmente en el caso de las plantas de maíz.

El caso de la acumulación de clorofila en plantas de maíz es especialmente llamativo: mientras que en las plantas control la cantidad de clorofila relativa al peso fresco disminuye con los días de cultivo, en las plantas sometidas al efecto de volátiles fúngicos el descenso es mucho menos acusado, llegando incluso a obtenerse una elevación de la cantidad de clorofila tras 28 días de cultivo, respecto a la medida anterior, aunque posteriormente continúa su pauta de descenso. En el caso del pimiento, la cantidad parece descender hasta el día 19, momento en que comienza a ascender de nuevo, alcanzando a los 40-47 valores próximos a los de las plantas tras 12 días de tratamiento con volátiles fúngicos.

Merece comentarse también el caso de los botones florales en plantas de pimiento, que demuestra la influencia sobre los patrones de crecimiento y floración que tienen los volátiles microbianos. Tras 26 días de cultivo, pueden detectarse botones florales en las plantas tratadas con volátiles fúngicos, que son aún indetectables en el caso de las plantas control. Posteriormente, el número de botones florales es siempre mayor en las plantas sometidas al efecto de volátiles fúngicos, llegando a valores medios cercanos a 9 tras 40 días de cultivo.

Especialmente llamativas son las fotografías mostradas en la Figura 34, en la que se muestra que las raíces de las plantas sometidas al efecto de volátiles fúngicos presentan un crecimiento espectacular, muy superior al de las raíces de las plantas control.

Todo ello corrobora que los efectos de los volátiles microbianos sobre el aumento del crecimiento y la alteración del patrón del mismo (aumento del número de hojas, del número de flores, adelantamiento de la floración...) se dan en distintas especies.

- Ejemplo 10: El tratamiento de las plantas con volátiles microbianos aumenta la resistencia de las mismas al estrés hídrico

Para investigar si la presencia de volátiles microbianos en la atmósfera de crecimiento podía tener además efecto sobre alguno de los factores que influye en el crecimiento de las plantas, como puede ser el cultivo en condiciones de estrés hídrico, se comparó el crecimiento de plantas de tipo silvestre de *Arabidopsis thaliana* crecidas en presencia de volátiles fúngicos producidos por un cultivo del hongo *Alternaria alternata* con el de plantas crecidas en ausencia de dichos volátiles, transcurrido un tiempo de cultivo en el que el agua comienza a escasear en el medio.

Para ello, se llevaron a cabo ensayos de cultivo plantas de *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia en condiciones similares a los que se llevaron a cabo en la solicitud de patente principal, tal como se describió anteriormente en la sección de "Plantas, cultivos microbianos, condiciones de crecimiento y obtención de muestras". Una porción de las plantas (+FV) se hicieron crecer en placas Petri que contenían medio MS sólido con sacarosa 90 mM, en cajas estériles en las que se había colocado una placa Petri destapada con un cultivo del hongo *Alternaria alternata*, sin existir contacto físico entre la planta y el cultivo fúngico, pero estando las plantas expuestas a una atmósfera en la que estaban presentes los volátiles fúngicos producidos por dicho hongo. La otra porción de las plantas se hicieron crecer en las mismas condiciones, salvo porque la placa Petri adicional contenía solo medio de cultivo estéril (-FV).

La Figura 35 muestra los resultados obtenidos al fotografiar las plantas al comenzar el proceso (día 0) y tras 7 días de cultivo (fila inferior), momento en que el agua del medio de cultivo se ha reducido muy notablemente. Se observa que, al comenzar el ensayo (día 0), el tamaño de las plantas crecidas en ausencia de volátiles fúngicos era similar al de las plantas crecidas en presencia de los mismos; sin embargo, en el día 7, las plantas que han crecido en ausencia de volátiles microbianos presentan un tamaño muy inferior al de las plantas crecidas en presencia de volátiles fúngicos, tamaño que es, incluso, inferior al que tenían en el día 0. Las plantas crecidas en presencia de volátiles fúngicos, en cambio, presentan un tamaño superior al que tenían en el día 0.

Estos datos indican que el tratamiento con volátiles microbianos emitidos por organismos crecidos en medios mínimos promueve en las plantas un aumento de la resistencia a condiciones estresantes como el estrés hídrico.

- Ejemplo 11: La acumulación de almidón promovida por volátiles microbianos está sometida a control mediado por fotorreceptores (Ejemplo de referencia)

Además de proporcionar la fuente primaria de energía para el desarrollo de la fotosíntesis, la luz es uno de las señales medioambientales más importantes que controla muchos aspectos fisiológicos y del desarrollo de las plantas. La luz actúa a través de fotorreceptores, regulando diversas respuestas tales como la germinación de semillas, establecimiento de plántulas, ajuste de los ritmos circadianos, tiempo de floración, degradación de la reserva de almidón inducida por la luz, flujo de partición del carbono, etc. Las principales familias es fotorreceptores

- que se dan en las plantas son las fototropinas y criptocromos (CRY), que absorben luz azul, y los fitocromos (PHY) que absorben luz roja o del rojo lejano. Ambos dirigen los cambios adaptativos en la expresión de genes en respuesta a señales luminosas medioambientales; por ejemplo, 1 expresión de genes que codifican enzimas relacionadas con el almidón y el metabolismo del nitrógeno están sometidos a fotocontrol mediado por fitocromos.
- 5 Los fotorreceptores también dirigen respuestas citoplásmicas muy rápidas tales como la acidificación apoplástica mediante la ATPasa de bombeo de protones presente en la membrana plasmática, que es necesaria para la expansión celular, y la apertura de estomas, el movimiento de cloroplastos, las corrientes citoplásmicas dependientes de actina, el gravitropismo y la elongación del hipocótilo, que no son consecuencia de cambios en la expresión génica. La percepción de la luz roja y del rojo lejano mediante los PHY requiere la presencia de la
- 10 fitocromobilina, que está covalentemente unida a la porción apoproteica de los PHY. En *Arabidopsis*, este cromóforo está sintetizado por los productos de los genes *HY1* y *HY2*. Al recibir luz roja o infrarroja, el fitocromo sufre un cambio conformacional cis-trans, que da lugar al intercambio entre la llamada forma activa (forma Pfr, que absorbe en el rojo lejano) y la forma inactiva (Pr, que absorbe en la zona del rojo)
- 15 Para investigar la posible implicación de la señalización luminosa en MIVOISAP, se comparó el incremento de contenido de almidón promovido por volátiles fúngicos entre plantas tipo silvestre (WT) y los mutantes deficientes en PHY fotoactivos y en CRY *hy1/cry1/cry2*, *hy1/cry2* y *hy1/cry1*. Para ello, se recurrió a plantas de *Arabidopsis thaliana* y se llevaron a cabo ensayos de cultivos de las mismas similares a los que se llevaron a cabo en la solicitud de patente principal, tal como se describió anteriormente en la sección de "Plantas, cultivos microbianos, condiciones de crecimiento y obtención de muestras". Para ello se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia y como
- 20 plantas silvestres, y los mutantes deficientes en PHY fotoactivos y en CRY *hy1/cry2* y *hy1/cry1*. Tanto unas como otras se hicieron crecer en presencia de volátiles fúngicos producidos por un cultivo de *Alternaria alternata* con el que compartían caja de cultivo, sin existir contacto físico entre la planta y el cultivo fúngico.
- 25 Tal como se puede ver en la Figura 3 6A, el aumento del contenido de almidón en los mutantes *hy1/cry1/cry2*, *hy1/cry2* y *hy1/cry1*, tras 16 horas de tratamiento con los volátiles fúngicos (+FV), era marcadamente menor que el de las plantas tipo silvestre (WT). El conjunto de estos datos es una indicación clara de que MIVOISAP está sometido a control mediado por fotorreceptores.
- 30 El experimento se repitió de nuevo con plantas de tipo silvestre, pero cultivadas durante 16 horas con luz continua roja, del rojo lejano o azul. Tal como se puede ver en la Figura 36B, estos análisis revelaron que los volátiles fúngicos (FV) indujeron un aumento del contenido de almidón en las plantas cultivadas bajo luz roja continua que era comparable al observado en las plantas cultivadas bajo luz blanca (aproximadamente 25 veces más almidón en presencia de FV que en ausencia de FV), mientras que la iluminación durante 16 horas con luz azul o del rojo lejano
- 35 provocó un aumento de solo 3 veces respecto al contenido normal de almidón. Estos datos parecen indicar que MIVOISAP está promovido, principalmente, por la forma Pfr activa.
- Ejemplo 12: Impacto de las enzimas implicadas en la degradación del almidón en el MIVOISAP de *Arabidopsis thaliana* (Ejemplo de referencia)
- 40 De las nueve proteínas similares a β -amilasas codificadas en el genoma de *Arabidopsis thaliana* (BAM1-9), solo BAM1-4 son plastidiales y tienen acceso directo al almidón. BAM1 es una enzima regulada por tiorredoxinas que degrada el almidón durante el día tanto en células mesófilas como en células guarda sometidas a choque térmico y a estrés osmótico. BAM3 es el principal determinante de la degradación del almidón de las hojas durante la noche, y
- 45 juega también un papel importante en la degradación del almidón durante el día en el caso de un choque frío. BAM4 no tiene actividad catalítica pero tiene una importante función reguladora sobre BAM1-3, modulando la degradación del almidón. Al contrario que las β -amilasas plastidiales, el papel preciso de las B-amilasas extraplastidiales y de la α -amilasa AMY3 en el metabolismo del almidón es todavía desconocido. Aunque algunos estudios han mostrado que los mutantes con alteraciones en BAM5 (que cataliza el 80-90 % de la actividad B-amilasa total) acumulan
- 50 niveles normales de almidón, estudios más recientes han demostrado que los mutantes *bam5* que carecen de la enzima pueden mostrar un fenotipo de exceso de almidón. Además, aunque se han proporcionado también evidencias de que AMY3 no se requiere para la degradación transitoria del almidón, otros autores han demostrado que los mutantes *amy3* carentes de dicha enzima acumulan más almidón que las plantas tipo silvestre.
- 55 La isoamilasa 3 (ISA3) es una enzima desramificante que participa en la degradación del almidón liberando maltodextrinas al estroma, que a continuación son sometidas a la acción de las B-amilasas plastidiales y la fosforilasa plastidial del almidón (PHS1). Los análisis del transcriptoma revelaron que los volátiles fúngicos promueven la expresión de *ISA3* (aumento de 1,72 veces). Estos análisis también revelaron un marcado aumento en la expresión de *BAM5* tras el tratamiento con volátiles fúngicos (aumento de 4,81 veces), que estuvo acompañado por un aumento de 3,1 veces de la actividad total B-amilasa ($11,8 \pm 2,1$ U/g de peso fresco y $37,0 \pm 3,2$ U/g de peso fresco en ausencia y presencia de volátiles fúngicos durante 16 horas, respectivamente). Por ello, el aumento de la actividad β -amilasa total inducida por volátiles fúngicos se puede adscribir a la regulación positiva de *BAM5*.
- 60 Se investigó si las enzimas plastidiales de la degradación del almidón y/o *BAM5* eran determinantes en MIVOISAP, midiendo el contenido de almidón en hojas de mutantes de inserción de T-DNA, *BAM4*, *BAM5* y *AMY3*, cultivados durante 16 horas bajo luz blanca. También se midió el almidón en el mutante de inserción de T-DNA *SEX1* que
- 65

carece de una enzima que catalizar la fosforilación del almidón para que éste pueda ser hidrolizado por la B-amilasa (Edner, C., et al. 2007: Plant Physiol. 145, 17- 28). Las hojas *bam5* y *amy3* no tratadas con volátiles fúngicos acumularon almidón en niveles similares a las de las plantas silvestres, mientras que las hojas *bam4* y *sex1* no tratadas acumularon más almidón que las hojas de plantas silvestres (Figura 37A). Al contrario que las hojas *amy3* y *bam5*, que acumularon niveles de almidón similares a los de las plantas tipo silvestre tras 16 horas de tratamiento con volátiles fúngicos (aproximadamente 25 veces más almidón en presencia que en ausencia de volátiles fúngicos, las hojas *bam4* y *sex1* acumularon 30-35 veces más almidón en presencia de FV que las hojas de las plantas silvestres en ausencia de tratamiento con volátiles fúngicos.

Los datos globales indican que: a) la biosíntesis del almidón y la degradación del almidón mediada por B-amilasa ocurren simultáneamente durante MIVOISAP, y b) las rutas de degradación del almidón dependientes de B-amilasa se activan con el tratamiento con volátiles fúngicos. Para confirmar esta hipótesis, los análisis de la medida de maltosa (el producto de la reacción de la B-amilasa) en plantas tipo silvestre y mutantes de inserción de T-DNA *BAM4* revelaron que, mientras que las hojas de plantas tipo silvestre tratadas con volátiles fúngicos acumulaban niveles de maltosa claramente mayores que las hojas de plantas tipo silvestre no tratadas con volátiles fúngicos, las hojas de mutantes *BAM1* y *BAM4* obtenidos por inserción de T-DNA, tanto tratadas con volátiles fúngicos como no tratadas con ellos, acumularon un contenido de maltosa similar (Figura 37B).

- Ejemplo 13: Impacto de las enzimas rédox en MIVOISAP en *Arabidopsis* (Ejemplo de referencia)

La regulación de la función de las proteínas mediante cambios en el estado rédox juega un papel importante en múltiples aspectos de la vida de la planta tales como el crecimiento, el desarrollo y la respuesta a limitaciones en el medio ambiente. La iluminación da lugar a una activación muy rápida, mediada por PHY, de las ATP-asas de la membrana plasmática que bombean protones, lo que a su vez da lugar a cambios en los potenciales de membrana, flujo de iones y estado rédox celular interno. En los cloroplastos, la actividad de numerosas enzimas está ligada al estado rédox de la cadena de transporte de electrones fotosintética. Los cloroplastos poseen dos sistemas rédox importantes que regulan independientemente el metabolismo plastidial aportando equivalentes reductores a enzimas diana. Uno está basado en tioredoxinas (Trxs) y la otra ruta está basada en un tipo peculiar de NADPH Trx reductasa denominada NTRC. Mientras que la ruta dependiente de Trx obtiene poder reductor de la ferredoxina (Fdx) reducida por la cadena de electrones fotosintética y mediada por la Trx reductasa dependiente de Fdx (FTR), NTRC utiliza NADPH como fuente de poder reductor, que se puede producir en la oscuridad a partir de G6P vía la ruta oxidativa de las pentosas fosfato (OPPP), u obtenerse en condiciones de luz a partir de Fdx reducida por medio de la Fdx-NADP reductasa. Las enzimas del ciclo de Calvin, la síntesis de ATP y la exportación de NADPH desde los cloroplastos se activan mediante la reducción de residuos de cisterna mediada por Trx, mientras que la G6P deshidrogenasa de los cloroplastos se inactiva. Las Trxs también regulan el metabolismo del almidón a través de la activación rédox postraduccional de AGP y enzimas implicadas en la degradación del almidón como SEX1 y BAM1. NTRC juega un papel importante en aportar poder reductor para detoxificar el peróxido de hidrógeno en la oscuridad, y en la regulación del estado rédox de la AGP.

Una de las alteraciones más llamativas en el transcriptoma de hojas de *Arabidopsis* tratadas con volátiles fúngicos emitidos por *Alternaria alternata* implica la activación de protón ATPasas del tipo de las localizadas en la membrana plasmática, así como la represión de las FTR y Trxs plastidiales. El primer efecto da como resultado cambios en los potenciales e membrana, flujo de iones y estado rédox celular interno, que a su vez dan lugar a una rápida acidificación del apoplasto, producción de peróxido de hidrógeno y activación de genes implicados en las respuestas defensivas. El segundo efecto da como resultado un bloqueo parcial de la conexión principal entre la luz absorbida por las clorofilas y la actividad metabólica en el plástido (el sistema Fdx/Trx), que a su vez favorece la ruta de NTRC como sistema alternativo para transferir equivalentes reductores a enzimas diana probablemente implicadas en MIVOISAP. Para comprobar esta hipótesis se midió el contenido de almidón en mutantes *ntrc* cultivados en ausencia o presencia durante 16 horas de volátiles fúngicos. Es llamativo que solo se observó un aumento de 6 veces en el contenido de almidón en los mutantes *ntrc* tratados con FV (Figura 38), lo que indica que NTRC es un determinante importante de MIVOISAP en *Arabidopsis thaliana*.

-Ejemplo 14: El impacto de las almidón sintasas en el MIVOISAP de *Arabidopsis* (Ejemplo de referencia)

Se conocen cinco clases distintas de almidón sintasas (SS) en plantas: la almidón sintasa unida al gránulo (GBSS), que es responsable de la síntesis de amilosa, y las almidón sintasas solubles de clases I, II, III y IV (SSI, SSII, SSIII y SSIV, respectivamente), que son responsables de la síntesis de amilopectina. Se ha demostrado que la eliminación de SSIV da como resultado la acumulación de un único gránulo de almidón, de gran tamaño, en los cloroplastos de *Arabidopsis*. Además, utilizando diferentes combinaciones de mutaciones de SS en entornos de mutantes en SSIII y SSIV, se ha demostrado también que los mutantes de *Arabidopsis* de inserción de T- DNA dobles *SSIII/SSIV* o triples *iSiS7/5'iS7//SSIII* crecidos de forma autotrófica acumulan niveles nulos o muy reducidos de almidón. Estos datos a) indican que tanto SSIII como SSIV juegan un papel clave en la acumulación de almidón, aunque SSIV es necesario para que se obtenga el número regular de gránulos de almidón de las plantas tipo silvestre y b) sugiere que SSIV juega un papel crucial en el proceso de iniciación del gránulo de almidón.

Los análisis de micromatriz de hojas de plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con volátiles fúngicos no revelaron

cambios en la expresión de *SSI*, *SSII*, *SSIII* y *SSIV*.

Se investigó si las SS están implicadas en MIVOSAP midiendo el contenido de almidón en hojas de mutantes homocigóticos de inserción de T-DNA en *GBSS*, *SSI*, *SSII*, *SSIII*, *SSIV*, *SSI/SSIV*, *SSII/SSIV*, *SSIII/SSIV*, *SSI/SSII/SSIII* y *SSI/SSII/SSIV*, cultivados durante 16 horas en presencia o en ausencia de volátiles fúngicos emitidos por *A. Alternata*. Estos análisis revelaron que el aumento del contenido de almidón inducido por los volátiles fúngicos en hojas de mutantes de inserción de T-DNA *GBSS*, *SSI* y *SSII* era normal cuando se comparaba con el de las hojas de tipo silvestre (20-25 veces más almidón en presencia que en ausencia de volátiles fúngicos). En contraste, el aumento de almidón en las hojas tratadas con volátiles fúngicos de mutantes de inserción de T-DNA *SSIII*, *SSIV*, *SSI/SSIV*, *SSII/SSIV*, *SSIII/SSIV*, *SSI/SSII/SSIII* y *SSI/SSII/SSIII* fue marcadamente menor que en las hojas de plantas tipo silvestre tratadas con volátiles fúngicos (Figura 38).

Los cambios muestran que a) los cambios en la expresión de los genes que codifican las SS juegan un papel menor (de jugar alguno), en MIVOISAP y b) MIVOISAP está determinado, de forma clara, por *SSIII* y *SSIV*. Se puede inferir que ciertos mecanismos postranscripcionales aún sin identificar de la regulación de *SSIII* y *SSIV* deben jugar un papel principal en MIVOISAP. A este respecto, es significativo que la *SSIII* contiene un motivo consenso de las proteínas 14-3-3 de unión de fosfoserina/treonina que participan en funciones reguladoras de la respuesta al medio ambiente regulada por fosforilación y que la actividad de las SS depende del estado redox.

-Ejemplo 15: Influencia en la acumulación de proteínas en el gránulo de almidón (Ejemplo de referencia)

Los ensayos de microscopía descritos en la solicitud de patente principal P201000499, realizados sobre plantas de *Arabidopsis thaliana* que expresaban la sintasa de almidón unida al gránulo (*GBSS*) de *Arabidopsis* fusionada con la proteína de fluorescencia verde (GFP) (Szydlowski et al., 2009: *Plant Cell* 21, 2443-2457) cultivadas en presencia y en ausencia de FV (volátiles fúngicos) emitidos por *Alternaria alternata*, demuestran que el aumento del contenido de almidón no es debido al aumento del número de gránulos por plastidio, sino a un espectacular aumento de tamaño de los gránulos de almidón.

La solicitud de patente española P201001115 describe y reivindica un procedimiento para la producción y purificación de proteínas recombinantes en plantas. Este procedimiento se basa en la producción de plantas (o células vegetales) genéticamente modificadas que expresen proteínas que se unen al gránulo de almidón fusionadas con proteínas de interés a través de una secuencia aminoacídica reconocida específicamente por una proteasa. Una vez aislados los gránulos de almidón (fácilmente aislables y purificables), éstos son tratados con la proteasa, de modo que la proteína de interés se libera. Recientemente se han publicado también unos trabajos en los que se muestra que plantas que expresan proteínas unidas al gránulo de almidón fusionadas con antígenos son capaces de inducir una respuesta inmunitaria en ratones que se alimentan con el almidón de esas plantas.

Con estos antecedentes, se ve que el aumento de la cantidad total de proteína asociada al almidón puede constituir una ventaja de por sí o, además, puede suponer una manera potencial de aumentar los rendimientos y eficiencia de los procedimientos de purificación de proteínas recombinantes asociadas a gránulos de almidón. También constituye una manera de aumentar la cantidad de antígeno en plantas que actúan como vacunas orales, de modo que, presumiblemente, la respuesta del sistema inmune será más fuerte cuando el individuo consuma almidón-vacuna de plantas tratadas con volátiles microbianos que cuando consuma almidón-vacuna de plantas no tratadas con volátiles microbianos.

Por ello, se comprobó si el aumento del tamaño de los gránulos de almidón iba acompañado de un aumento de la cantidad total de proteína asociada al almidón, utilizando para ello plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con la sintasa de almidón unida al gránulo (*GBSS*) de *Arabidopsis* fusionada con la proteína de fluorescencia verde (GFP) (Szydlowski et al., 2009: *Plant Cell* 21, 2443-2457) cultivadas en presencia y en ausencia de FV (volátiles fúngicos) emitidos por *Alternaria alternata*. Las plantas se cultivaron durante 16 horas bajo luz blanca, se extrajeron las proteínas totales de las plantas y se comprobó la presencia de GFP, asociada a *GBSS* mediante ensayos sobre transferencias tipo Western.

Los resultados, que se muestran en la Figura 39, confirman que existe un aumento de la cantidad de proteínas asociadas a los gránulos de almidón cuando las plantas se cultivan en presencia de volátiles microbianos: el extracto de almidón procedente de plantas tratadas con volátiles fúngicos acumula más *GBSS*-GFP que el extracto procedente de una misma cantidad de plantas no tratadas con volátiles fúngicos. De esta manera, el cultivo de plantas en presencia de volátiles microbianos puede servir para aumentar la producción de proteínas que formen proteínas de fusión con proteínas asociadas al gránulo de almidón, como *GBSS*, aumentando el rendimiento obtenido por planta.

- Ejemplo 16: Plásmidos útiles para la preparación de plantas transgénicas con capacidad aumentada de acumulación de almidón (Ejemplo de referencia)

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 aumentara 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/Zero, 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 Figura 40B (nitrito reductasa en antisentido) y 40C (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 (Figura 40A). 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.

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:67), nitrito reductasa en antisentido (SEQ ID NO:69) y cisteína sintasa en antisentido (SEQ ID NO:71). Los cebadores específicos utilizados en cada caso fueron los siguientes:

- Inhibidor de proteasa:
proteína inh attB1 (SEQ ID NO:73):

5'-

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGAGTCAAAGTGTGCTC

55 ACATC-3'

proteína inh attB2 (SEQ ID NO:74):

5'-

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTAACCAACCACAGGAATCT

GTAC-3'

- Nitrito reductasa:
- Nitrito reductasa attB1 (SEQ ID NO:75):

5

5'-

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTATTAATCTTCTGTTTCTTCTC

TTTCTC-3'

- Nitrito reductasa attB2 (SEQ ID NO:76):

5'-

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAATGGCATCTTTTTTCTATCAA

10

ATTTTTG-3'

- Cisteína sintasa:
- pCys sintasa attBI (SEQ ID NO:77):

5'-

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTATCACAATTCTGGCTTCATT

15

TTCTC-3'

- pCys sintasa attB2 (SEQ ID NO:78):

5'-

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAATGGCATCTTTCATCAACAA

20

TCC-3

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

25 De esta forma, se amplificaron las secuencias bicatenarias representadas por SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:69 y SEQ ID NO:71. Las secuencias que codifican para la nitrito reductasa y la cisteína sintasa (SEQ ID NO:69 y SEQ ID NO:71, respectivamente), presentaban en su extremo 5' una secuencia attB2 y en su extremo 3' una secuencia attBI, mientras que la secuencia que codifica para el inhibidor de proteasas presentaba en su extremo 5' una secuencia attBI y en su extremo 3' una secuencia attB2. 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. Pag. 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 la selección de las bacterias transformadas con este vector. La incubación de las secuencias bicatenarias representadas por °SEQ IDNO:67, SEQ ID NO:69 o SEQ ID NO:71, flanqueadas por las correspondientes secuencias attB, con dicho vector pDON/Zeo, en presencia de la BP Clonasa® de Invitrogen, siguiendo las indicaciones del fabricante (pag. 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 *ccdQ* (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.

45

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 fusión genes for plant transformation. J. Biosci. Bioeng. 104(1): 34-41), que contiene las secuencias de recombinación attRI y attR2, que permiten la inserción entre las mismas de un fragmento flanqueado por secuencias attLI 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 attRI 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 attRI y attR2., regenerándose las secuencias attBI 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 cisterna sintasa, lo que permitiría utilizar dichas plantas para obtener un aumento en la acumulación de almidón.

- Ejemplo 17: Efecto del suministro de volátiles microbianos en el agua de riego

Para comprobar si el agua de riego podía ser un medio válido para suministrar a las plantas mezclas de volátiles microbianos, dando lugar a los efectos deseados de aumento del crecimiento e aumento de la cantidad de almidón acumulada, se llevó a cabo un ensayo con plantas de pimiento.

Para obtener los volátiles, el hongo *Alternaria alternata* se cultivó en medio MS sólido suplementado con sacarosa 90 mM. Tras formarse un gran micelo, éste fue transferido a un medio MS líquido sin sacarosa, donde permaneció durante un par de días. Este medio se filtró y se utilizó para regar la planta, denominándosele "medio de cultivo".

Las plantas de pimiento fueron cultivadas en cajas de plástico de 25 litros. Las plantas se regaron cada 4 días: las plantas control fueron regadas con agua, mientras que las plantas en ensayo se regaron con el medio líquido obtenido del cultivo de *Alternaria alternata*. Se tomaron fotos de las plantas cuando las mismas tenían 3 semanas de edad (21 días) o 45 días de edad.

Los resultados pueden observarse en la Figura 41. Los paneles A y B corresponden a plantas de 3 semanas de edad, mientras que las plantas de los paneles C y D tienen 45 días de edad. Se puede apreciar que las diferencias de tamaño entre plantas regadas con medio de cultivo con agua son muy notables. El panel C muestra además que el riego con medio de cultivo de *A. Alternata* conlleva la formación de raíces adventicias que garantizan un mejor crecimiento de la planta. En la última de las fotografías puede apreciarse una planta regada con agua, pero cultivada durante 2 semanas al lado de un recipiente que contenía "medio de cultivo" de *A. alternata* filtrado. Los resultados obtenidos con el mismo, que son reproducibles, permiten concluir que parte del efecto promotor del crecimiento del "medio de cultivo" de *A. alternata* es debido a compuestos volátiles existentes en el citado medio. Es decir: regando con "medio de cultivo" filtrado de *A. alternata* se pueden aportar volátiles que promueven el crecimiento de la planta.

Adicionalmente, se realizaron ensayos para comprobar la acumulación de almidón en estas plantas. Los resultados se muestran en la Figura 42, en la que puede apreciarse que tanto las plantas regadas con "medio de cultivo" de *A. alternata* como las plantas que crecieron en atmósfera en la que estaban presentes los volátiles evaporados del mismo mostraban un aumento significativo del almidón acumulado respecto a las plantas control.

Estos ensayos demuestran la validez de aportar mezclas de volátiles microbianos en el agua de riego para provocar un aumento del crecimiento y un aumento del almidón acumulado en las plantas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> IDEN BIOTECHNOLOGY, S.L.

<120> MÉTODO PARA CAMBIAR EL PATRÓN DE DESARROLLO, AUMENTAR EL CRECIMIENTO Y LA ACUMULACIÓN DE ALMIDÓN, CAMBIAR LA ESTRUCTURA DEL ALMIDÓN Y AUMENTAR

LA RESISTENCIA AL ESTRÉS HÍDRICO EN PLANTAS

<130> CO-35295

ES 2 651 097 T3

<150> ES201000499
<151> 2010-04-19
5 <150> ES201001068
<151> 2010-08-13

<150>
<151>

10 <160> 78

<170> Patent In versión 3.3

<210> 1
15 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Cebador directo de RT-PCT para SNF4

<400> 1

ccccgtagat ctcagaagca
20

25 <210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Cebador inverso de RT-PCT para SNF4

<400> 2

35 cagcgtggct gtatatggaa
20

<210> 3
40 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Cebador directo de RT-PCT para 1-fosfatidilinositol-4-fosfato
5-quinasa

<400> 3

acacaagaag tggggaatgg
20

50 <210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Cebador inverso de RT-PCT para 1-fosfatidilinositol-4-fosfato
5-quinasa

60 <400> 4
ttttctgctg ccttctagc 20

<210> 5

ES 2 651 097 T3

<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Cebador directo de RT-PCT para pululanasa

<400> 5

10 **gcgtaaaca taccgccagt**
20

<210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador inverso de RT-PCT para pululanasa

20 <400> 6

caggtcaaac cgaaatccat
20

<210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Cebador directo de RT-PCT para el translocador triosa-fosfato/
3-fosfolgicerato

30 <400> 7

caagatttcc cccattgcta
20

35 <210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Cebador directo de RT-PCT para el translocador triosa-fosfato /
3-fosfoglicerato

45 <400> 8

ttccaaccgc atgtgtaaga
20

50 <210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Cebador directo de RT-PCT para transportador de nitrito

<400> 9

60 **caaatacctc cagccagcat**
20

<210> 10

ES 2 651 097 T3

<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Cebador inverso de RT-PCT para transportador de nitrito

<400> 10

10 **tgtgaatcga cgagcaaaag**
20

<210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador directo de RT-PCT para trehalosa-6-fosfato sintasa

20 <400> 11

cgattttcag tggatgcaga
20

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Cebador inverso de RT-PCT para trehalosa-6-fosfato sintasa

30 <400> 12

gatgatgccca aacaagagca
20

35 <210> 13
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Cebador directo de RT-PCT para almidón fosforilasa (forma plastidial)

45 <400> 13

aaccaagtgg acaggatctg a
21

<210> 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Cebador inverso de RT-PCT para almidón fosforilasa (forma plastidial)

55 <400> 14

cttttgcctt cctccactca
20

60

ES 2 651 097 T3

5 <210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

10 <400> 15
gaggtaacac gaggcttcca
20

15 <210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de RT-PCT para beta-amilasa BMYI

20 <400> 16
cacaactgca acctctgcat
20

25 <210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Cebador directo de RT-PCT para tiorredoxina M4

<400> 17
aagttaccgc tcctggttga
20

35 <210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

45 <400> 18
acttgccagc gtattcctgt
20

50 <210> 19
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

55 <400> 19
tgcagacatt ggattcatgg 20

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

ES 2 651 097 T3

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

5 <400> 20

ctcccaaag tgaatcactc c
21

10 <210> 21
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador directo de RT-PCT para cisteína sintasa

<400> 21

tgcctgcatc aatgagtctt
20

20 <210> 22
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Cebador inverso de RT-PCT para cisteína sintasa

<400> 22

30 <210> 23
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

cagcctttga aacagctcct
20

35 <220>
<223> Cebador directo de RT-PCT para pirofosfatasa inorgánica

40 <400> 23

acagcccgaa accctagatt
20

45 <210> 24
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Cebador inverso de RT-PCT para pirofosfatasa inorgánica

<400> 24

tgaaaacacc atcaccctaaa
20

55 <210> 25
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>

ES 2 651 097 T3

<223> Cebador directo de RT-PCT para invertasa ácida

<400> 25

5

aatggagcag cagactctt
20

<210> 26

<211> 20

<212> ADN

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso de RT-PCT para invertasa ácida

15

<400> 26

agtcttgcaa ggggaaggat
20

<210> 27

20

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Cebador directo de RT-PCT para glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
(forma plastidial)

<400> 27

30

cgaggagggt actttgacca
20

<210> 28

<211> 20

<212> ADN

35

<213> Secuencia artificial

<220>

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

40

<400> 28

caagctgaca ggtgtttcca
20

45

<210> 29

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50

<220>

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

<400> 29

55

cgaaaggggtg cgtatatggt
20

<210> 30

<211> 20

<212> ADN

60

<213> Secuencia artificial

ES 2 651 097 T3

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

5 <400> 30
tccggactaa atccaccttg
20

<210> 31
<211> 20
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

15 <400> 31
caagagggca atggatgagt
20

20 <210> 32
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Cebador inverso de RT-PCT para inositol-3-fosfato sintasa

<400> 32
attggagcag ccaaaagaga
30 20

<210> 33
<211> 20
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

40 <400> 33
tgggacagat ggcactatca
20

<210> 34
45 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

50 <400> 34
atccgggaca attacttcca
20

55 <210> 35
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Cebador directo de RT-PCT para ARN 18S

ES 2 651 097 T3

<400> 35
5
gggcattcgt atttcatagt cagag
25
<210> 36
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
10
<220>
<223> Cebador inverso de RT-PCT para ARN 18S
15
<400> 36
cggttcttga ttaatgaaaa catcct
26
<210> 37
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
20
<220>
<223> Cebador directo de RT-PCT para translocador de
25
glucosa-6-fosfato
<400> 37
tgactggaga tggatgtgga
30
20
<210> 38
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
35
<220>
<223> Cebador inverso de RT-PCT para translocador de
glucosa-6-fosfato
40
<400> 38
gatgggaatt gcagctagga
20
45
<210> 39
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
50
<220>
<223> Cebador directo de RT-PCT para inhibidor de proteasa I
<400> 39
tgaaactctc atggcacgaa
55
20
<210> 40
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
60
<220>

ES 2 651 097 T3

<223> Cebador inverso de RT-PCT para inhibidor de proteasa I

<400> 40

5 **tggccagctt agttttccat**
20

<210> 41

<211> 19

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo de RT-PCT para la enzima ramificadora de alfa-glucano

15 <400> 41

aatttggtgg ccatggaag
19

20 <210> 42

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Cebador inverso de RT-PCT para la enzima ramificadora de alfa-glucano

30 <400> 42

aggaatttgg acgaccattg
20

<210> 43

<211> 21

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

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

40 <400> 43

caggtgaggc taagttgaag g
21

45 <210> 44

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50 <220>

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

<400> 44

55 **gagggggaaa agacgagttc**
20

<210> 45

<211> 20

<212> ADN

60 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 651 097 T3

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

<400> 45

5 **ggtgaaagat cgcgcttaga**
20

<210> 46

<211> 20

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

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

15 <400> 46

ctgctaacag ggaggcaatc
20

<210> 47

20 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Cebador directo de RT-PCT para el inhibidor de invertasa
de tubérculo tipo Kunitz

<400> 47

aaaccttcaa tgcccaaatg
20

30

<210> 48

<211> 20

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso de RT-PCT para el inhibidor de invertasa
de tubérculo tipo Kunitz

40

<400> 48

attccgactc cgacttacga
20

45

<210> 49

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Cebador directo de RT-PCT para sacarosa sintasa 4

<400> 49

tgggaataca tccgtgtgaa
20

55

<210> 50

<211> 20

<212> ADN

60 <213> Secuencia artificial

ES 2 651 097 T3

<220>
<223> Cebador inverso de RT-PCT para sacarosa sintasa 4

5 <400> 50

gctccgtcga caagttcttc
20

<210> 51
<211> 20
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de RT-PCT para la chaperona Hsc70 tipo Dnak

15 <400> 51

tgcaagctgc aatcttgagt
20

20 <210> 52
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Cebador inverso de RT-PCT para la chaperona Hsc70 tipo Dnak

30 <400> 52

acacctccag cagtctccag
20

<210> 53
<211> 20
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de RT-PCT para almidón sintasa IV

40 <400> 53

catcgtctct tgccgcta
20

45 <210> 54
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Cebador inverso de RT-PCT para almidón sintasa IV

<400> 54

atggccttac tgctgacgtt
20

55 <210> 55
<211> 20
<212> ADN
60 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 651 097 T3

<223> Cebador directo de RT-PCT para la proteína RSH4
Tipo Real-SpoT

<400> 55

5

acaagggcgg tgttactgat
20

<210> 56

<211> 20

10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso de RT-PCT para la proteína RSH4

Tipo Real-SpoT

15

<400> 56

tcgccgaagg aaaatctcta
20

20

<210> 57

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

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

<400> 57

30

gaaccatctt tggcgtatgg
20

<210> 58

<211> 20

35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso de RT-PCT para sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa

40

<400> 58

catatgtagt tcgcggtcca
20

45

<210> 59

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

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

50

<400> 59

ggaaaggat tttggcagca
20

55

<210> 60

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

60

ES 2 651 097 T3

<220>
<223> Cebador inverso de RT-PCT para fructosa-bisfosfato aldolasa

<400> 60

5

g t t g a c g a a g t g c t t g a c g a
20

<210> 61
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Cebador directo de RT-PCT para fructosa-1,6-bisfosfatasa
de cloroplasto

15

<400> 61

t t c g a t g g c t t g t a a g c a g a
20

20

<210> 62
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Cebador inverso de RT-PCT para fructosa-1,6-bisfosfatasa
de cloroplasto

30

<400> 62

t t t t g g t c c t c t c c a t g a g c
20

35

<210> 63
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de RT-PCT para fructosa-1,6-bisfosfatasa citosólica

40

<400> 63

t a t c c c g c t g a t g g t t c t t c
20

45

<210> 64
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<223> Cebador inverso de RT-PCT para fructosa-1,6-bisfosfatasa citosólica

<400> 64

55

c t c c g g g g t a c a a g a a g a t g
20

60

<210> 65
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 651 097 T3

<220>

<223> Cebador directo de RT-PCT para gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (isoforma plastidial)

5

<400> 65

cacaccgtga cttgaggaga
20

10

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

15

<220>
<223> Cebador inverso de RT-PCT para gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (isoforma plastidial)

20

<400> 66

cccttgagct gaggtagcac
20

25

<210> 67
<211> 324
<212> ADN
<213> Solanum tuberosum

30

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)
<223> Secuencia que codifica el inhibidor de la proteasa de patata

<400> 67

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
tcc ttt gaa act ctc atg gca caa aaa gaa agt gat gga cta gaa gcc 96

15

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
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
Glu Leu Ile Gly Val Pro Thr Lys Leu Ala Lys Gly Ile Ile Glu Lys
50 55 60

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

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

35

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

324

<210> 68

ES 2 651 097 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

15

ES 2 651 097 T3

210					215					220						
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	
ccg	gca	ggt	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		
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			
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					285				
ttc	ttc	agt	gcc	aaa	cga	tgt	gat	gag	gca	att	cct	ctt	gat	gca	tg	912
Phe	Phe	Ser	Ala	Lys	Arg	Cys	Asp	Glu	Ala	Ile	Pro	Leu	Asp	Ala	Trp	
	290					295					300					
ggt	cca	gct	gat	gat	ggt	ggt	ccg	ggt	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					315					320	
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						335		
tgg	tta	atc	gat	gaa	ctg	ggt	gta	gaa	gga	ttc	agg	gca	gag	ggt	gaa	1056
Trp	Leu	Ile	Asp	Glu	Leu	Gly	Val	Glu	Gly	Phe	Arg	Ala	Glu	Val	Glu	
			340				345						350			
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					365				
ggt	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					
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	
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		
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		
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				
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					
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	

ES 2 651 097 T3

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

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

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

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

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

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

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
- <211> 587
- <212> PRT
- <213> Solanum tuberosum
- <400> 70

5

ES 2 651 097 T3

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

Thr Arg Phe Ser Lys Ser Thr Ile Val Lys Leu Asn Ala Thr Pro Pro
20 25 30

Gln Thr Val Ala Ala Val Gly Pro Pro Glu Val Ala Ala Glu Arg Leu
35 40 45

Glu Pro Arg Val Glu Glu Lys Asp Gly Tyr Trp Ile Gln Lys Glu Gln
50 55 60

Phe Arg Gln Gly Ile Asn Pro Gln Glu Lys Val Lys Ile Glu Lys Glu
65 70 75 80

Pro Met Lys Leu Phe Met Glu Asn Gly Ile Glu Glu Leu Ala Lys Ile
85 90 95

Pro Ile Glu Glu Ile Asp Gln Ser Lys Leu Thr Lys Asp Asp Ile Asp
100 105 110

Val Arg Leu Lys Trp Leu Gly Leu Phe His Arg Arg Lys Asn Gln Tyr
115 120 125

Gly Arg Phe Met Met Arg Leu Lys Leu Pro Asn Gly Val Thr Thr Ser
130 135 140

Ala Gln Thr Arg Tyr Leu Ala Ser Val Ile Arg Lys Tyr Gly Glu Glu
145 150 155 160

ES 2 651 097 T3

Gly Cys Ala Asp Ile Thr Thr Arg Gln Asn Trp Gln Ile Arg Gly Val
165 170 175

Val Leu Pro Asp Val Pro Glu Ile Leu Lys Gly Leu Glu Glu Val Gly
180 185 190

Leu Thr Ser Leu Gln Ser Gly Met Asp Asn Val Arg Asn Pro Val Gly
195 200 205

Asn Pro Leu Ala Gly Ile Asp Pro Glu Glu Ile Val Asp Thr Arg Pro
210 215 220

Tyr Thr Asn Leu Leu Ser Gln Phe Ile Thr Gly Asn Ser Arg Gly Asn
225 230 235 240

Pro Ala Val Ser Asn Leu Pro Arg Lys Trp Asn Pro Cys Val Val Gly
245 250 255

Ser His Asp Leu Tyr Glu His Pro His Ile Asn Asp Leu Ala Tyr Met
260 265 270

Pro Ala Ile Lys Asp Gly Arg Phe Gly Phe Asn Leu Leu Val Gly Gly
275 280 285

Phe Phe Ser Ala Lys Arg Cys Asp Glu Ala Ile Pro Leu Asp Ala Trp
290 295 300

Val Pro Ala Asp Asp Val Val Pro Val Cys Lys Ala Ile Leu Glu Ala
305 310 315 320

Phe Arg Asp Leu Gly Phe Arg Gly Asn Arg Gln Lys Cys Arg Met Met
325 330 335

Trp Leu Ile Asp Glu Leu Gly Val Glu Gly Phe Arg Ala Glu Val Glu
340 345 350

Lys Arg Met Pro Gln Gln Glu Leu Glu Arg Ala Ser Pro Glu Asp Leu
355 360 365

Val Gln Lys Gln Trp Glu Arg Arg Asp Tyr Leu Gly Val His Pro Gln
370 375 380

Lys Gln Glu Gly Tyr Ser Phe Ile Gly Leu His Ile Pro Val Gly Arg
385 390 395 400

Val Gln Ala Asp Asp Met Asp Asp Leu Ala Arg Leu Ala Asp Glu Tyr
405 410 415

Gly Ser Gly Glu Leu Arg Leu Thr Val Glu Gln Asn Ile Ile Ile Pro
420 425 430

Asn Ile Glu Asn Ser Lys Ile Glu Ala Leu Leu Lys Glu Pro Ile Leu
435 440 445

Ser Lys Phe Ser Pro Asp Pro Pro Ile Leu Met Lys Gly Leu Val Ala
450 455 460

Cys Thr Gly Asn Gln Phe Cys Gly Gln Ala Ile Ile Glu Thr Lys Ala
465 470 475 480

Arg Ser Leu Lys Ile Thr Glu Glu Val Gln Arg Gln Val Ser Leu Thr
485 490 495

Arg Pro Val Arg Met His Trp Thr Gly Cys Pro Asn Thr Cys Ala Gln
500 505 510

ES 2 651 097 T3

Val Gln Val Ala Asp Ile Gly Phe Met Gly Cys Leu Thr Arg Asp Lys
 515 520 525

Asp Lys Lys Thr Val Glu Gly Ala Asp Val Phe Leu Gly Gly Arg Ile
 530 535 540

Gly Ser Asp Ser His Leu Gly Glu Val Tyr Lys Lys Ala Val Pro Cys
 545 550 555 560

Asp Glu Leu Val Pro Leu Ile Val Asp Leu Leu Val Asn Asn Phe Gly
 565 570 575

Ala Val Pro Arg Glu Arg Glu Glu Thr Glu Asp
 580 585

- <210> 71
- <211> 1161
- 5 <212> ADN
- <213> Solanum tuberosum

- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (1)..(1161)
- <223> Secuencia que codifica la cisteina sintasa de patata

- <400> 71

ES 2 651 097 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

ccg ggg aag act gtt cta gtt gag cct aca agt gga aac aca ggc att 432
 Pro Gly Lys Thr Val Leu Val Glu Pro Thr Ser Gly Asn Thr Gly Ile
 130 135 140

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

<210> 72
<211> 386
<212> PRT
5 <213> Solanum tuberosum

<400> 72

ES 2 651 097 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Lys Glu Gln Asn Pro Asn Ile Lys Ile Ile Gly Val Glu Pro Thr
260 265 270

Glu Ser Asn Val Leu Ser Gly Gly Lys Pro Gly Pro His Lys Ile Gln
275 280 285

Gly Ile Gly Ala Gly Phe Ile Pro Gly Asn Leu Asp Gln Asp Val Met
290 295 300

Asp Glu Val Ile Glu Ile Ser Ser Asp Glu Ala Val Glu Thr Ala Lys
305 310 315 320

ES 2 651 097 T3

Gln Leu Ala Leu Gln Glu Gly Leu Leu Val Gly Ile Ser Ser Gly Ala
 325 330 335

Ala Ala Leu Ala Ala Ile Gln Val Gly Lys Arg Pro Glu Asn Ala Gly
 340 345 350

Lys Leu Ile Gly Val Val Phe Pro Ser Tyr Gly Glu Arg Tyr Leu Ser
 355 360 365

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

Glu Leu
 385

- 5 <210> 73
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> Cebador de PCR para el inhibidor de proteasa de patata
- 15 <220>
 <221> característica_misc.
 <222> (1) .. (29)
 <223> secuencia attB1
- 20 <220>
 <221> característica_misc.
 <222> (32)..(55)
 <223> secuencia complementaria al gen del inhibidor de proteasa de patata
- 25 <400> 73
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt aatggagtca aagtgtgctc acatc 55
- 30 <210> 74
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
 <223> Cebador de PCR para el inhibidor de proteasa de patata
- 40 <220>
 <221> característica_misc.
 <222> (1) .. (29)
 <223> secuencia attB2
- 45 <220>
 <221> característica_misc.
 <222> (31)..(54)
 <223> secuencia complementaria al gen del inhibidor de proteasa de patata
- 50 <400> 74
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggta ttaaccaacc acaggaatct gtac 54
- 55 <210> 75
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 60 <220>
 <223> Cebador de PCR para la nitrito reductasa de patata

5 <220>
 <221> característica_misc.
 <222> (1) .. (29)
 <223> secuencia attB1

10 <220>
 <221> característica_misc.
 <222> (32)..(57)
 <223> secuencia complementaria al gen de la nitrito reductasa de patata

15 <400> 75
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt attaacttc ttgtttctct ctttctc 57

20 <210> 76
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Cebador de PCR para la nitrito reductasa de patata

30 <220>
 <221> característica_misc.
 <222> (1) .. (29)
 <223> secuencia attB2

35 <220>
 <221> característica_misc.
 <222> (31)..(57)
 <223> secuencia complementaria al gen de la nitrito reductasa de patata

40 <400> 76
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggta atggcatctt ttctatcaa attttg 57

45 <210> 77
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Cebador de PCR para la cisteína sintasa de patata

55 <220>
 <221> característica_misc.
 <222> (1) .. (29)
 <223> secuencia attB1

60 <220>
 <221> característica_misc.
 <222> (32)..(55)
 <223> secuencia complementaria al gen de la cisteína sintasa de patata

65 <400> 77
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt atcacaattc tggcttcatt ttctc 55

70 <210> 78
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

75 <220>
 <223> Cebador de PCR para la nitrito reductasa de patata

80 <220>
 <221> característica_misc.

ES 2 651 097 T3

<222> (1) .. (29)

<223> secuencia attB2

<220>

5 <221> característica_misc.

<222> (31)..(53)

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

<400> 78

10 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggta atggcatctt tcatcaacaa tcc 53

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para aumentar la resistencia al estrés hídrico en una planta en el que la planta se cultiva en presencia de un cultivo de un microorganismo que produce compuestos volátiles, sin que exista ningún contacto entre la planta y el microorganismo, o en presencia de los volátiles emitidos por el microorganismo, en el que el crecimiento del microorganismo se produce en un medio que carece de aminoácidos y proteínas.

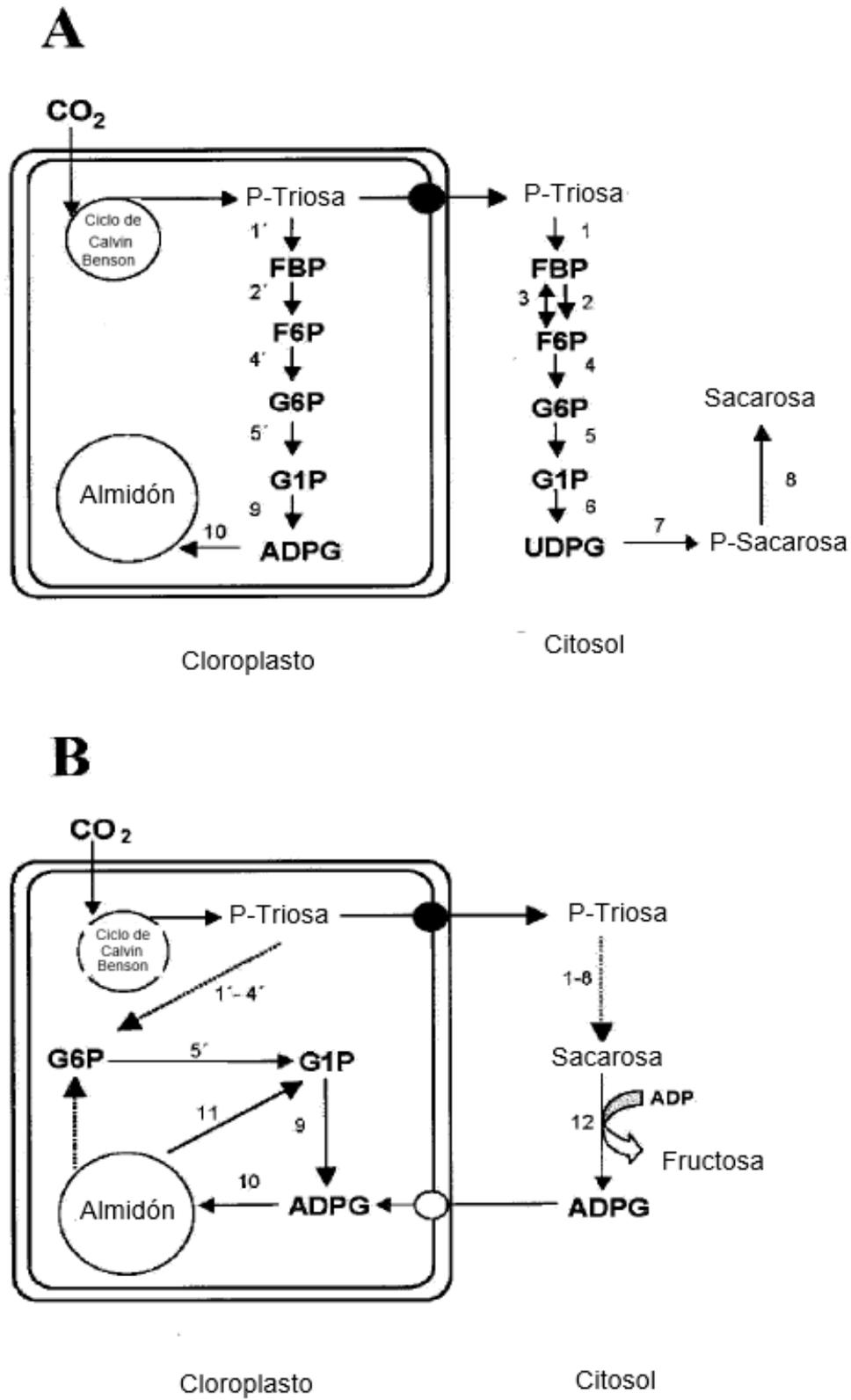


Fig. 1

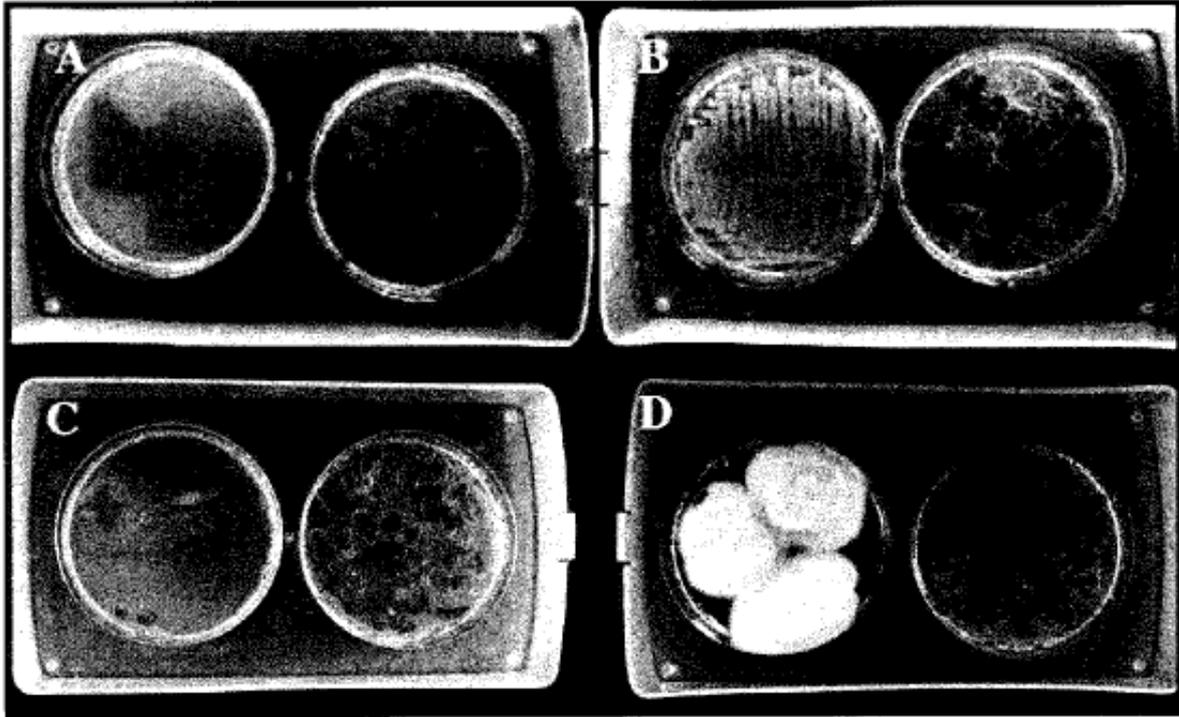


Fig. 2

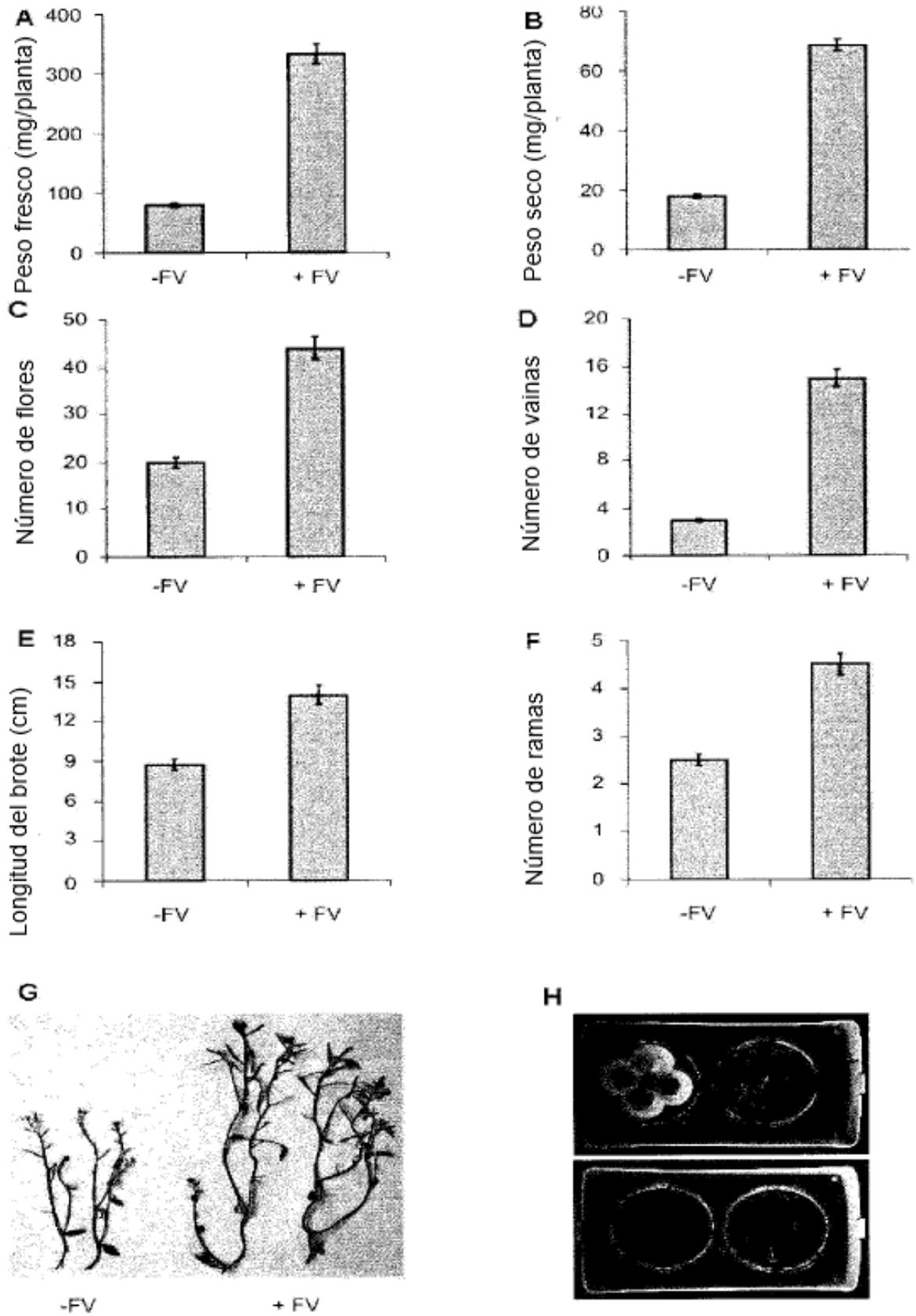


Fig. 3

4/45

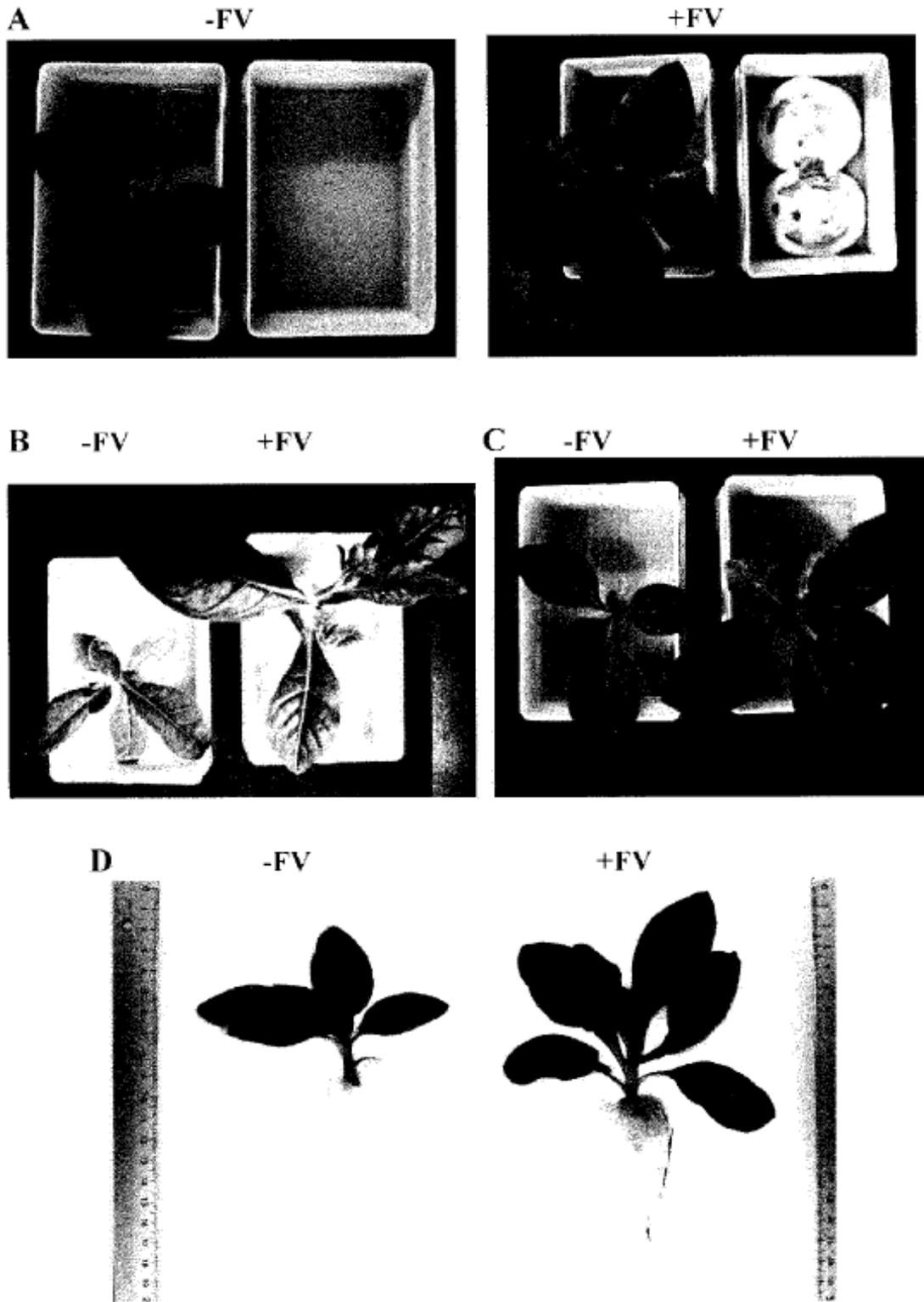


Fig. 4

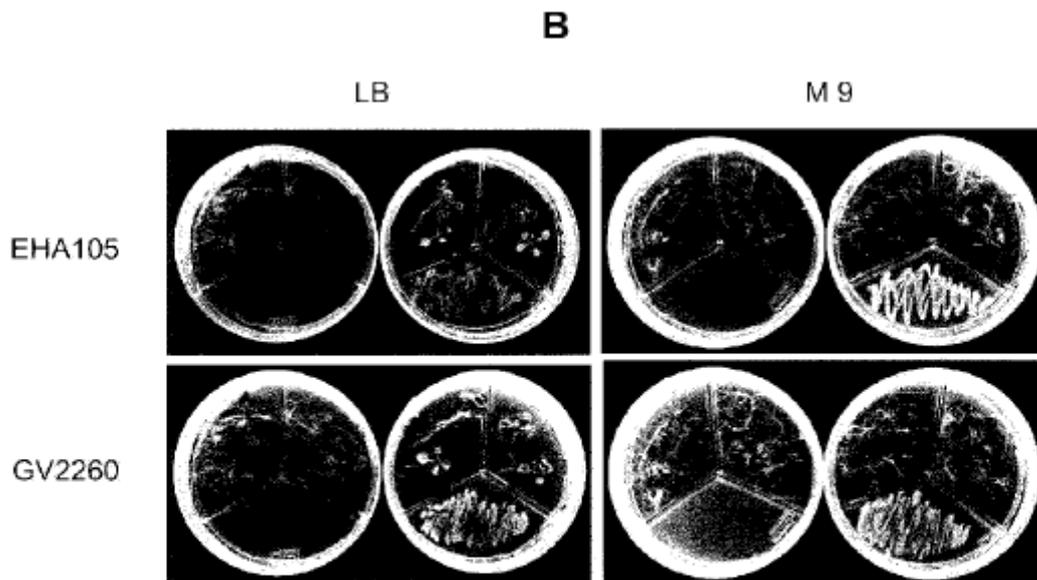
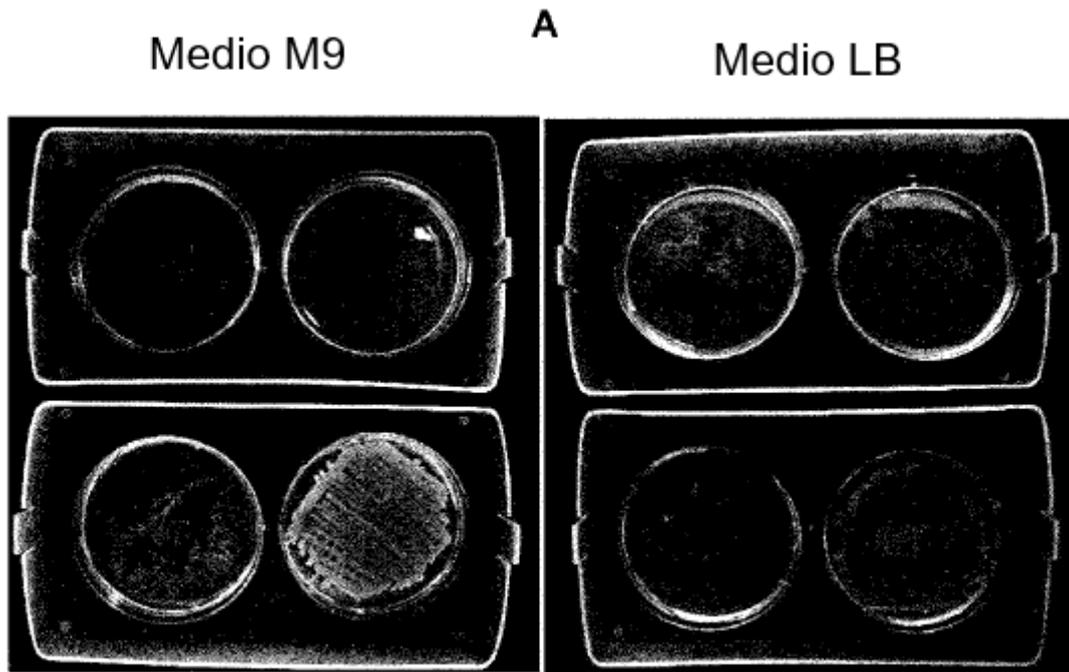


Fig. 5

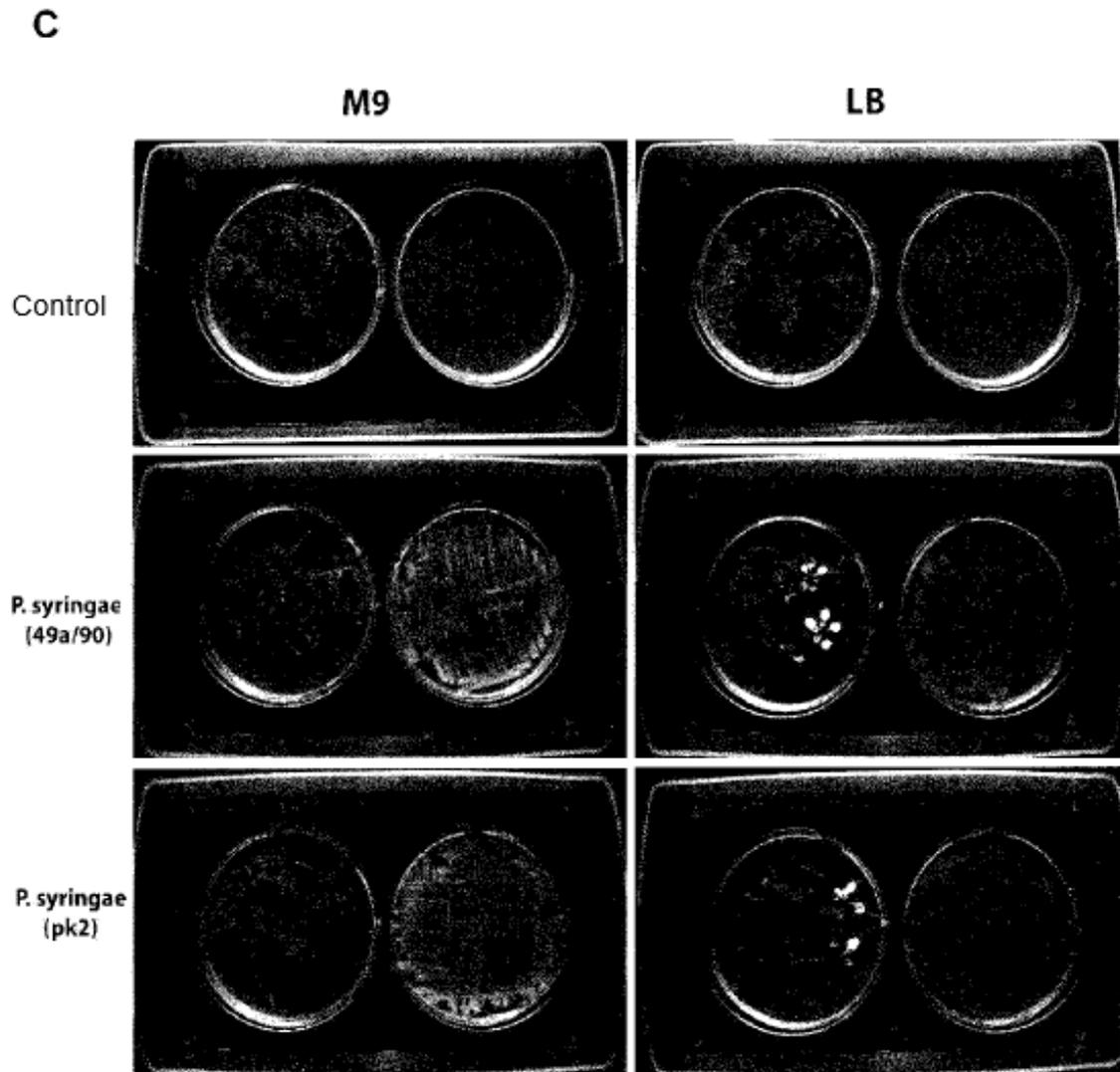


Fig. 5 (cont.)

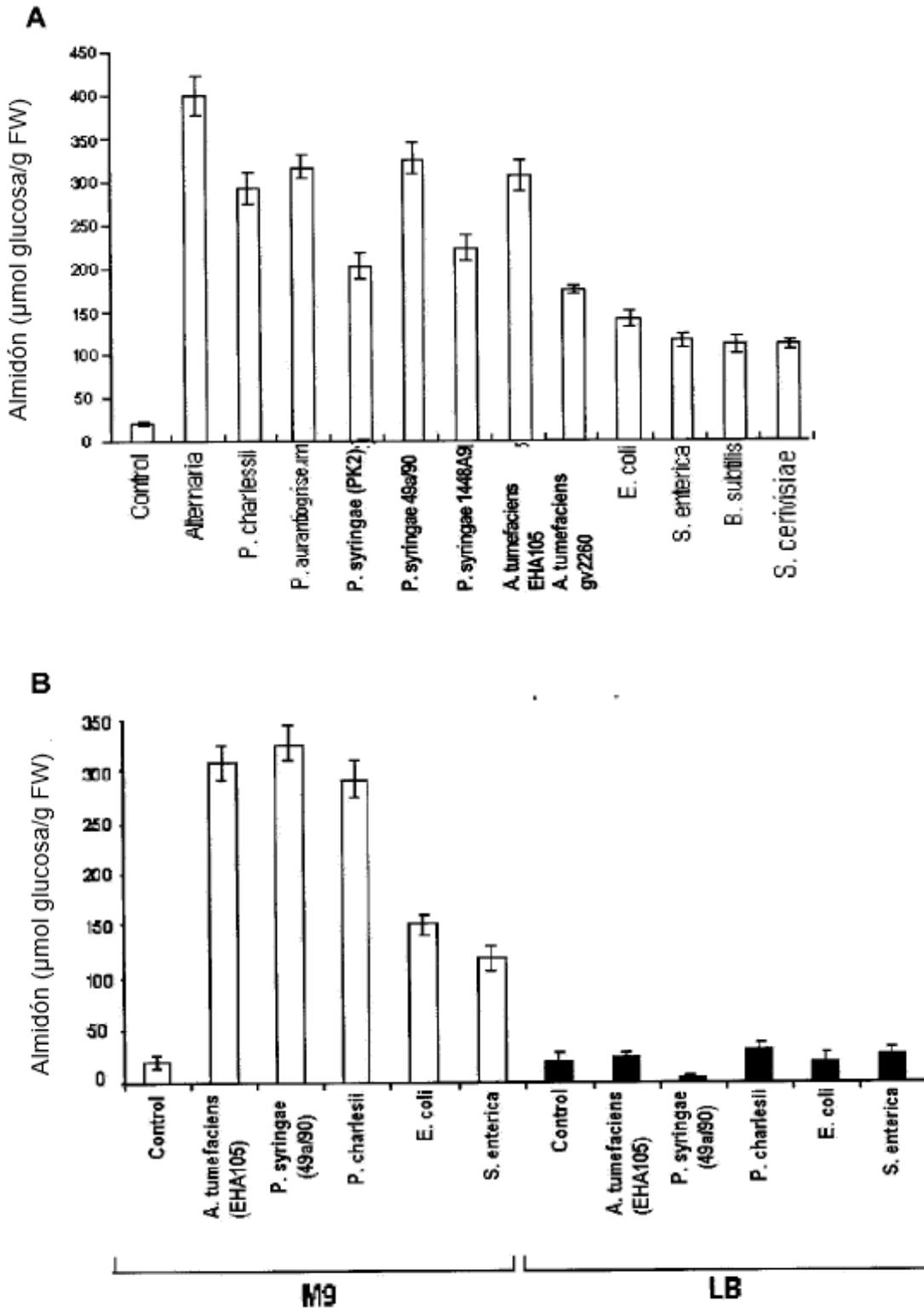


Fig. 6

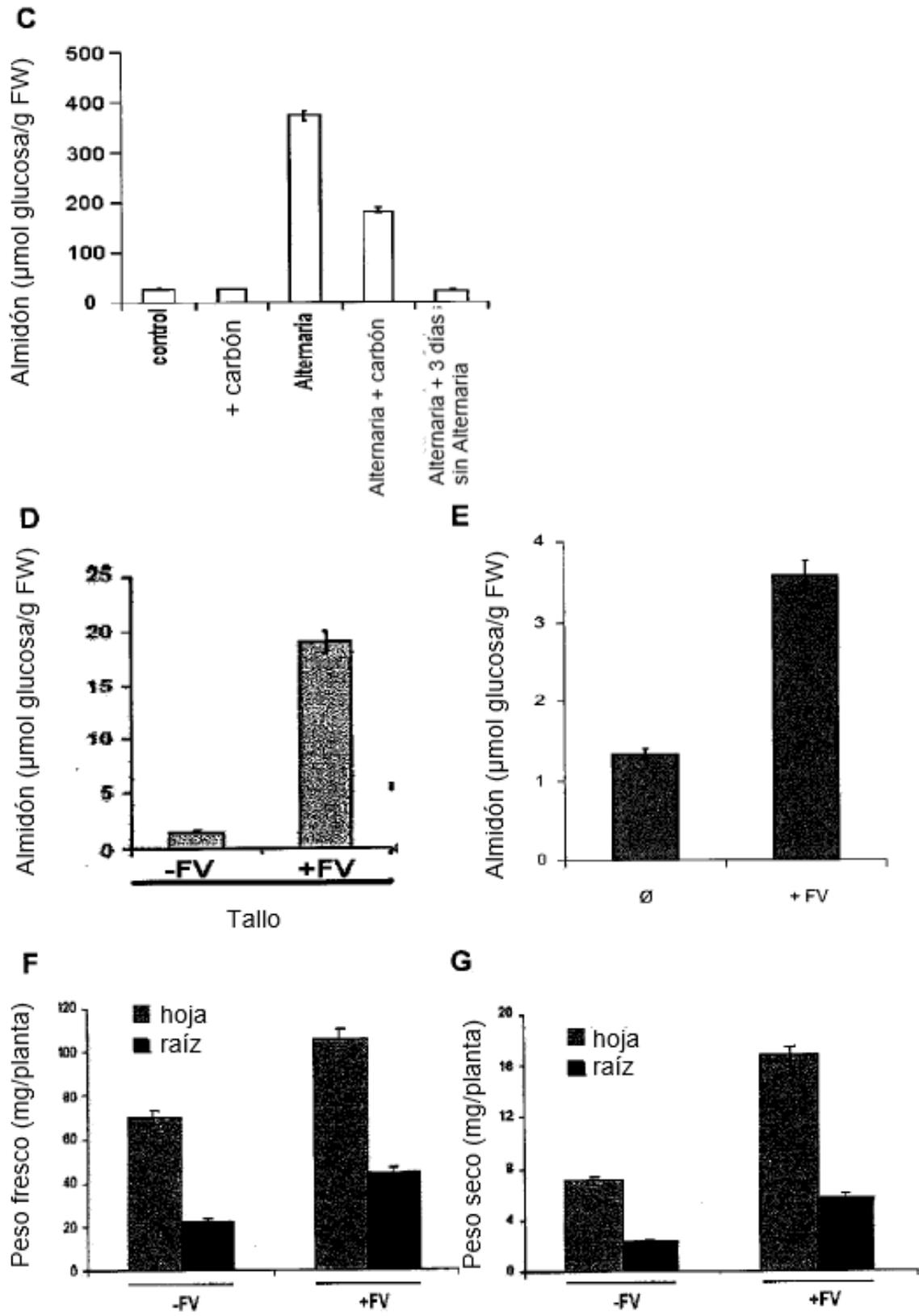


Fig. 6 (Cont.)

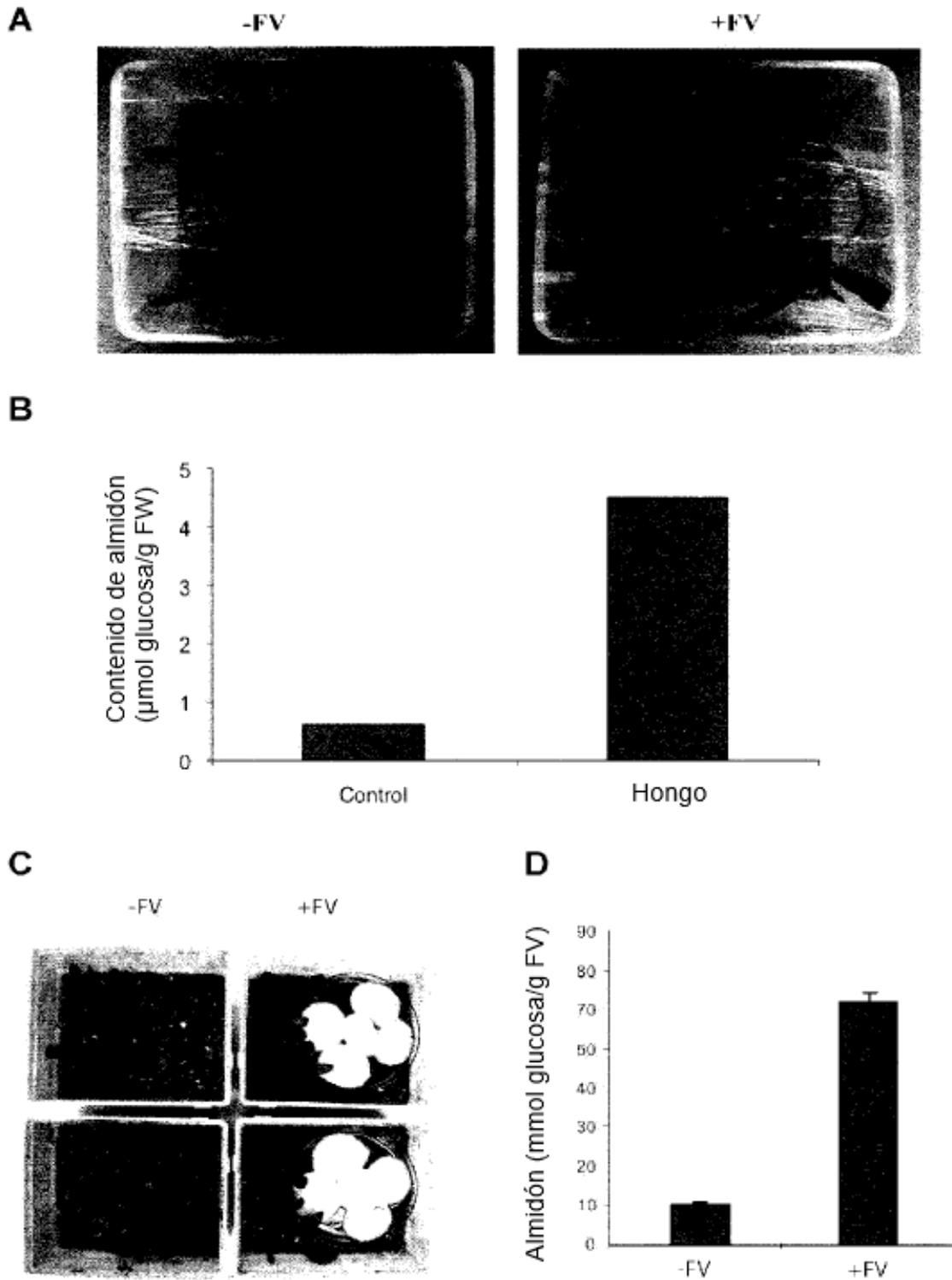


Fig. 7



Fig. 8

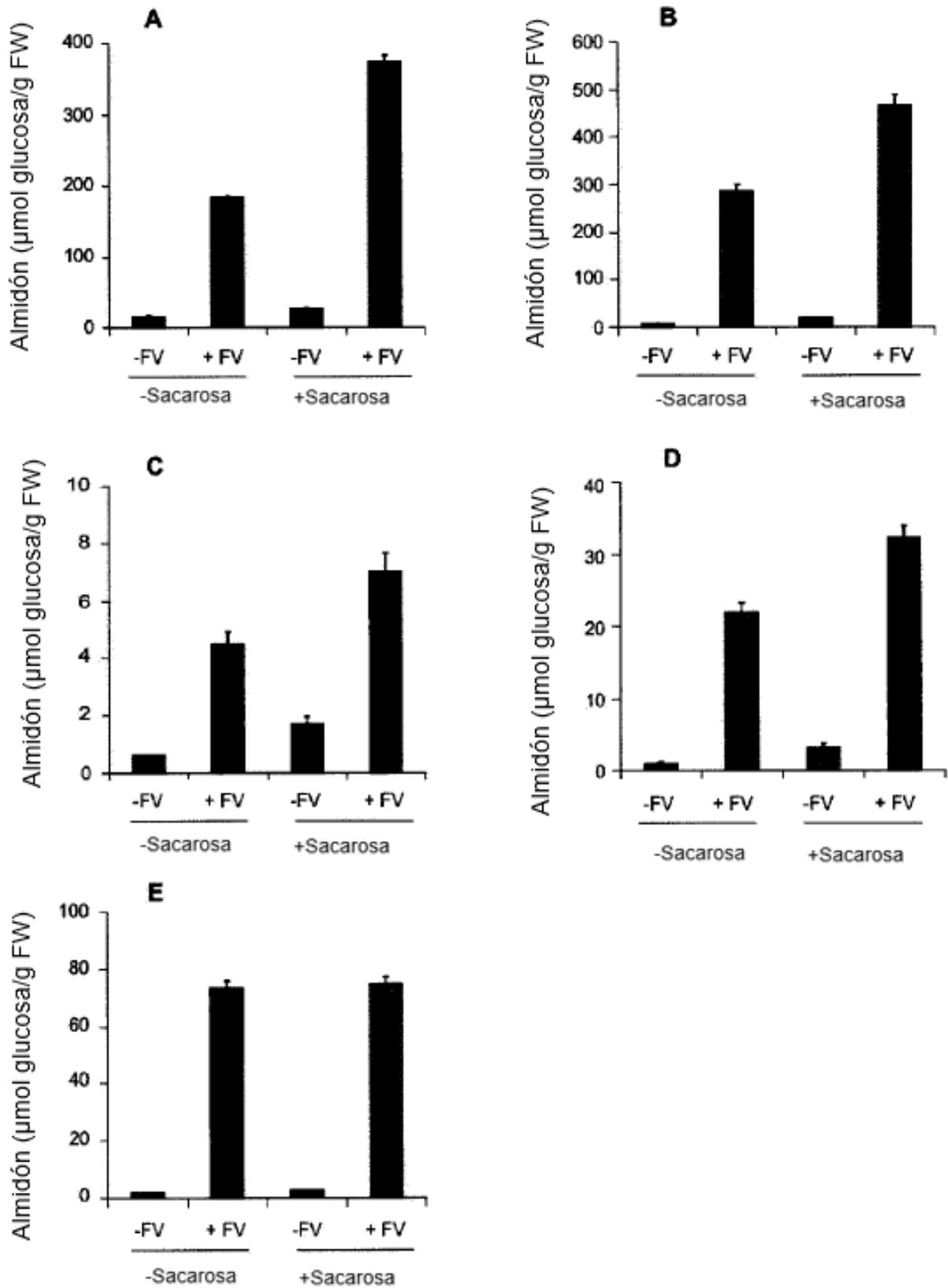


Fig. 9

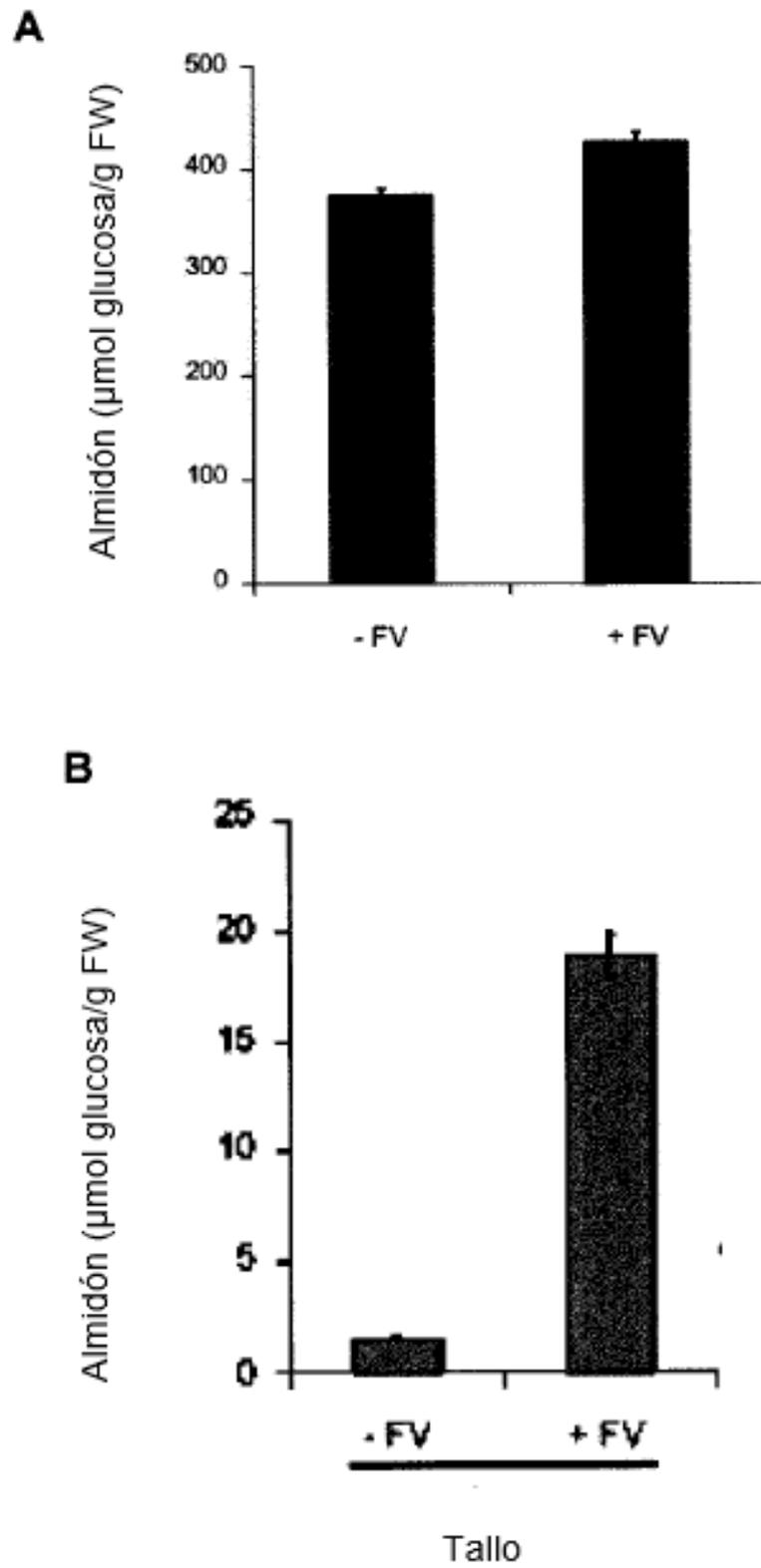


Fig. 10

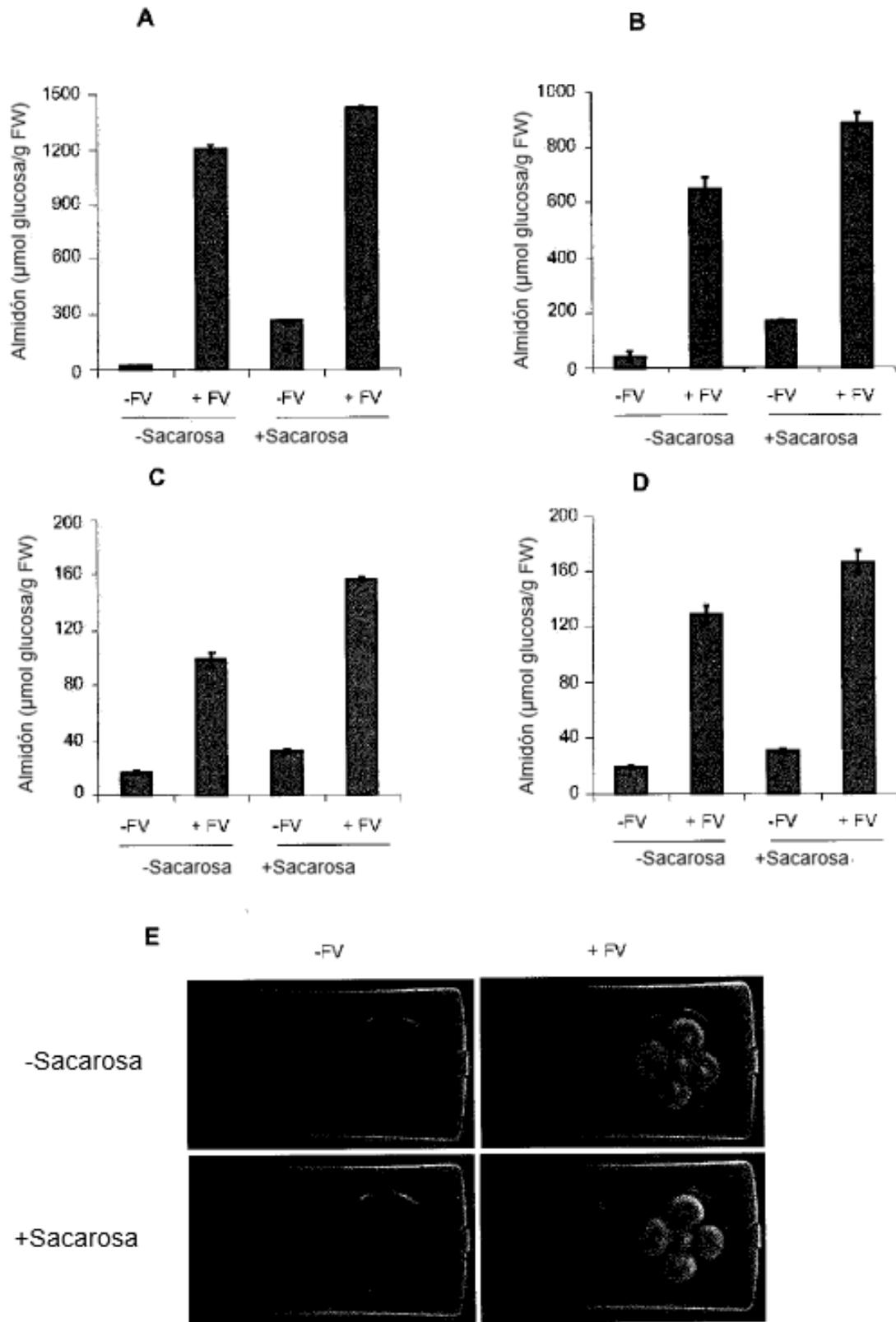


Fig. 11

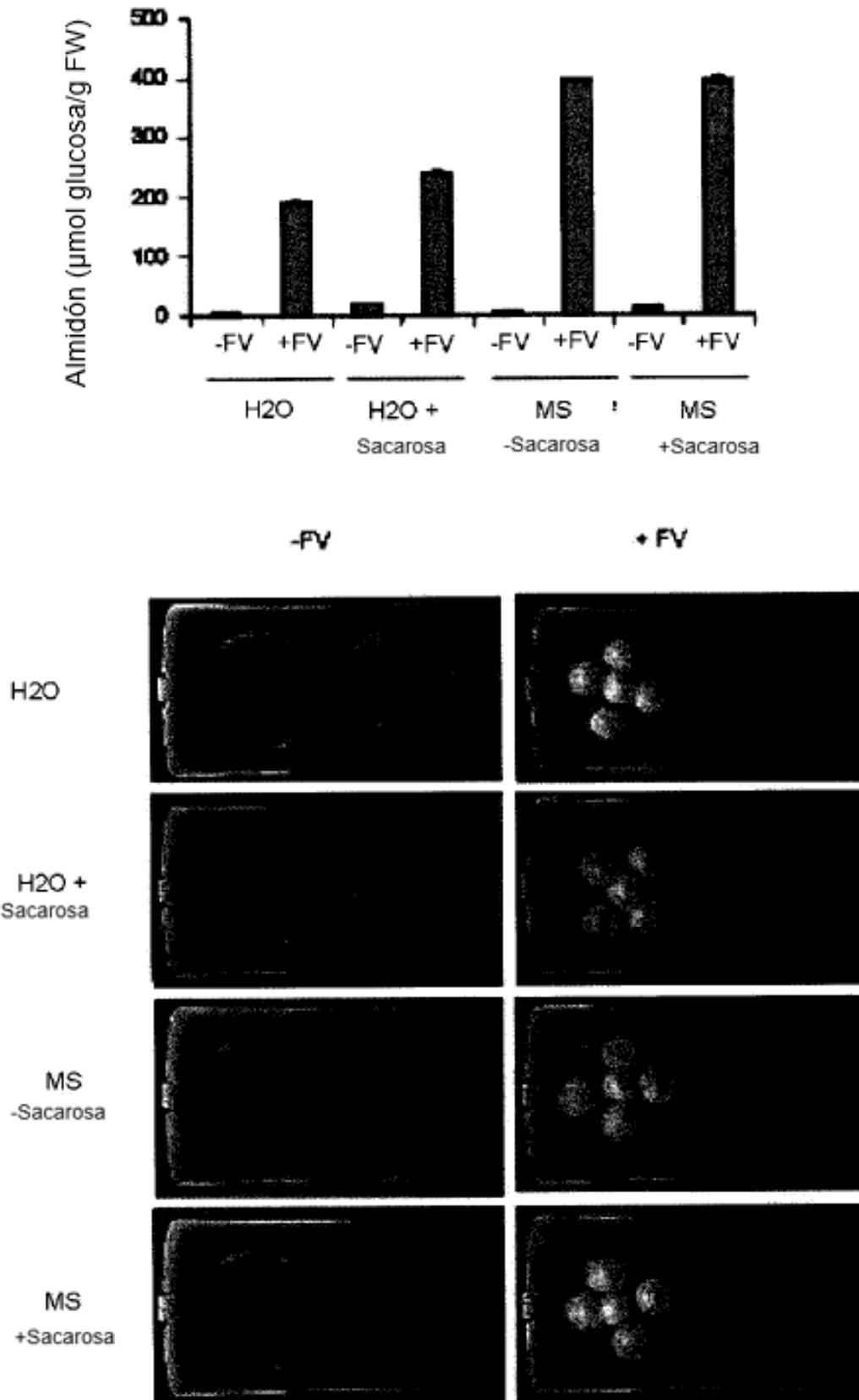
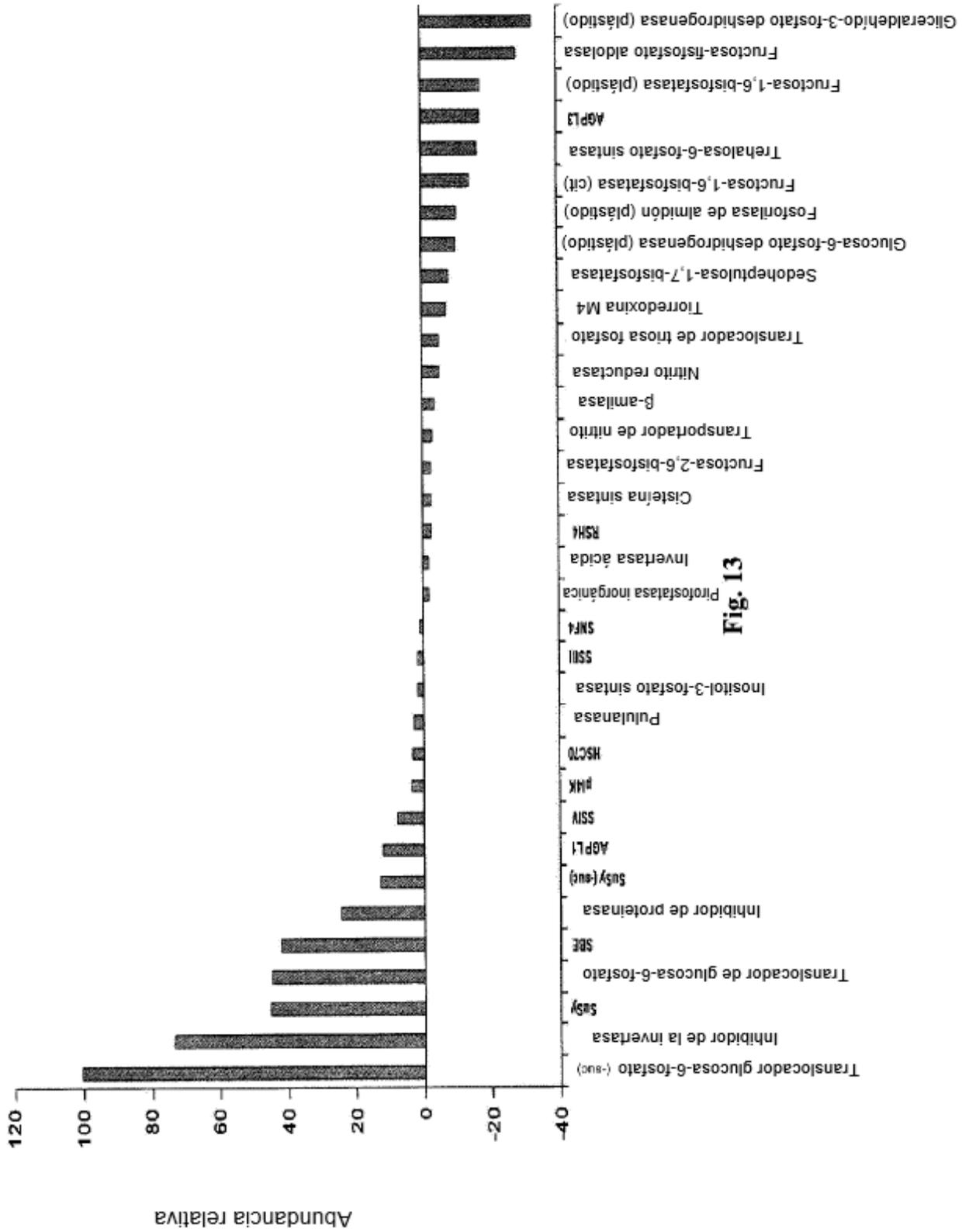


Fig. 12



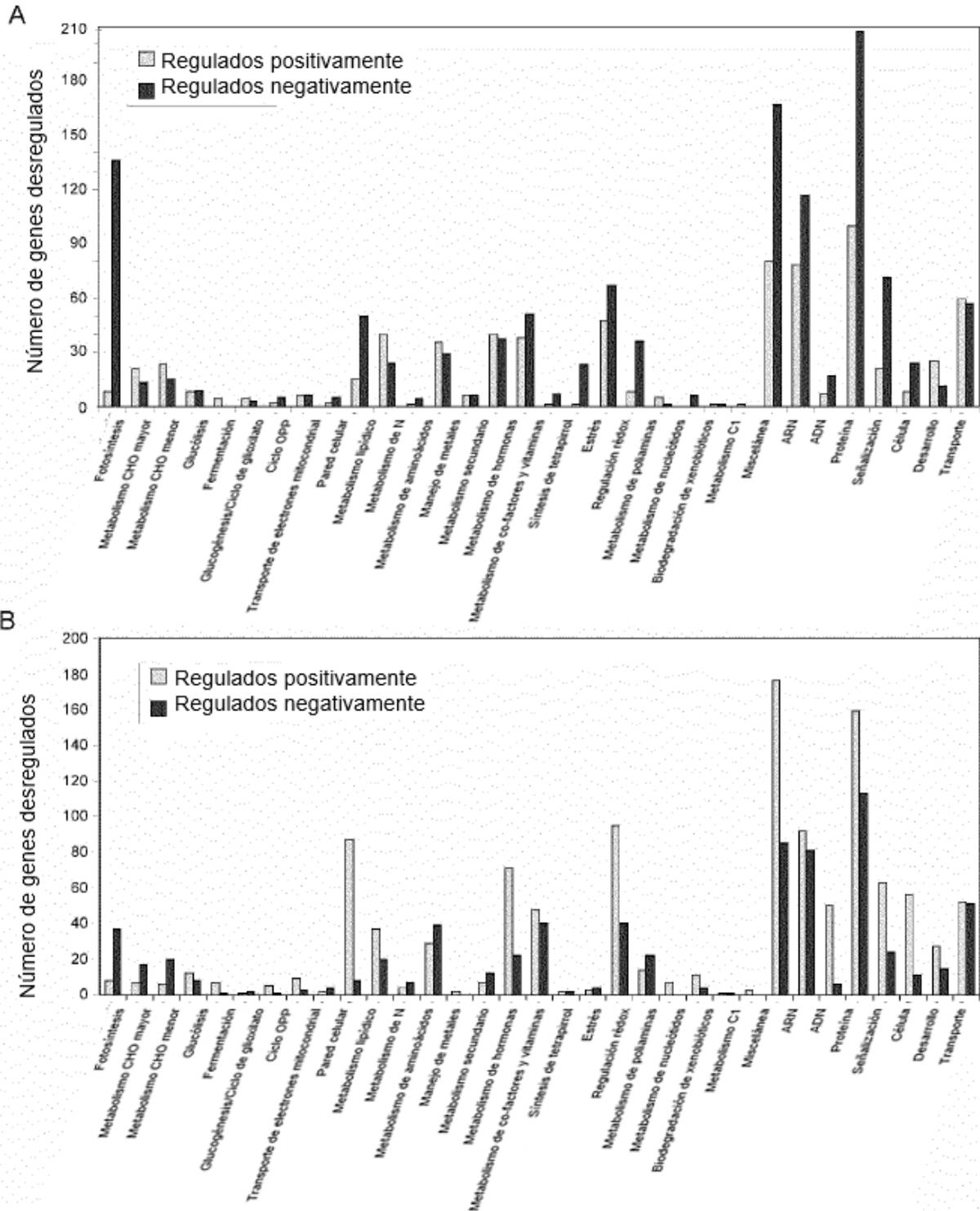


Fig. 14

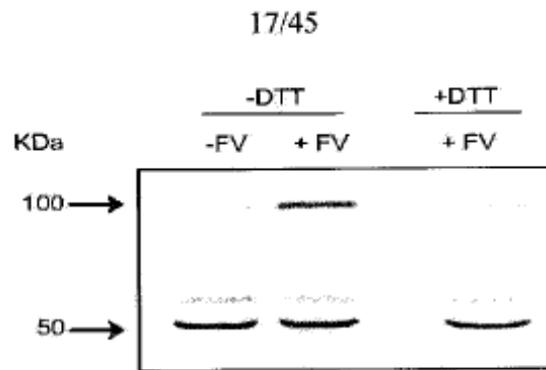


Fig. 15

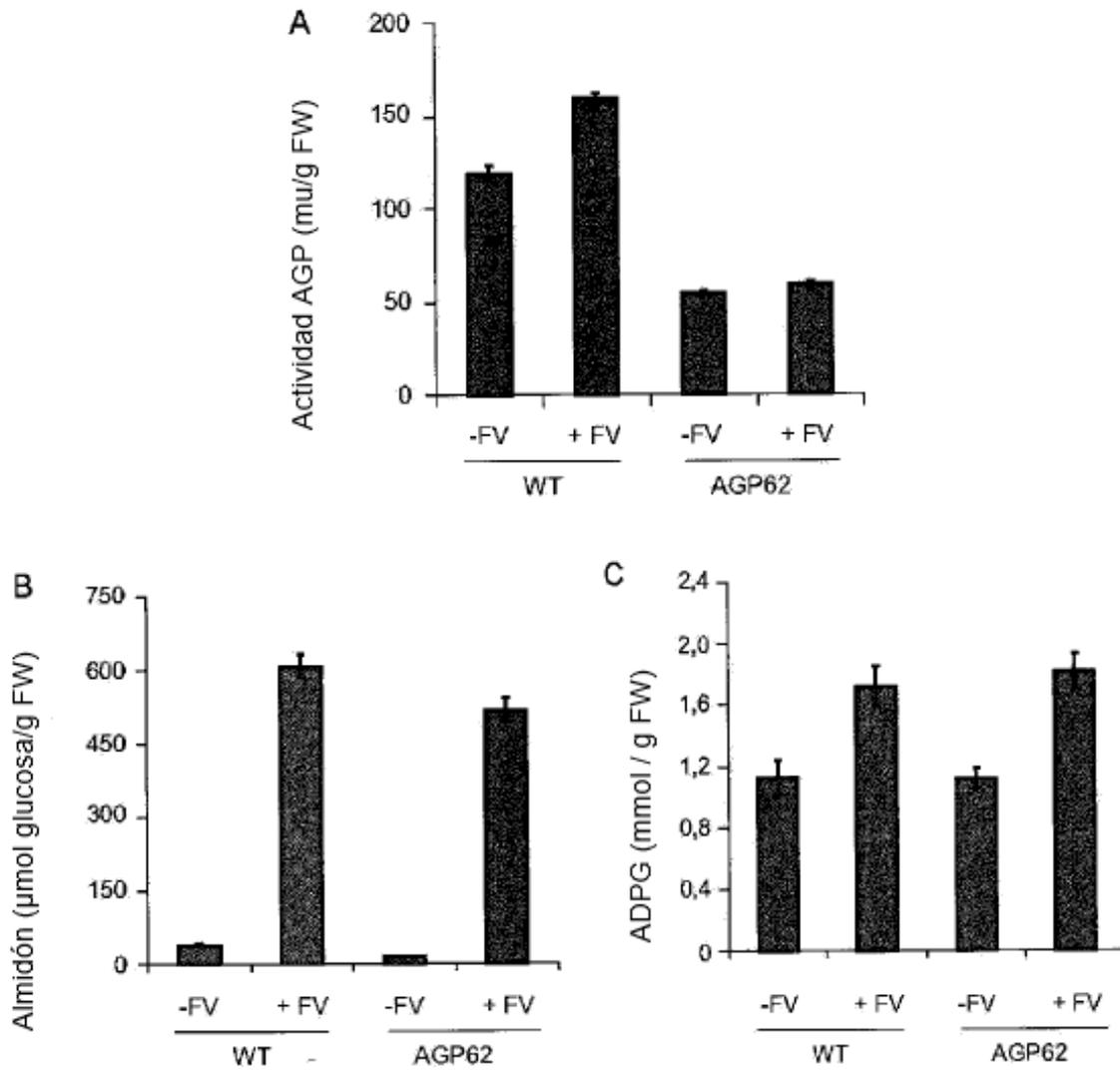


Fig. 16

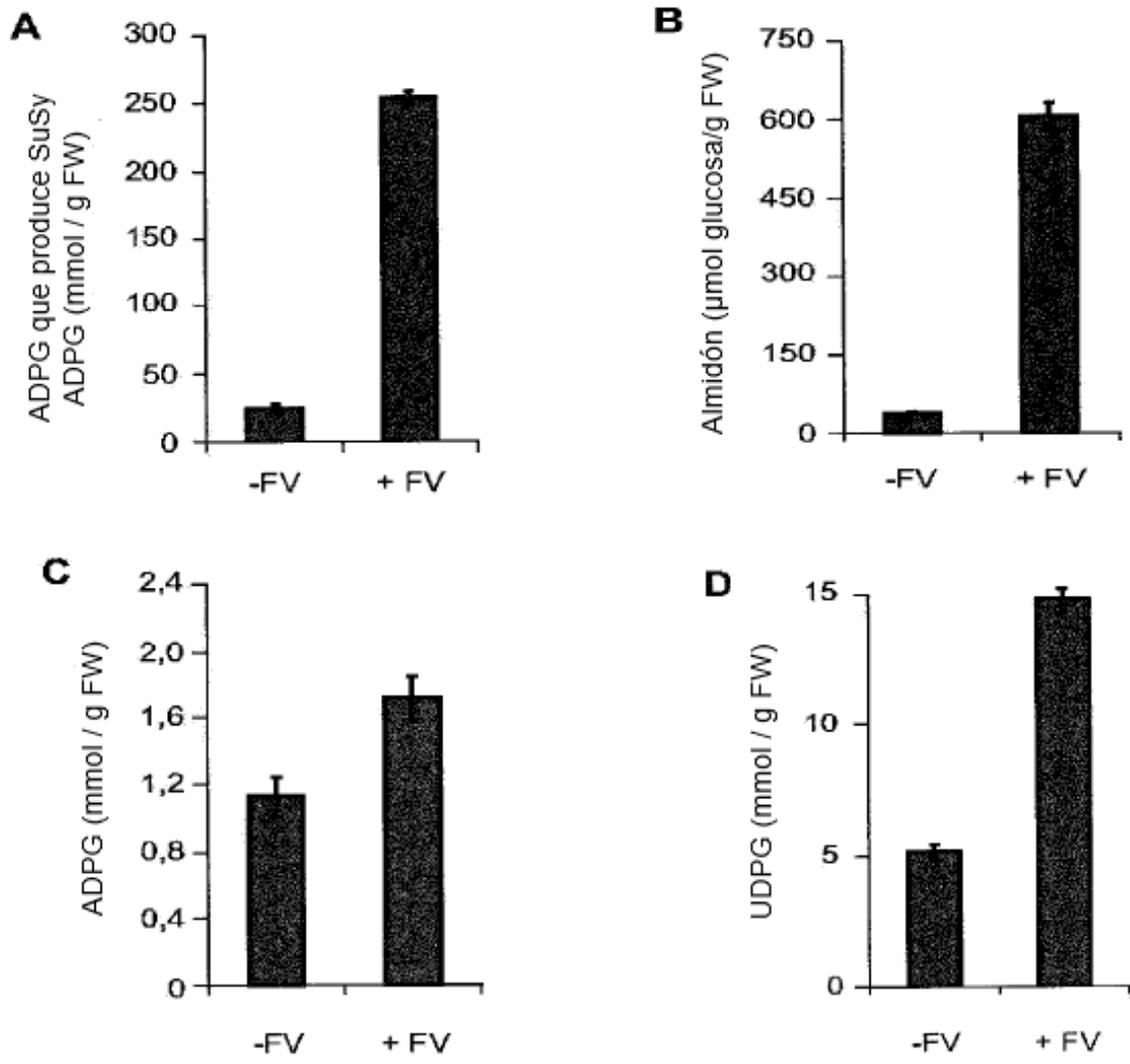


Fig. 17

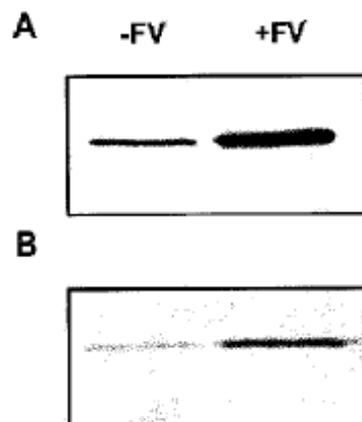


Fig. 18

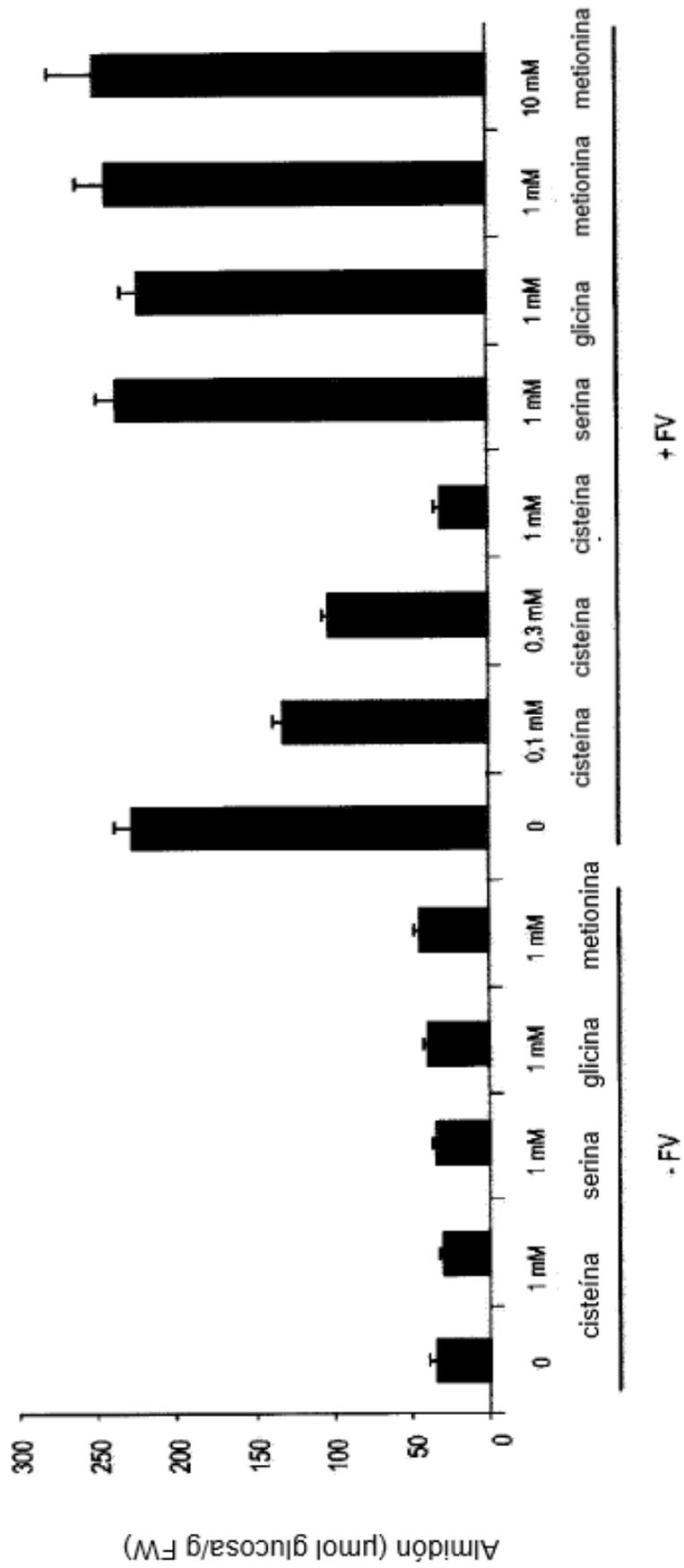


Fig. 19

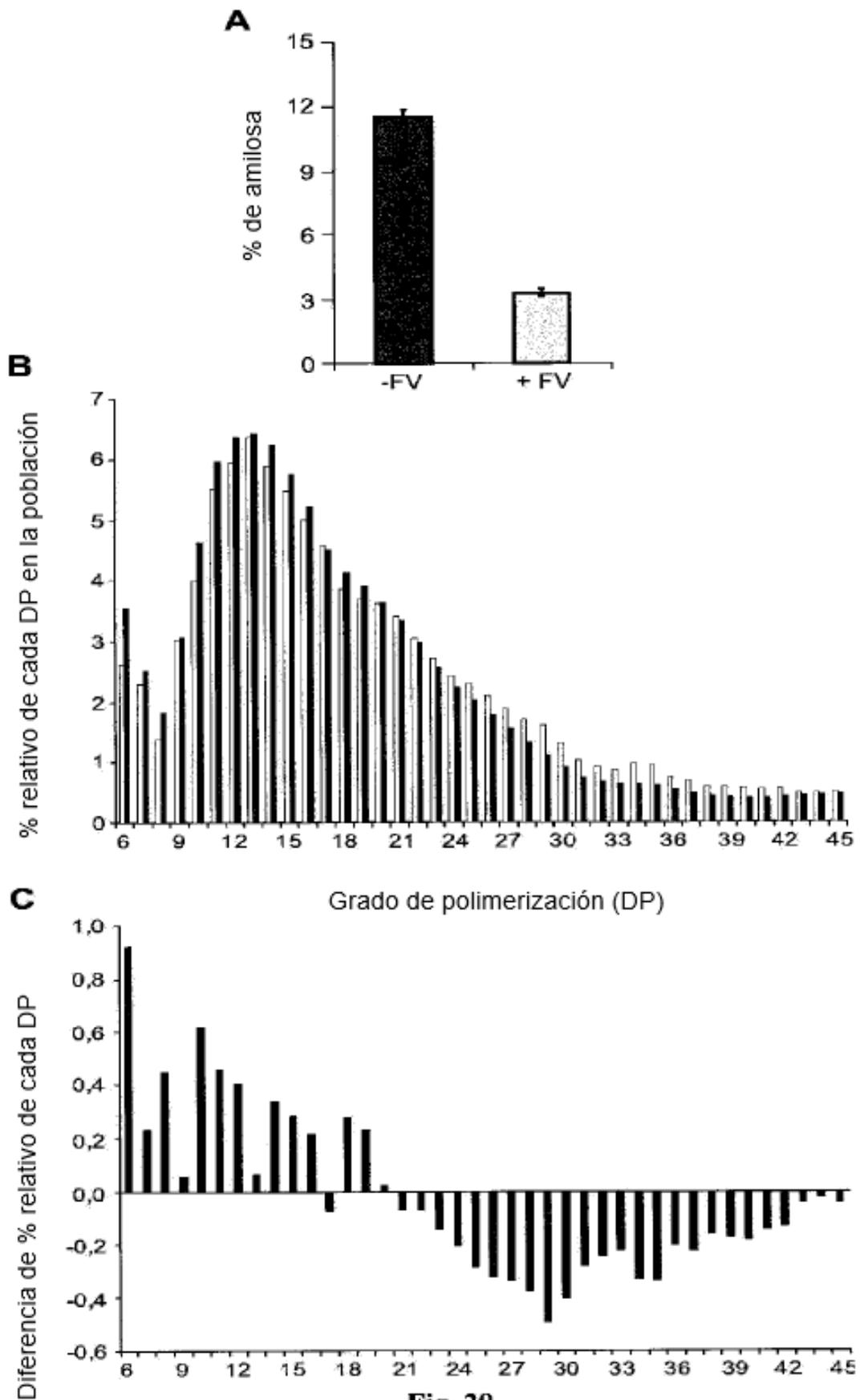
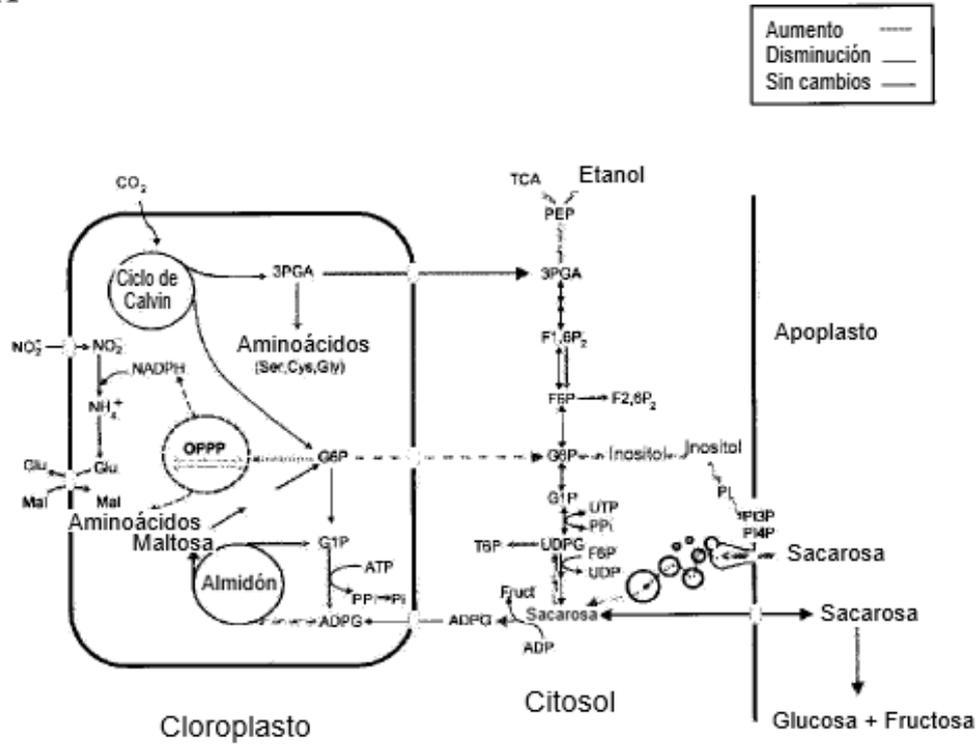


Fig. 20

A



B

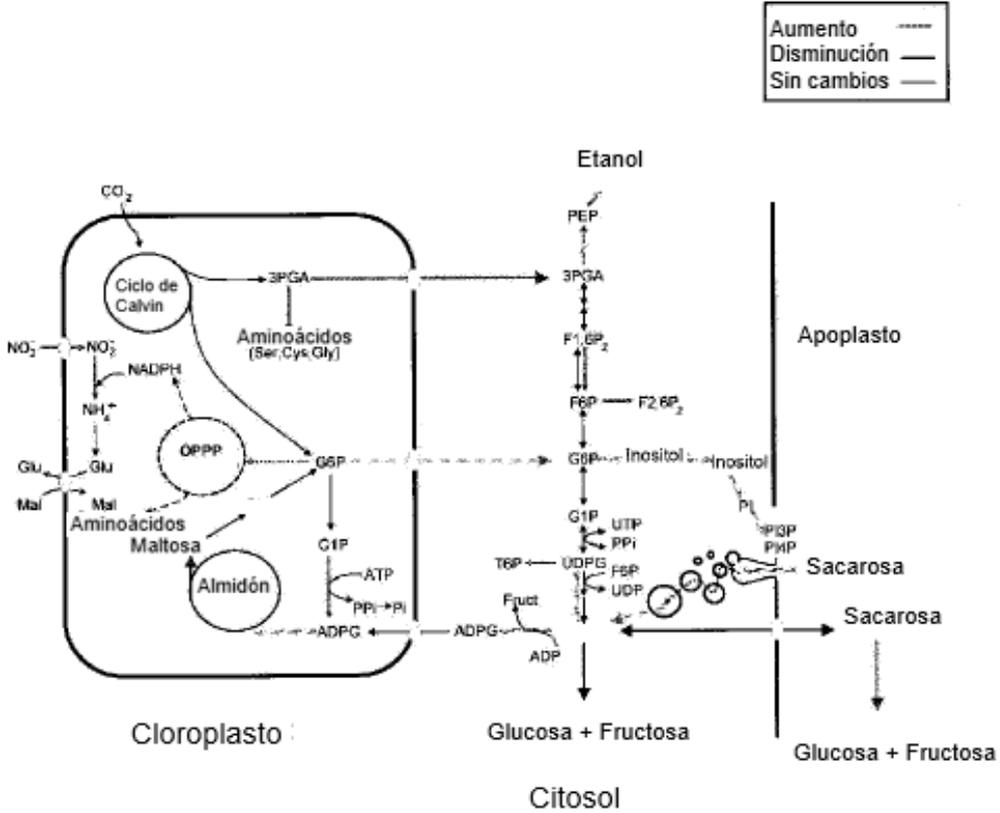


Fig. 21

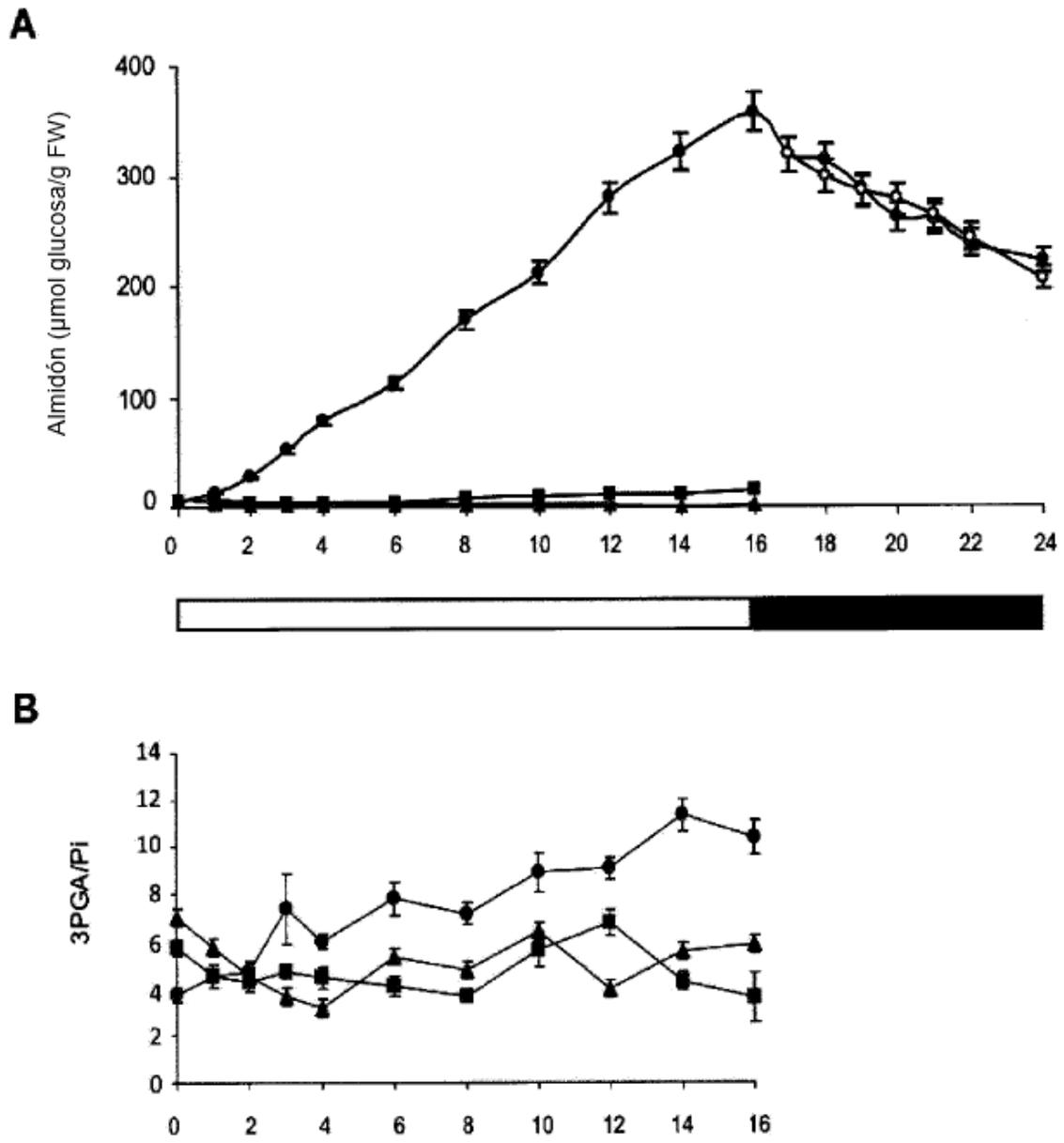


Fig. 22

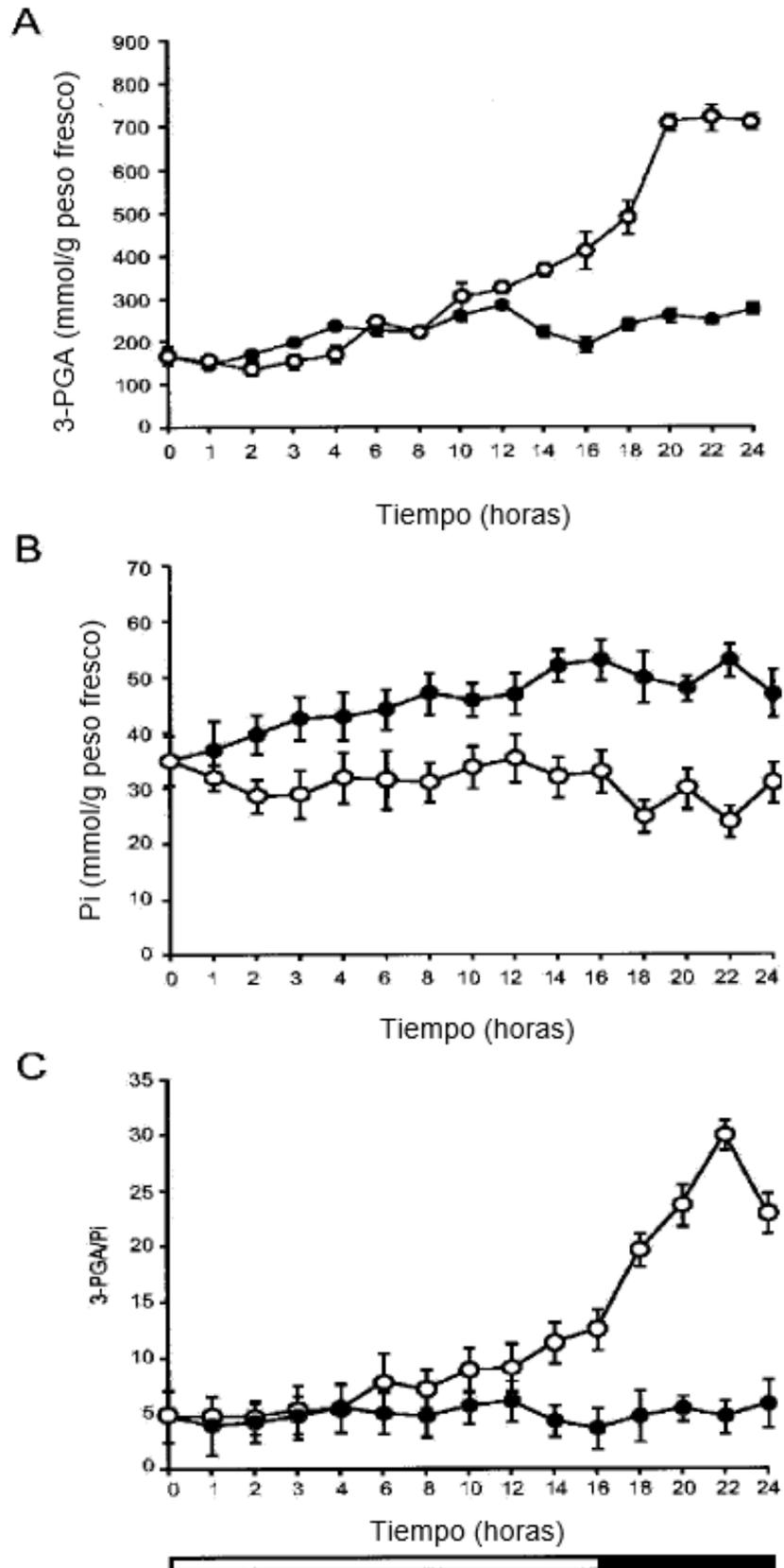
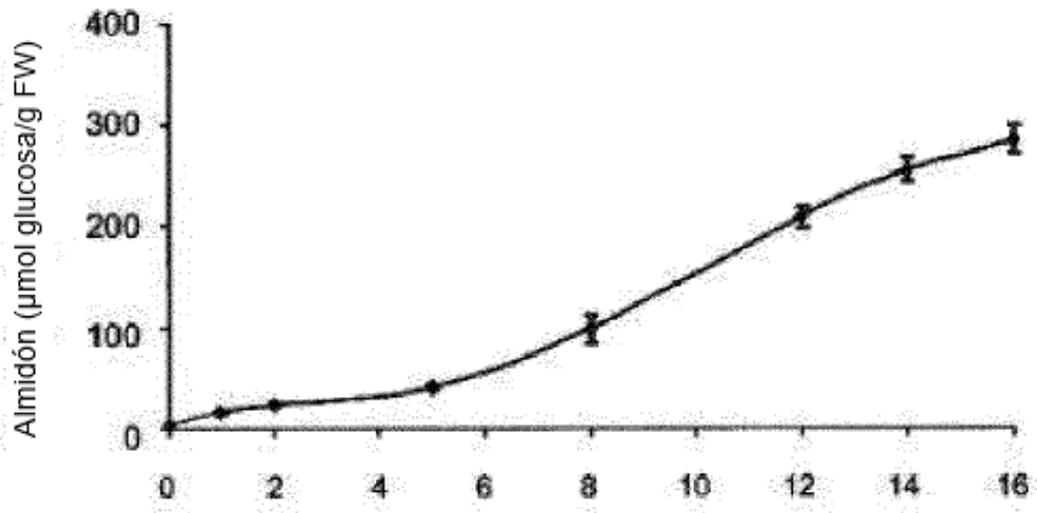


Fig. 23

A



B

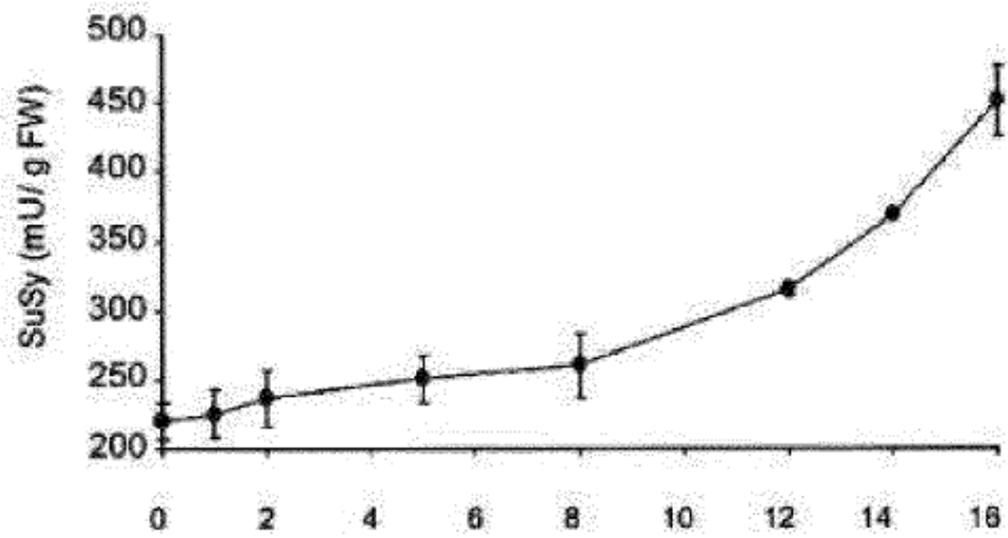


Fig. 24

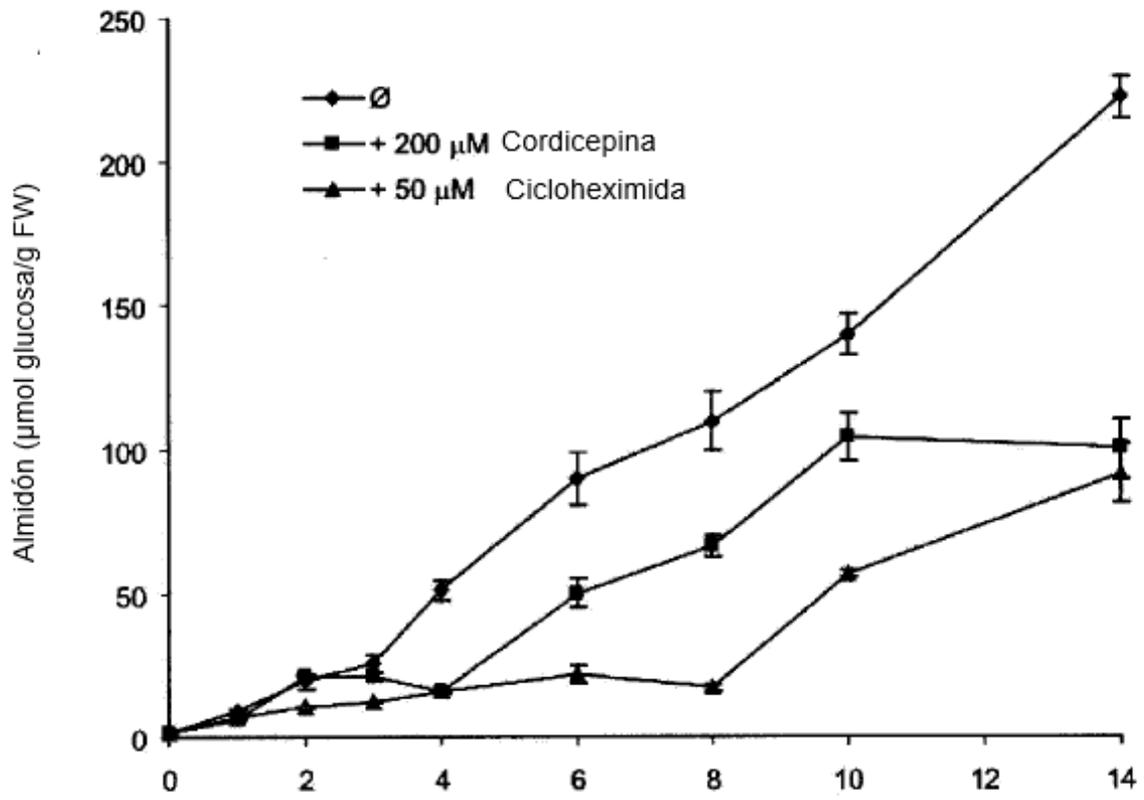


Fig. 25

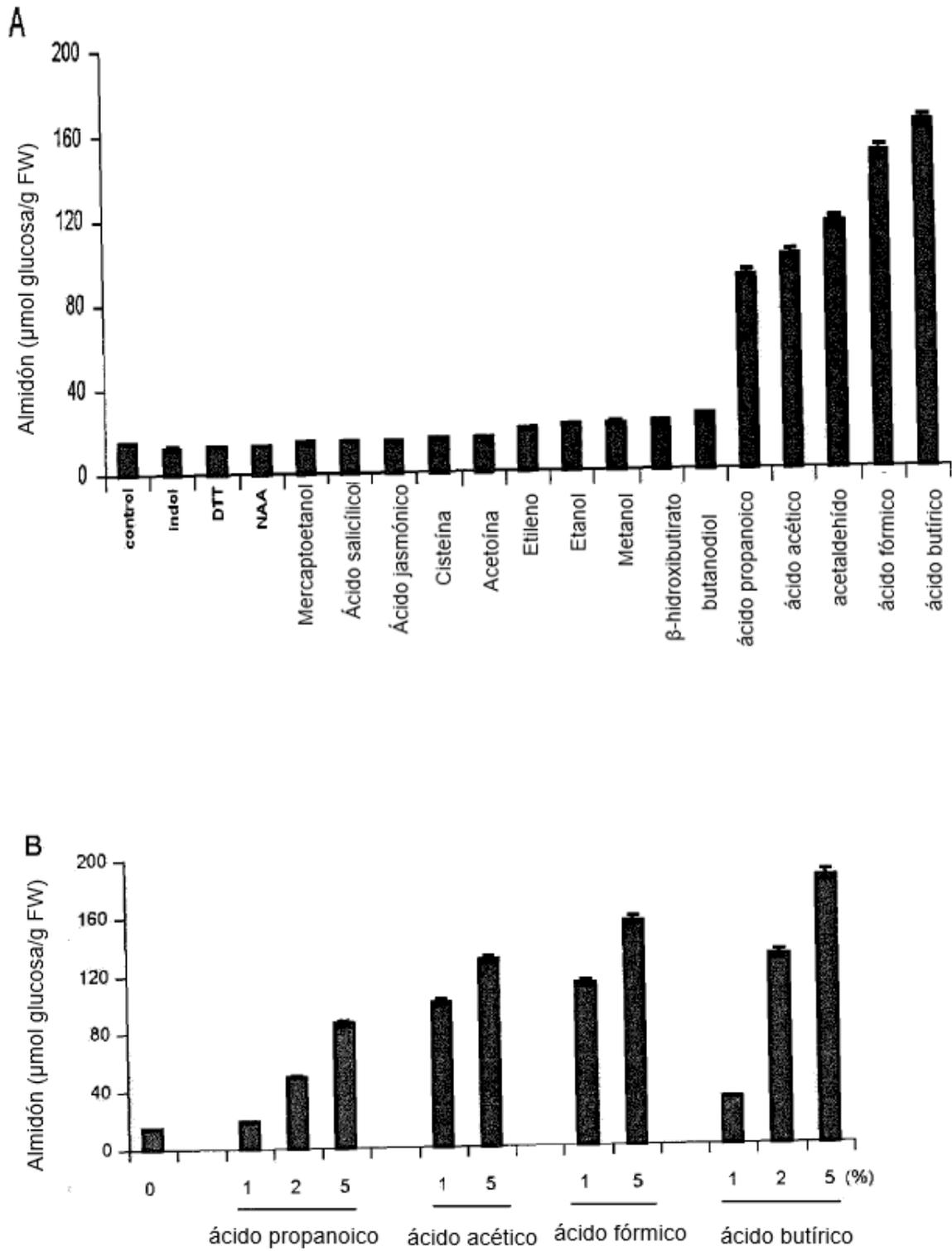


Fig. 26



Fig. 27

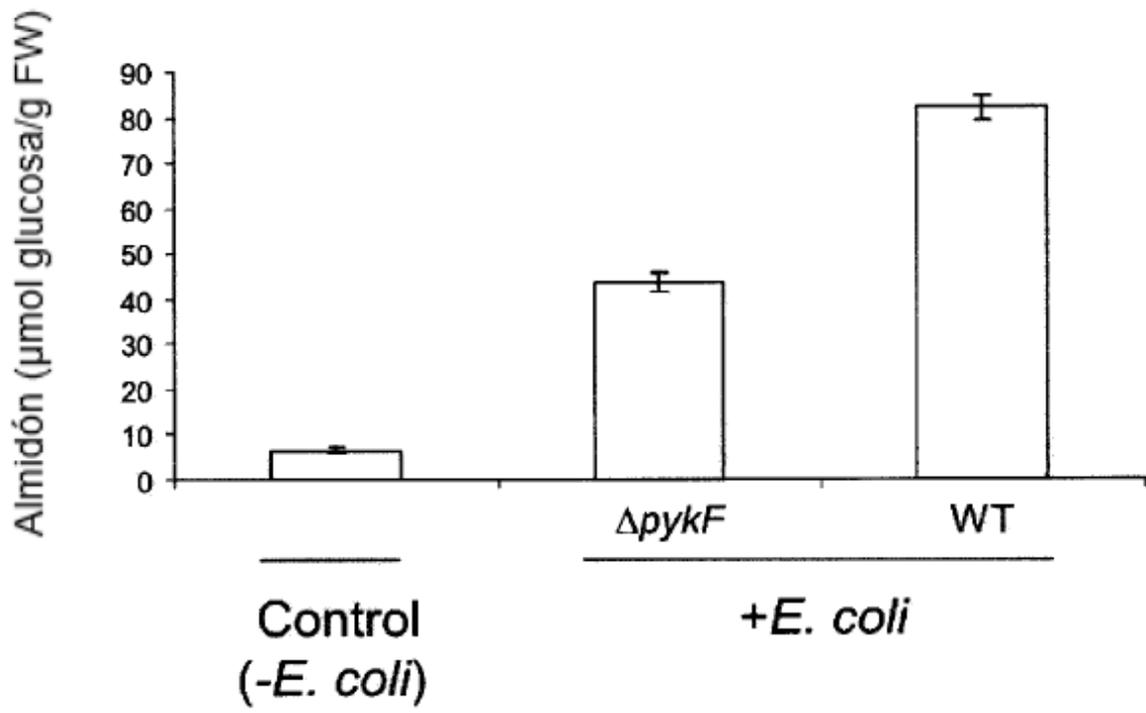
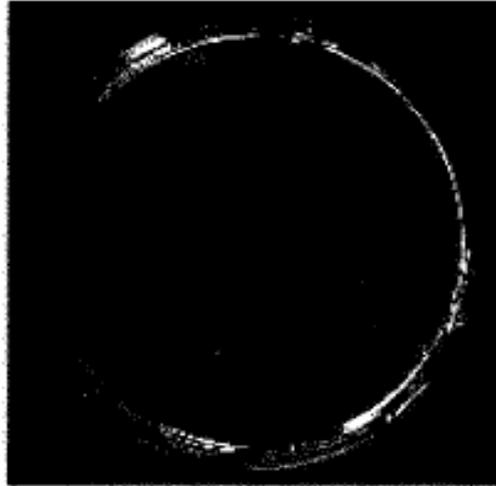
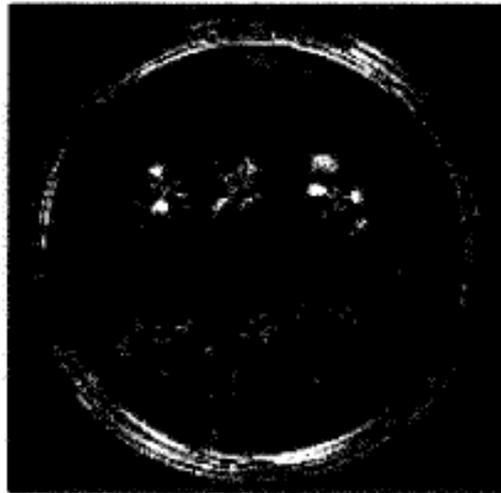


Fig. 28

0 %



2 %



5 %

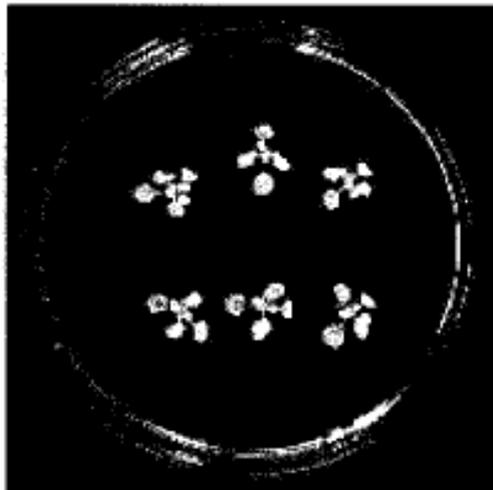


Fig. 29

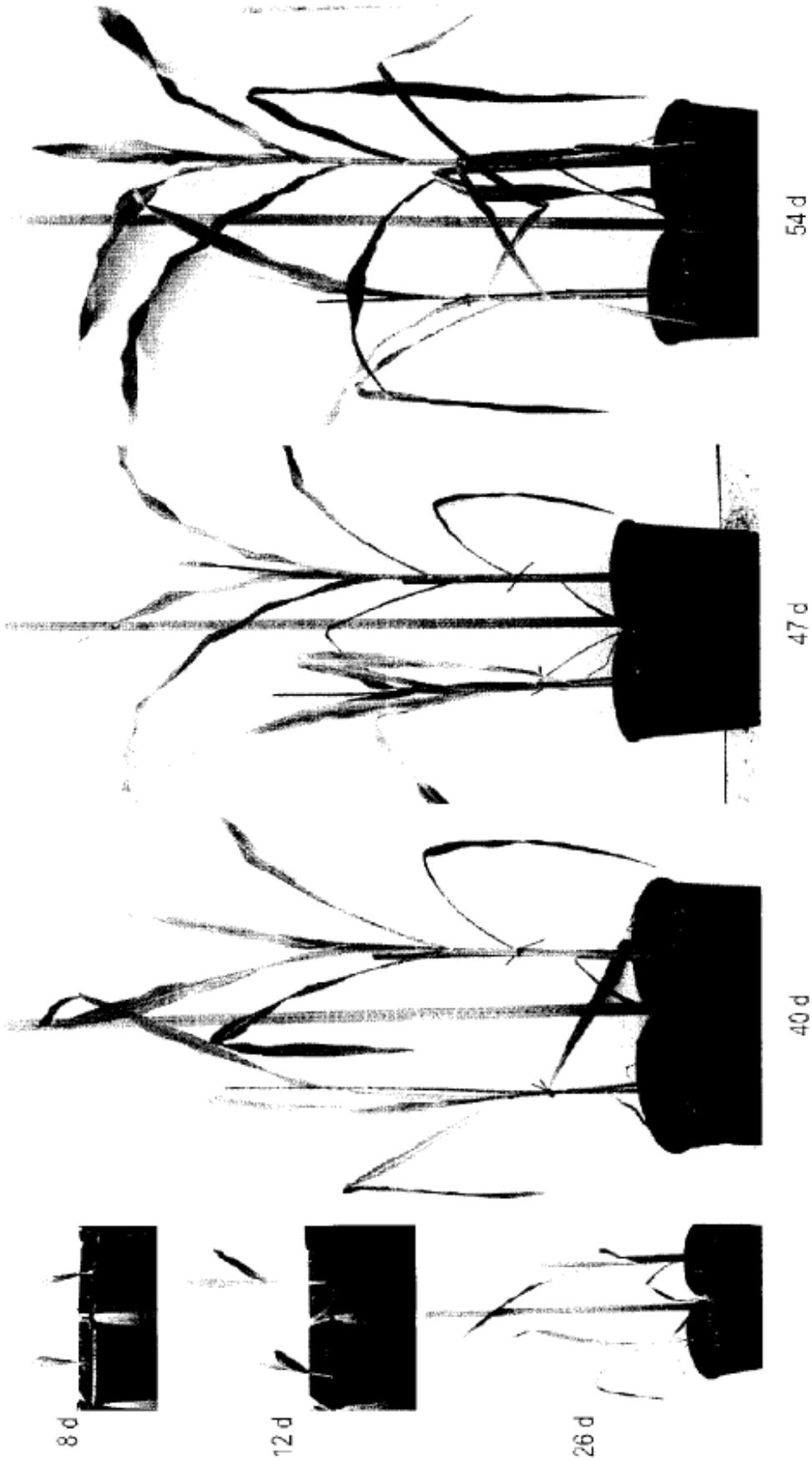


Fig. 30

Maíz

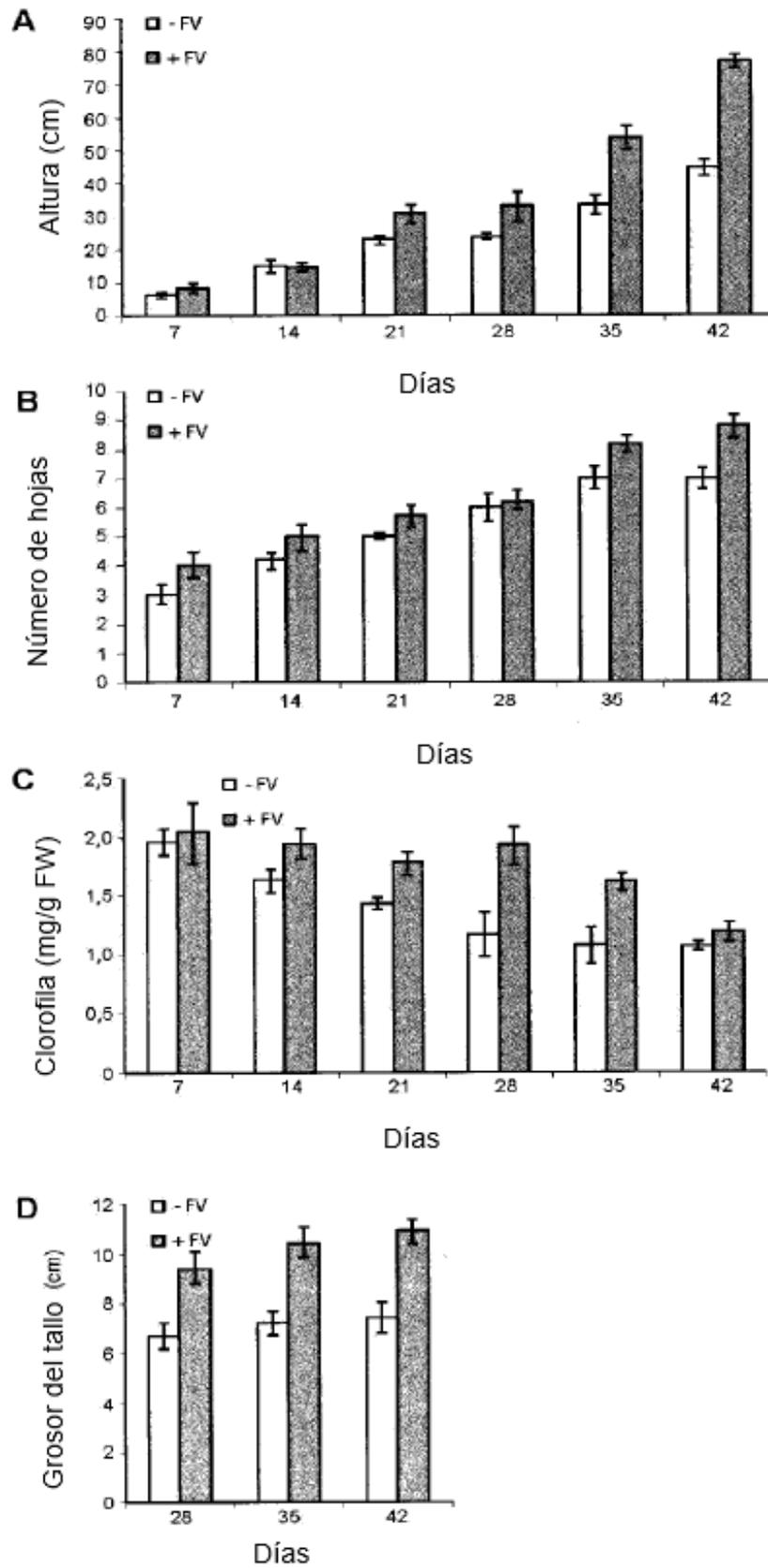


Fig. 31



Fig. 32

Pimiento

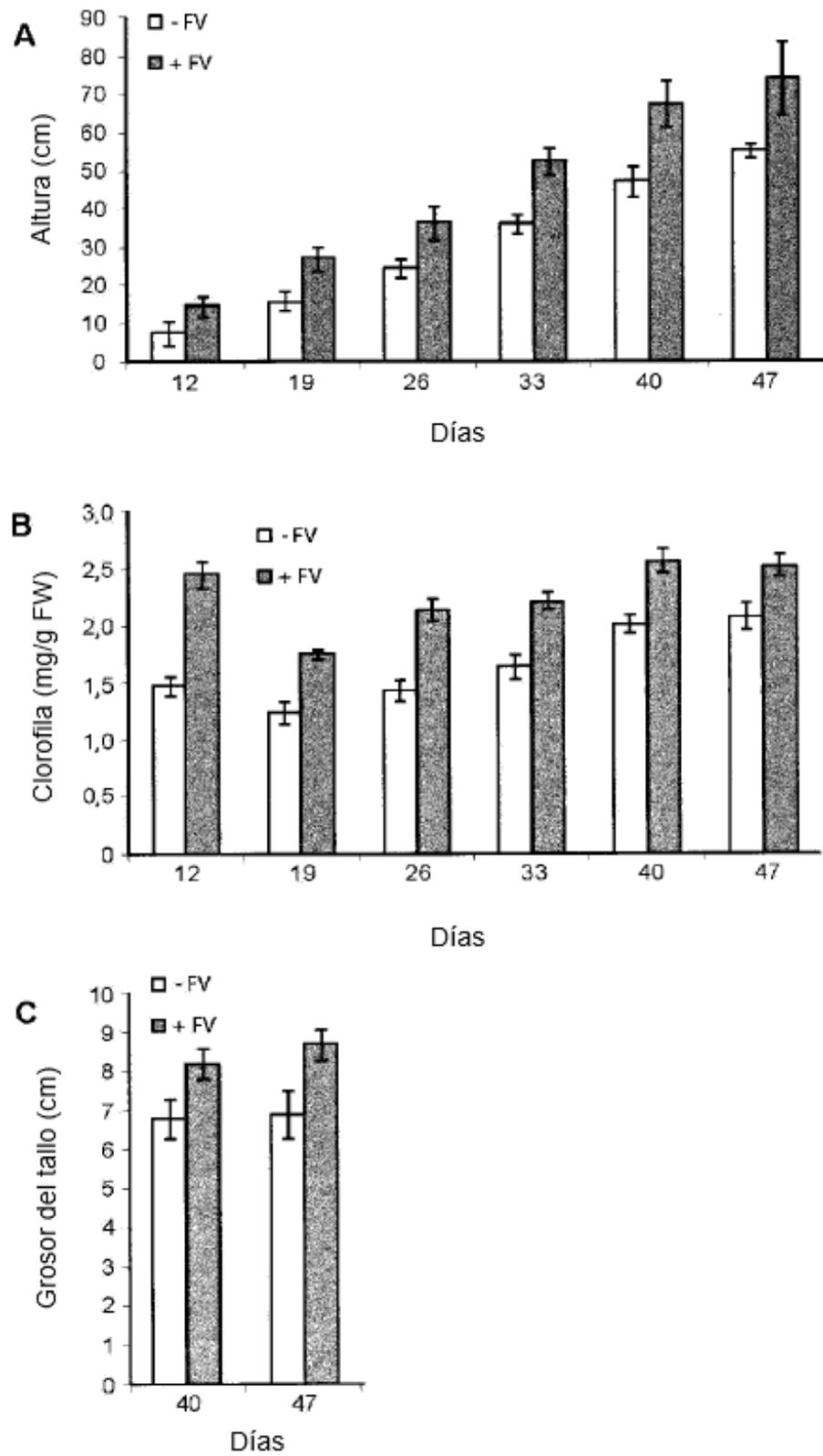


Fig. 33

Pimiento

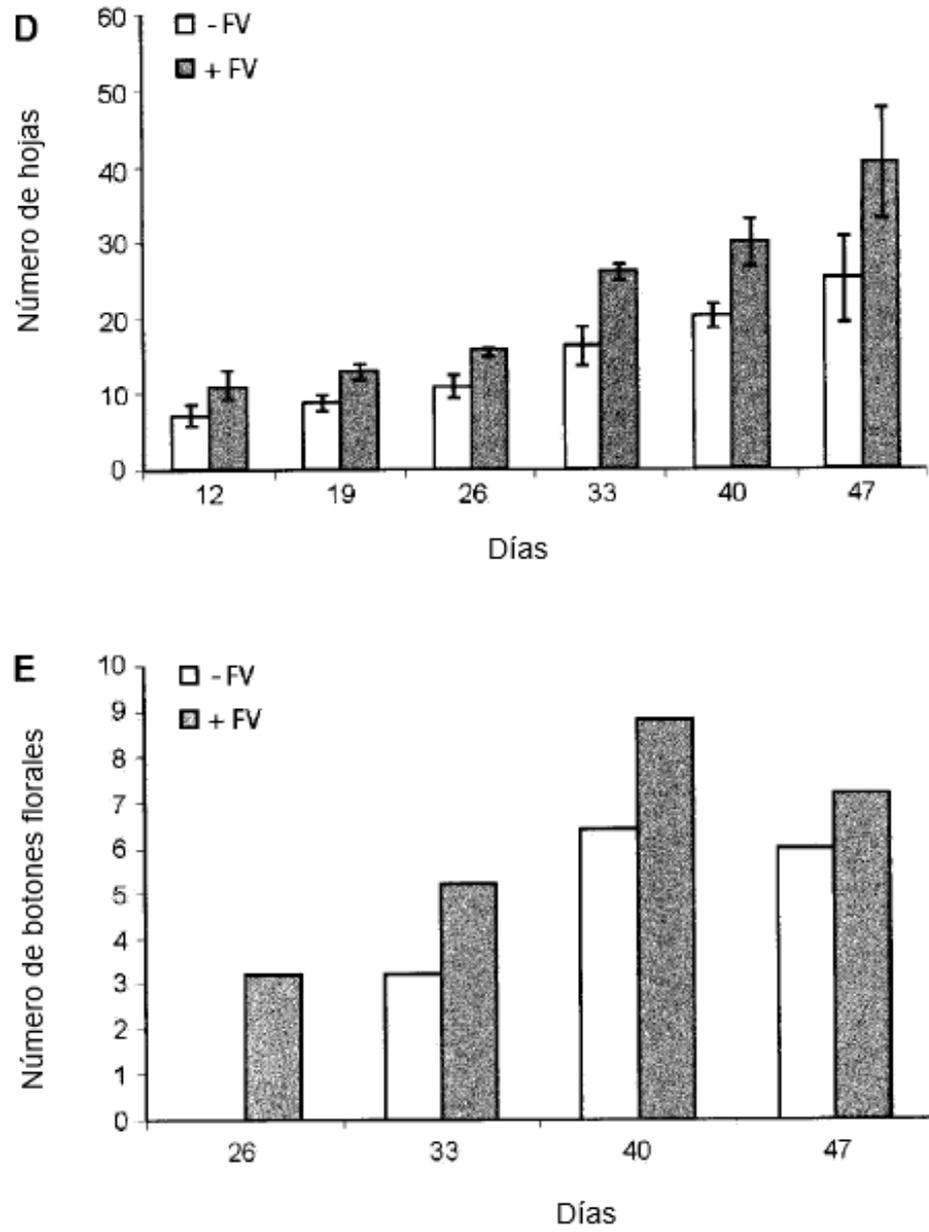


Fig. 33 (cont.)

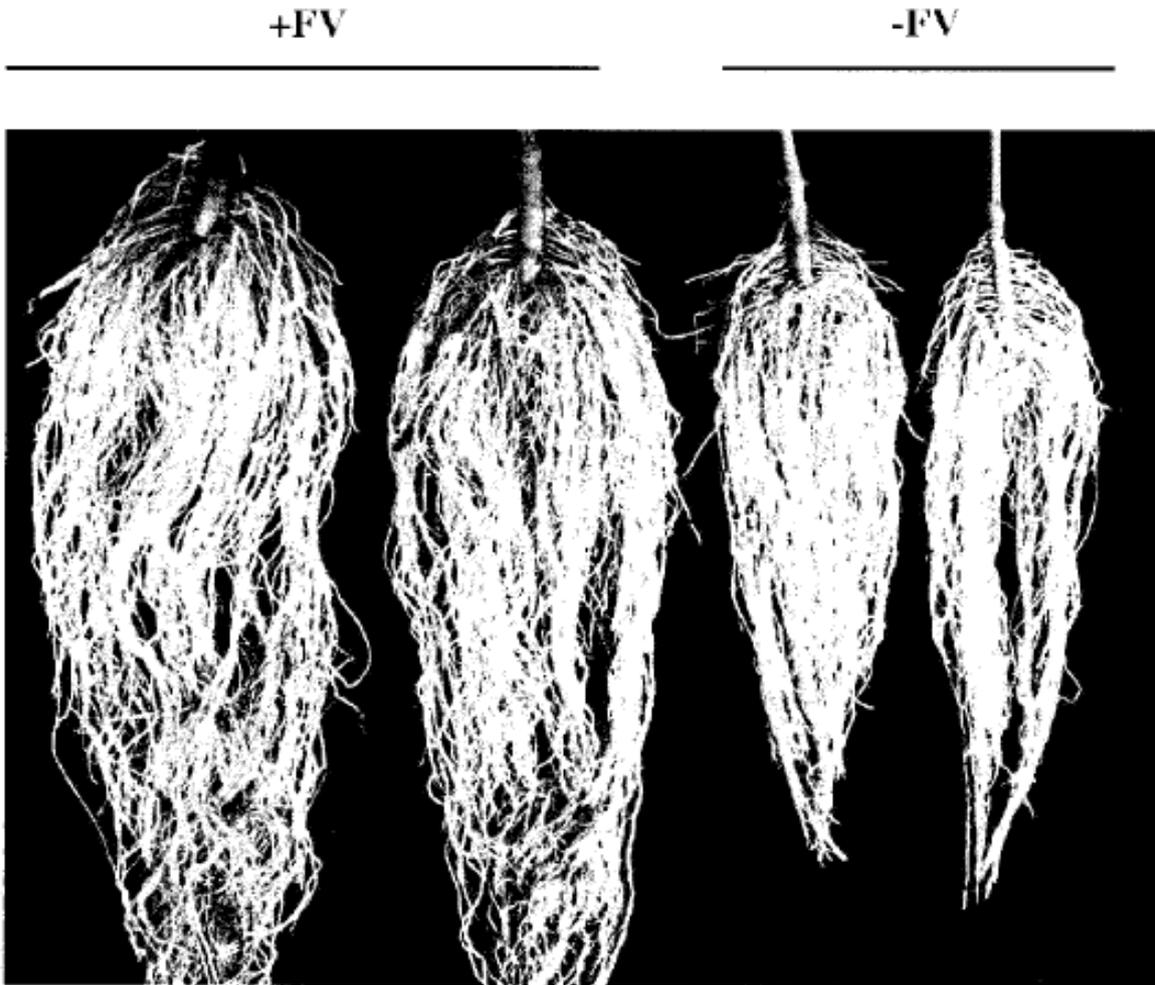


Fig. 34

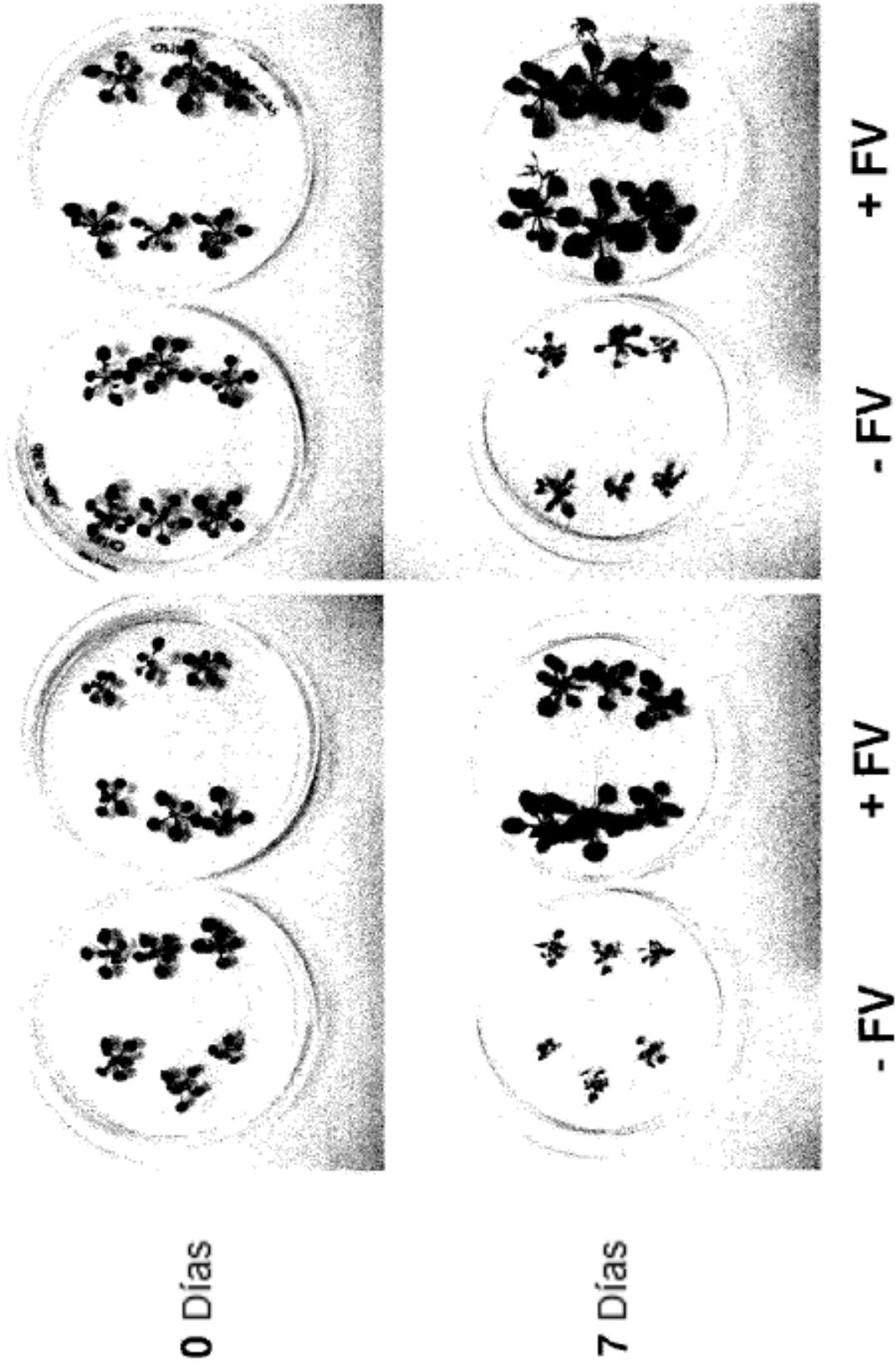


Fig. 35

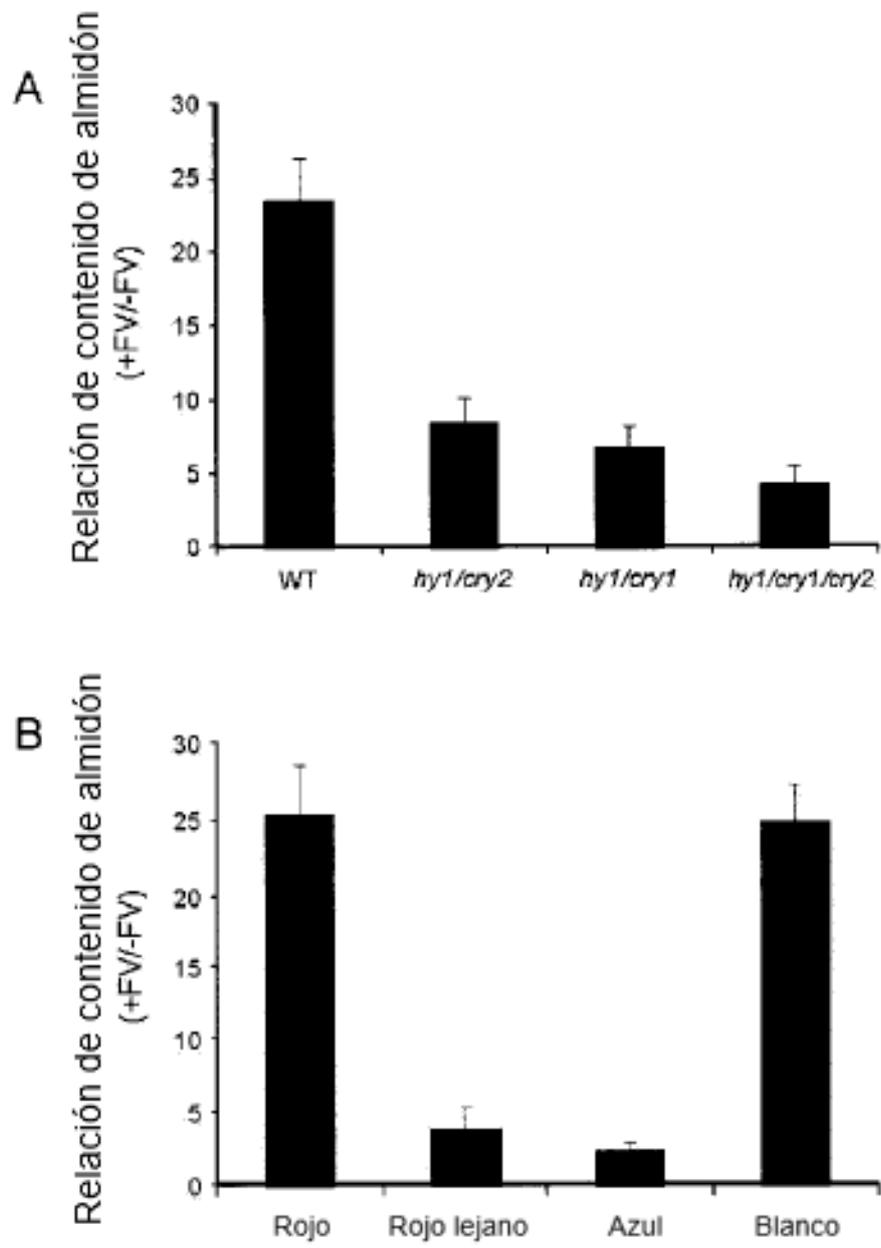


Fig. 36

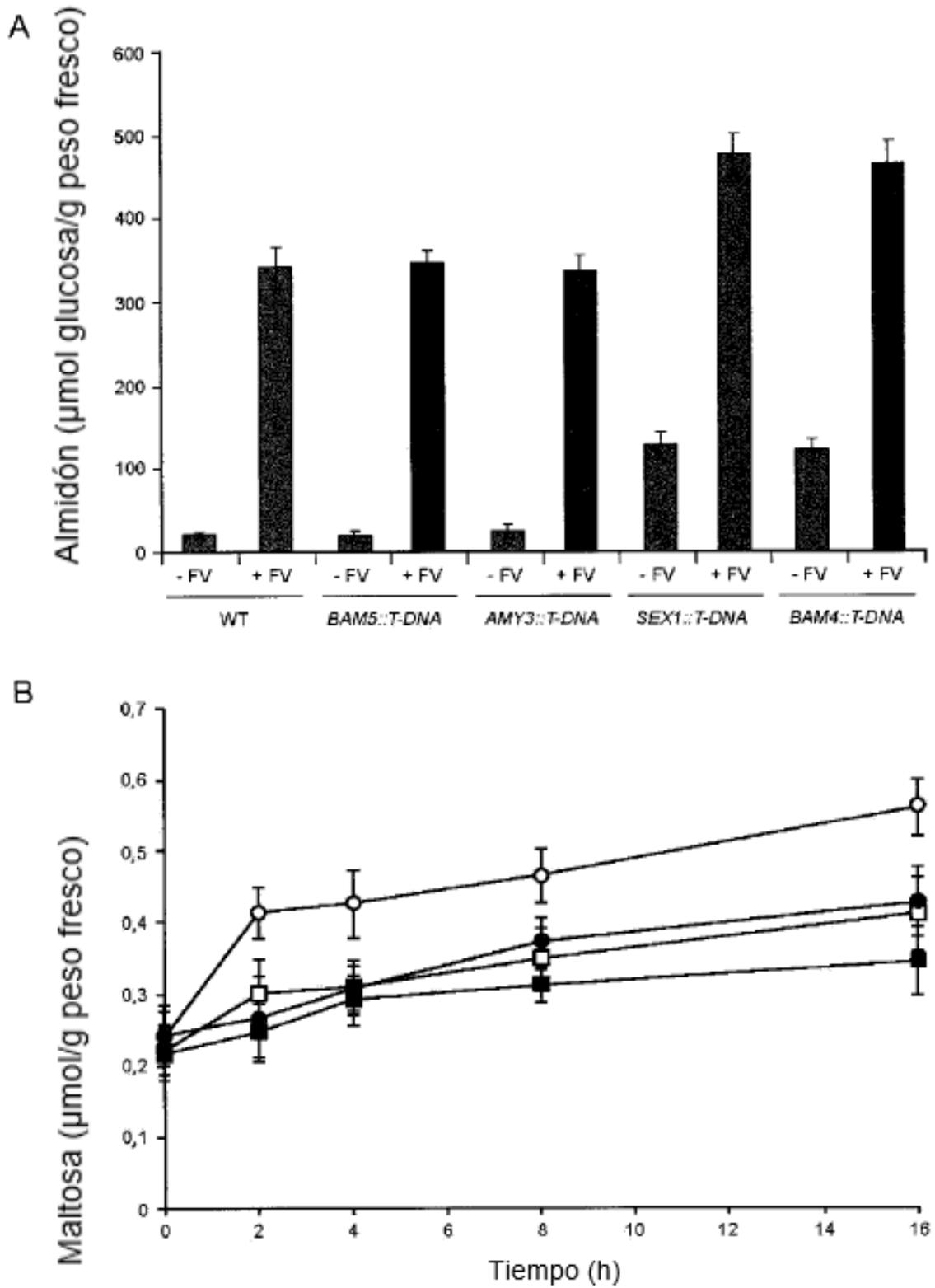


Fig. 37

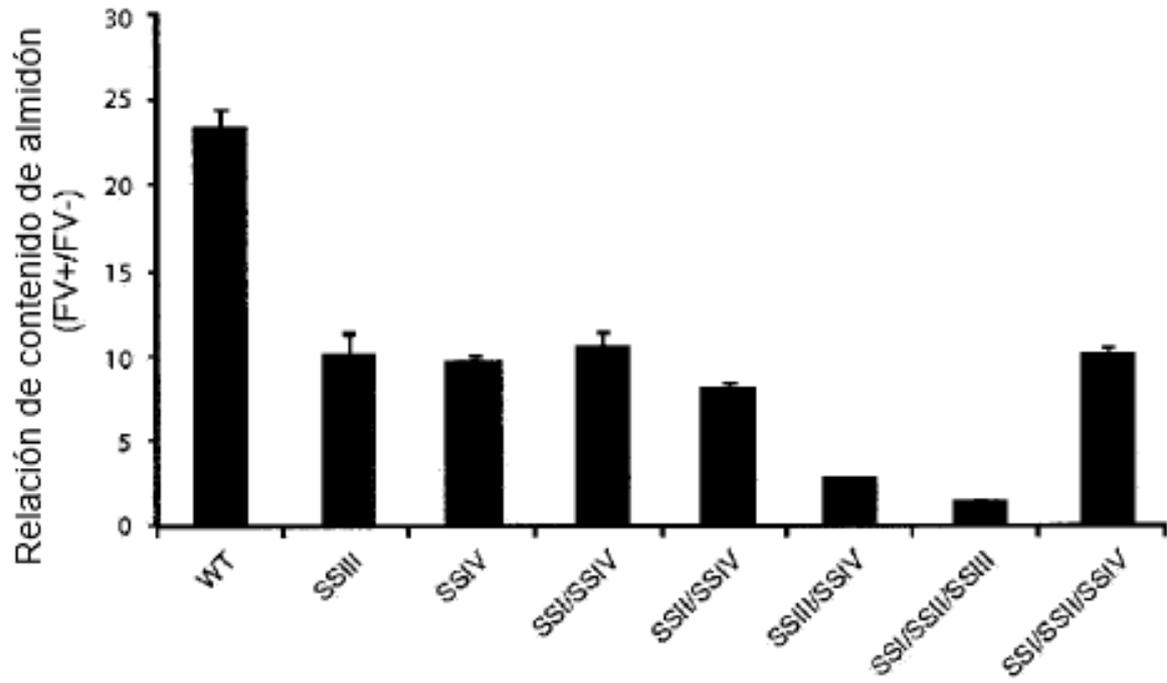


Fig. 38

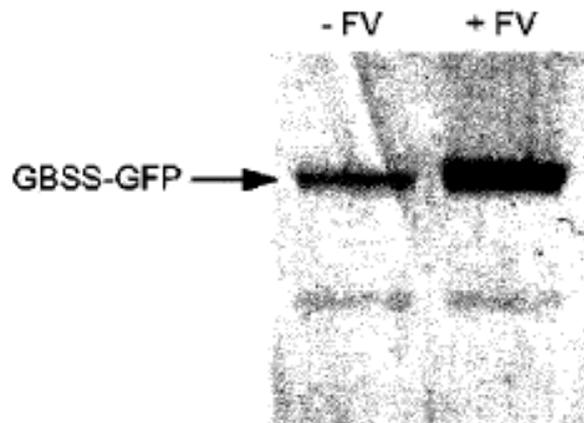


Fig. 39

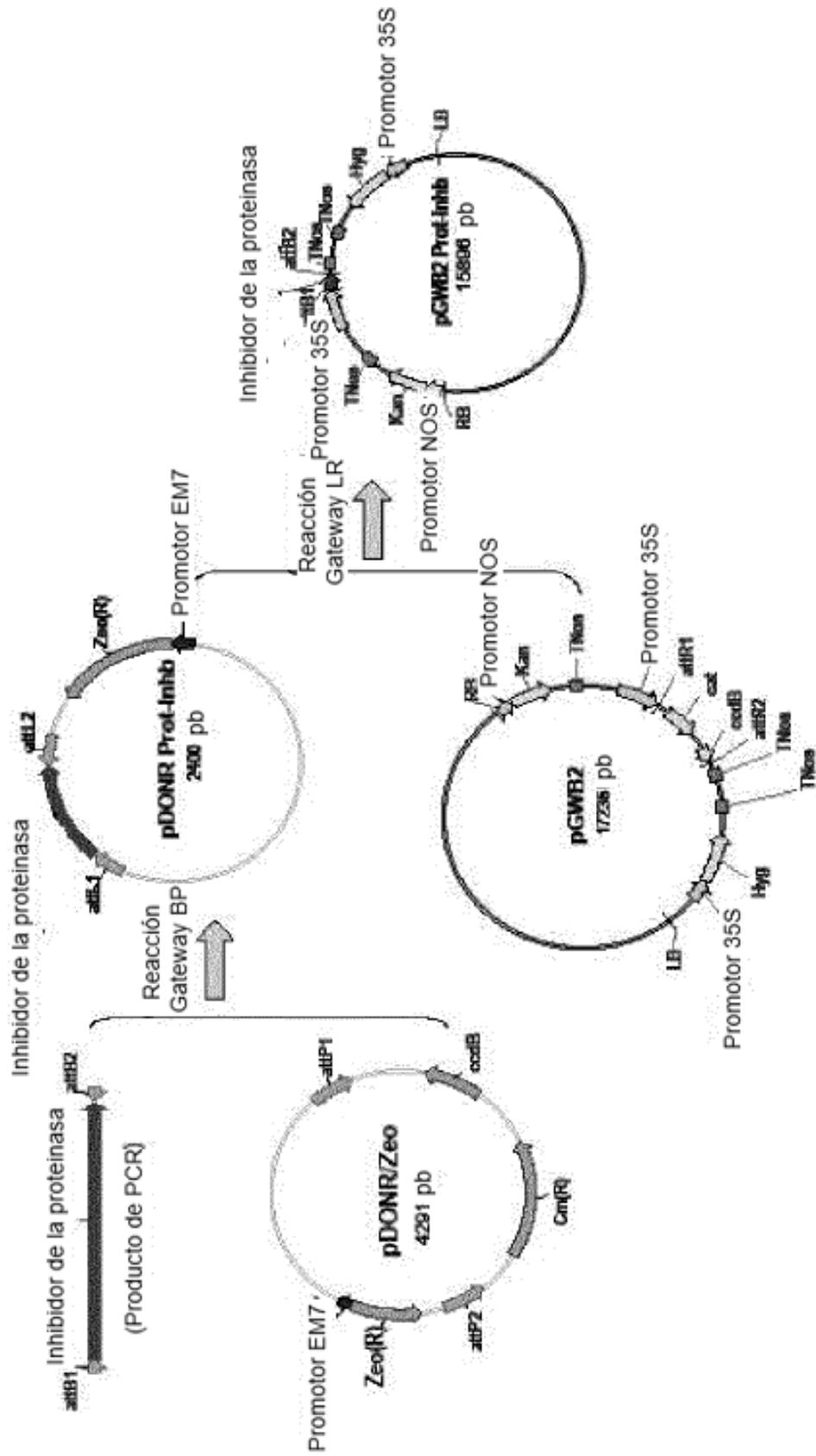


Fig. 40 A

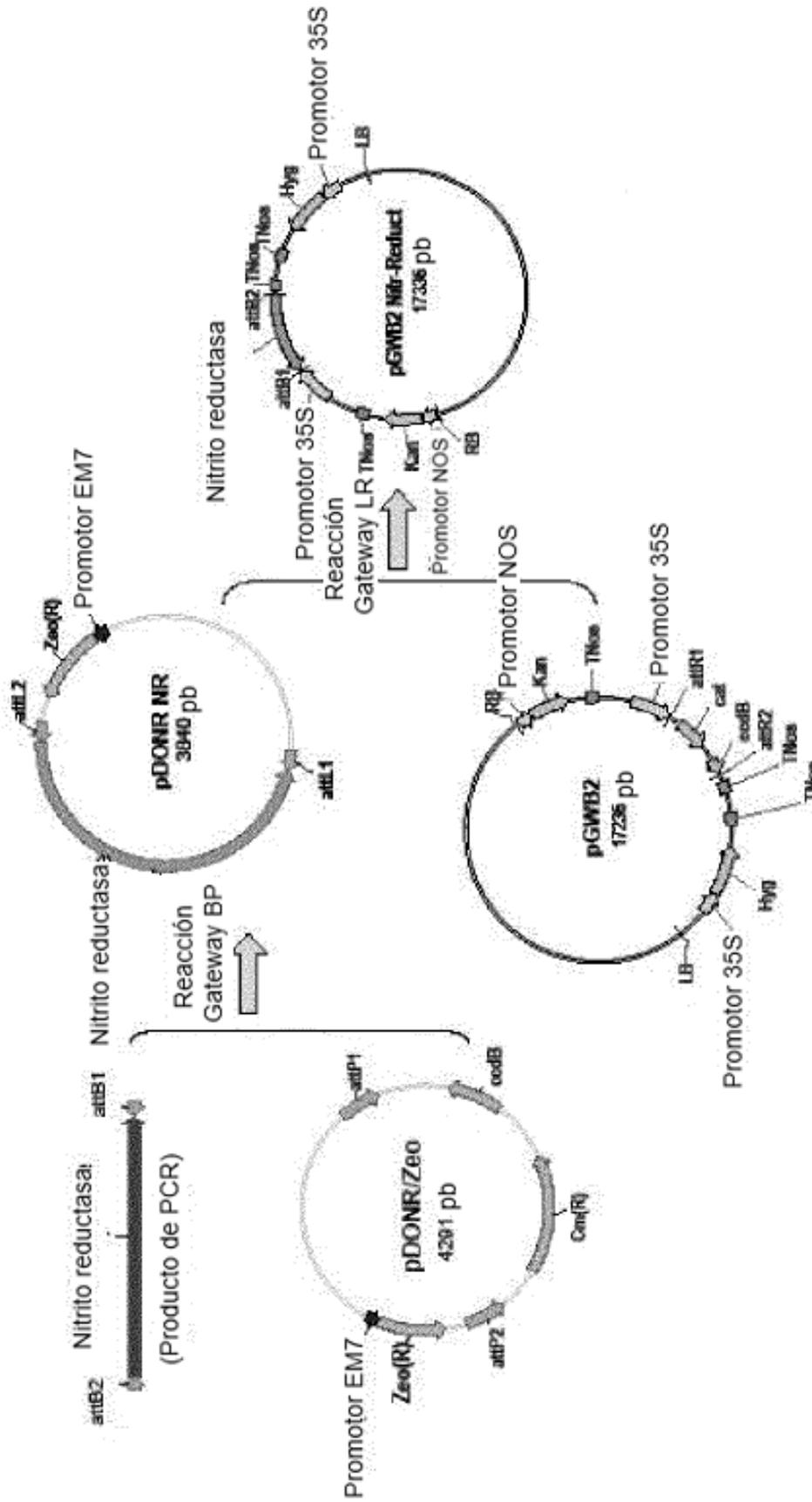


Fig. 40B

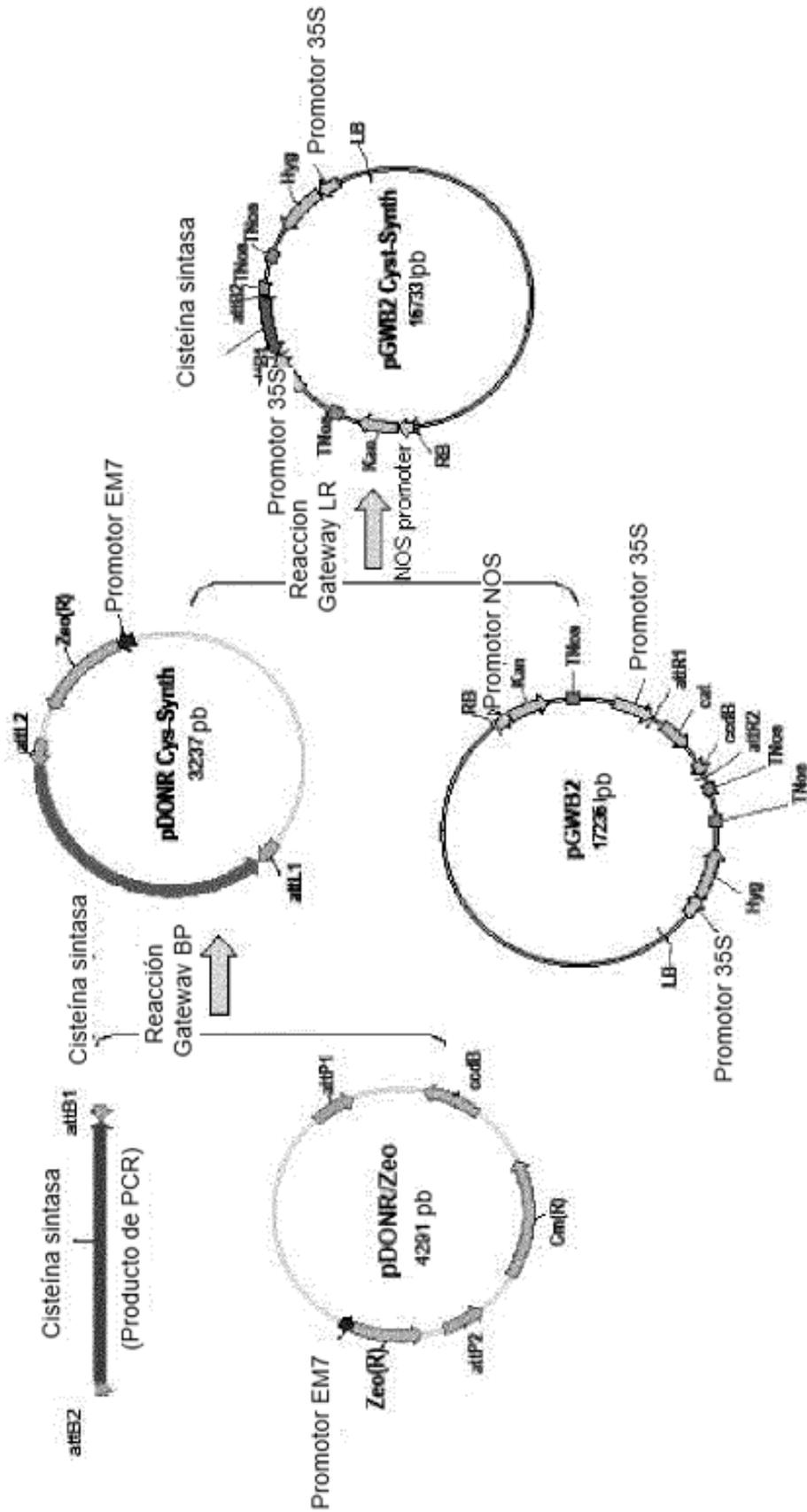
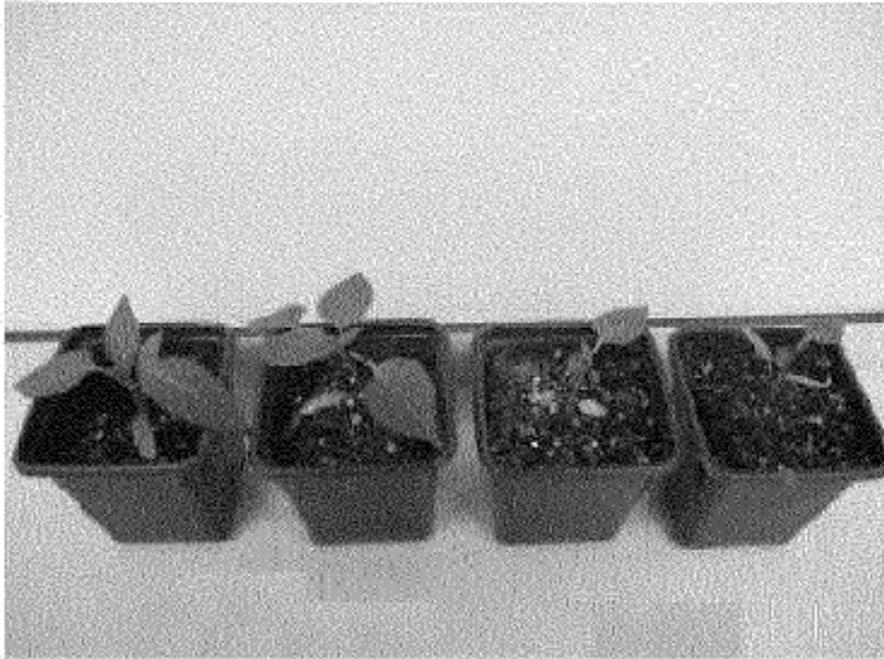


Fig. 40C

A



B

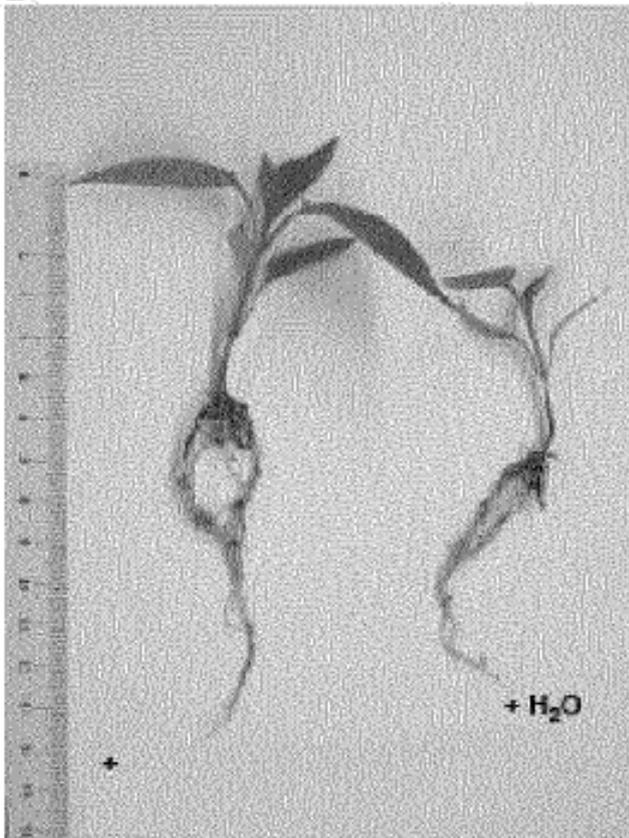
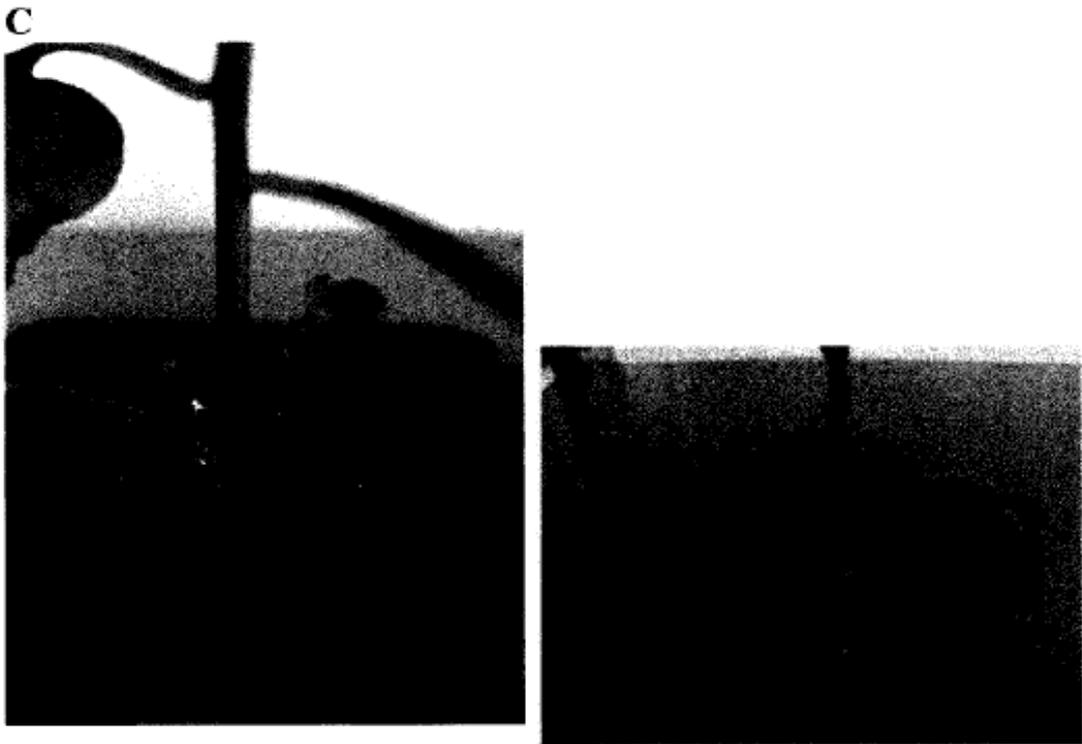


Fig. 4I



+ H₂O
(irrigación)

+ medio de cultivo
(irrigación)



+ medio de cultivo
Volátiles

+H₂O
(irrigación)

+ medio de cultivo
(irrigación)

Fig. 41 (cont)

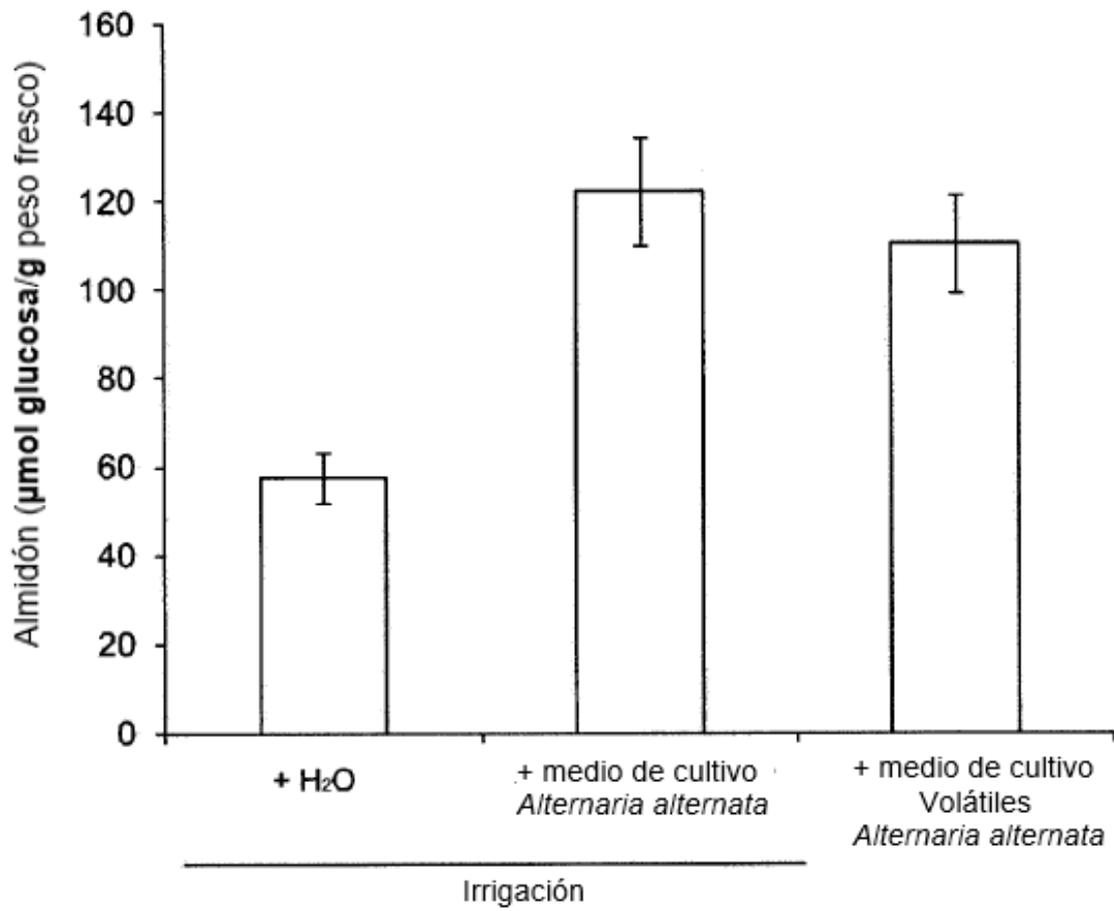


Fig. 42