

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2009/138535 A1**

(43) Fecha de publicación internacional  
19 de noviembre de 2009 (19.11.2009)

PCT

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:  
C12N 15/82 (2006.01) A01H 5/00 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2009/000242
- (22) Fecha de presentación internacional:  
6 de mayo de 2009 (06.05.2009)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:  
P200801366 12 de mayo de 2008 (12.05.2008) ES
- (71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US): **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA** [ES/ES]; Camino De Vera S/n, E-46022 Valencia (ES).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **RUBIO NOVELLA, Silvia** [ES/ES]; Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Departamento Biología del Estrés, Camino Vera s/n, E-46022 Valencia (ES). **RODRÍGUEZ EGEA, Pedro Luis** [ES/ES]; Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Departamento Biología del Estrés, Camino Vera s/n, E-46022 Valencia (ES).
- (74) Mandatarios: **ARIZTI ACHA, Monica** et al.; Hermosilla, 3, E-28001 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicada:
- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
  - antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))
  - con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: USE OF ENZYME PHOSPHOPANTETHEINE ADENYLYLTRANSFERASE, WHICH IS INVOLVED IN COENZYME A BIOSYNTHESIS, IN IMPROVING PLANT GROWTH AND RESISTANCE TO SALINE/OSMOTIC STRESS, INCREASING RESERVE LIPIDS AND MODIFYING AMINO ACID CONTENT

(54) Título: UTILIZACIÓN DEL ENZIMA FOSFOPANTETEINA ADENILTRANSFERASA, IMPLICADO EN LA BIOSÍNTESIS DEL COENZIMA A, EN LA MEJORA DEL CRECIMIENTO VEGETAL, RESISTENCIA AL ESTRÉS SALINO/OSMÓTICO, INCREMENTO DE LÍPIDOS DE RESERVA Y MODIFICACIÓN DEL CONTENIDO AMINOACÍDICO

(57) Abstract: The invention relates to the use of the gene encoding phosphopantetheine adenylyltransferase (PPAT) as a regulator of CoA biosynthesis for the generation of new plant varieties having improved growth, resistance to osmotic and saline stress, increased lipid content in the seeds thereof and an altered amino acid composition. Specifically, the invention relates to the use of said gene as a regulator of CoA biosynthesis in plants in order to modify the phenotype of the plant, and to the genetically modified plants obtained, which have improved growth, resistance to osmotic and saline stress and seed lipid content over non-modified plants and which have an altered amino acid composition.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a la utilización del gen que codifica la fosfopanteteina adenil transferasa (PPAT) como regulador de la biosíntesis de CoA para la generación de nuevas variedades vegetales que presentan crecimiento mejorado, resistencia al estrés osmótico y salino, aumento del contenido en lípidos en sus semillas y composición aminoacídica alterada. Concretamente la invención se refiere a la utilización de este gen como regulador de la biosíntesis de CoA en plantas para modificar el fenotipo de la planta, así como a las plantas obtenidas genéticamente modificadas, cuyo crecimiento, resistencia a estrés osmótico y salino y contenido en lípidos de sus semillas es mayor que en las plantas sin modificar, y que presentan su composición aminoacídica alterada.



WO 2009/138535 A1

UTILIZACION DEL ENZIMA FOSFOPANTETEINA ADENILTRANSFERASA,  
IMPLICADO EN LA BIOSÍNTESIS DEL COENZIMA A, EN LA MEJORA DEL  
CRECIMIENTO VEGETAL, RESISTENCIA AL ESTRÉS SALINO/OSMÓTICO,  
INCREMENTO DE LÍPIDOS DE RESERVA Y MODIFICACIÓN DEL CONTENIDO  
5 AMINOACÍDICO

### SECTOR TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la utilización del gen que codifica la fosfopanteteina adeniltransferasa (PPAT) como regulador de la biosíntesis de CoA para la generación de nuevas variedades vegetales que presentan crecimiento mejorado, resistencia al estrés osmótico y salino, aumento de contenido en lípidos en sus semillas y composición aminoacídica alterada. Concretamente, la invención se refiere tanto a la utilización de este gen como regulador de la biosíntesis de CoA como a las plantas obtenidas, genéticamente modificadas que presentan su fenotipo modificado, cuyo crecimiento, resistencia a estrés osmótico y salino y contenido en lípidos de sus semillas es mayor que en las plantas sin modificar, y que presentan su composición aminoacídica alterada.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La coenzima A (CoA) es un cofactor esencial en numerosas rutas biosintéticas, degradativas y metabólicas productoras de energía (Begley et al., 2001). La síntesis de CoA, partiendo de pantotenato como precursor, se produce en cinco etapas y se han clonado las correspondientes enzimas biosintéticas tanto en procariontes como en eucariotes superiores (Begley et al., 2001; Daugherty et al., 2002; Kupke et al., 2003; Leonardi et al., 2005). La ruta universal para la biosíntesis de CoA a partir de pantotenato está iniciada por la fosforilación de este precursor para generar 4'-fosfopantotenato, que está catalizada por la pantotenato kinasa (PK, CoaA). En organismos unicelulares y sistemas animales, la velocidad de biosíntesis de CoA parece estar regulada mediante inhibición por retroalimentación de PK. Recientemente, se han caracterizado dos PK de plantas, concretamente AtPANK1 y AtPANK2 en Arabidopsis y, como resultado, se encontró que un doble mutante *pank1-1pank2-1* era letal para los embriones (Tilton et al., 2006). La segunda etapa de la biosíntesis de CoA supone la adición de cisteína a 4'-fosfopantotenato mediada por 4'-fosfo-N-pantotenoilcisteín sintetasa (PPCS, CoaB). En la siguiente etapa, la 4'-fosfo-N-pantotenoilcisteín descarboxilasa (PPCDC, CoaC) cataliza

la generación de 4'-fosfopanteteína. Dos genes de Arabidopsis, AtHAL3A y AtHAL3B, codifican para enzimas PPCDC esenciales, y una inactivación combinada de ambos genes abortó la embriogénesis en la fase globular temprana (Rubio et al., 2006). La penúltima etapa en la ruta biosintética de CoA está catalizada por la enzima 4'-fosfopanteteína adeniltransferasa (PPAT, CoaD), que cataliza la adenilación reversible de 4'-fosfopanteteína para formar 3'-desfosfo-CoA (dPCoA) y pirofosfato (PPi) (véase más adelante la figura 5a). Finalmente, la desfosfo-CoA kinasa (DPCK, CoaE) cataliza la última etapa de la ruta biosintética de CoA, que supone la fosforilación del grupo 3'-hidroxilo del resto del azúcar ribosa de dPCoA para formar CoA y ADP.

10 Considerando el papel fundamental de CoA en el metabolismo de las plantas, el análisis de mutantes con alteración en la biosíntesis de CoA ha recibido una atención limitada (Rubio et al., 2006; Tilton et al., 2006). Recientemente, hemos notificado que un doble mutante HAL3A-1HAL3B-1 era letal para los embriones, mientras que las plántulas que eran nulas para HAL3A y heterocigóticas para HAL3B (mutante aaBb hal3),  
15 presentaron un fenotipo dependiente de sacarosa (Sac) para el establecimiento de las plántulas (Rubio et al., 2006).

La presente solicitud de patente, se centra en la siguiente etapa de la biosíntesis de CoA, que está catalizada por la enzima PPAT. Los estudios en sistemas modelo de los productos intermedios en la biosíntesis de CoA han mostrado que, además del control  
20 de la síntesis al nivel de PK, la modulación adicional del flujo a través de la ruta se produce en PPAT, ya que tanto pantotenato como 4'-fosfopanteteína pueden acumularse en la célula en condiciones limitantes para la biosíntesis de CoA (Jackowski y Rock, 1984; Rock et al., 2000). En seres humanos, ambas actividades PPAT y DPCK están codificadas en un único gen que da lugar a una enzima bifuncional denominada CoA sintasa (Daugherty et al., 2002). Por el contrario, las plantas tienen diferentes enzimas  
25 monofuncionales codificadas por genes distintos (Kupke et al., 2003).

Así, se ha identificado el producto génico PPAT de Arabidopsis por su fuerte homología con el equivalente en seres humanos en CoA sintasa, y se ha confirmado su actividad bioquímica in vitro (Kupke et al., 2003).

30 Esta solicitud de patente presenta el análisis de mutantes de ganancia de función y reducción de función en PPAT, proporcionando una evidencia de su función sobre el crecimiento de las plantas, la resistencia al estrés osmótico y el metabolismo de los lípidos, llegando a la conclusión de que las plantas que sobreexpresan PPAT, presentan

crecimiento mejorado, resistencia al estrés osmótico, aumento de contenido en lípidos en sus semilla y composición aminoacídica modificada.

### OBJETO DE LA INVENCION

El objeto de la presente invención se refiere a la utilización del gen que codifica la fosfopanteteina adeniltransferasa (PPAT) de *Arabidopsis thaliana* (SEQ. ID. NO:2) (Gen At2g18250) como regulador de la biosíntesis de CoA plantas para modificar el fenotipo de la planta de manera que la planta resultante presente crecimiento mejorado, resistencia al estrés osmótico, aumento de contenido en lípidos en sus semillas y composición aminoacídica alterada.

Otro objeto de la presente invención se refiere al uso del gen que codifica la PPAT en especies de interés agronómico e industrial como regulador de la biosíntesis de CoA en plantas. Este uso conlleva la sobreexpresión de PPAT conduciendo a la generación de plantas que presentan crecimiento y resistencia al estrés osmótico mejorados así como mayor contenido en lípidos de sus semillas y composición aminoacídica alterada en comparación con plantas de tipo silvestre.

Como regulador se entiende el gen, y por tanto la proteína (enzima) por él codificada que regula la ruta de biosíntesis (o parte de la ruta que subyace ) de CoA, cuya función está relacionada con el crecimiento de las plantas, su resistencia al estrés osmótico, el contenido en lípidos de sus semillas y el metabolismo de aminoácidos.

Como gen que codifica la PPAT en especies de interés agronómico e industrial se entiende tanto el gen PPAT como secuencias homólogas de genes PPAT de otros organismos y con función equivalente a la PPAT de *Arabidopsis* (Figura 13).

Entre estas especies de interés agronómico e industrial se incluyen, aunque no de forma exclusiva: arroz, colza, col, chopo, vid, tomate, patata, leguminosas, maíz, soja, algodón, etc. Puesto que el gen que codifica la enzima PPAT está conservado desde musgo hasta especies arbóreas (píceas, chopo) y desempeña una función imprescindible en la célula vegetal, es razonable suponer que está conservado en todas las especies vegetales. De hecho se muestra en la Figura 13 que el producto génico PPAT está presente en aquellos genomas vegetales disponibles en bases de datos públicas.

En la descripción de la invención, se realizan estudios sobre la implicación del gen PPAT en el aumento o disminución del crecimiento de las plantas, su resistencia al estrés osmótico, el contenido en lípidos de sus semillas y la alteración de su composición aminoacídica. Los experimentos se realizan con la línea mutante *ppat-1* que muestra una reducción de un 90% en la expresión de PPAT, generada por inserción de ADN-T en el

gen PPAT (SEQ. ID. NO: 2) de *Arabidopsis*, así como con la línea de sobreexpresión de PPAT OE, generada por transformación de plantas de tipo silvestre con una copia adicional del gen que codifica la PPAT.

Otro objeto de la presente invención se refiere a las plantas obtenidas, genéticamente modificadas, cuyo crecimiento, resistencia a estrés osmótico y salino y contenido en lípidos de sus semillas es mayor que en las plantas sin modificar, y que presentan su composición aminoacídica modificada.

Otro objeto de la invención se refiere a las semillas producidas por las plantas modificadas genéticamente, que sobreexpresan PPAT, caracterizadas por presentar mayor contenido en ácidos grasos en las semillas, que las semillas de plantas silvestres.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de las semillas y plantas transgénicas, que sobreexpresan PPAT, caracterizado porque los aceites vegetales obtenidos de las mismas son para uso en alimentación o en la industria del biodiesel.

Otro objeto de la invención se refiere a las semillas y plantas transgénicas, que sobreexpresan PPAT, caracterizadas por presentar su composición aminoacídica modificada.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de las semillas y plantas transgénicas, que sobreexpresan PPAT, caracterizadas por presentar su composición aminoacídica modificada en la industria alimenticia.

20

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1.** Caracterización molecular del mutante ppat-1. (a) Esquema del gen PPAT (SEQ. ID. NO: 2) y localización de la inserción de ADN-T. La numeración comienza en el codón de iniciación de la traducción ATG. Se indica el cebador del extremo izquierdo de ADN-T (LBb1) que se utilizó para ubicar la inserción de ADN-T. Los recuadros negros representan exones. (b) Análisis de RT-qPCR de la expresión de PPAT en ARN de tipo natural y de ppat-1 preparados a partir de hojas en roseta de 3 semanas. Los datos son promedios  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. Se usó la expresión de  $\beta$ -actina-8 para normalizar los datos

**Figura 2.** Fenotipo de crecimiento del mutante ppat-1 y la complementación genética. (a) Crecimiento de la línea de tipo natural (wt), ppat-1 y complementada (Comp) en medio complementado con sacarosa al 1% (+Sac) o que carece de Sac (-Sac). (b) Cuantificación del crecimiento de raíces. Los valores son promedios  $\pm$  DE (n=100). (c, d)

30

Crecimiento de plántulas y establecimiento de plantas wt, *ppat-1* y *aaBb*. La barra de escala corresponde a 1 cm. Los valores en d son promedios  $\pm$  DE para tres experimentos independientes (200 semillas cada uno). (e) Crecimiento en suelo de la línea wt, *ppat-1* y complementada, y cuantificación del área de la hoja. Los valores son promedios  $\pm$  DE (n=20). (f) Producción de semillas. Los valores son promedios  $\pm$  DE (n=20).

**Figura 3.** Fenotipo de las líneas OE de PPAT. (a) Se determinó la suma de los niveles de CoA y AcCoA en plántulas de 12 días a partir de líneas de tipo silvestre, *ppat-1* y OE de PPAT hechas crecer en medio complementado con sacarosa al 1% (+Sac) o que carecen de Sac (- Sac). Los valores son promedios  $\pm$  EE de dos experimentos independientes. Los valores de las líneas OE representan los datos de pools de tres líneas independientes. (b, c) Aumento del crecimiento de hojas en las líneas OE de PPAT en comparación con las plantas de tipo silvestre. Cuantificación del área de la hoja y fotografía de las plantas hechas crecer en el suelo durante 2 semanas. Los valores son promedios  $\pm$  EE (n=20). \* Indica  $P < 0,01$  (prueba de la t de Student) con respecto a wt. (d) Aumento del crecimiento reproductor de las líneas OE en comparación con las plantas wt. (e) Crecimiento de las líneas wt y OE en medio +Sac o -Sac. (f) Cuantificación tanto del crecimiento de raíces como del peso fresco para las líneas wt y OE en medio +Sac o - Sac. Se muestra una línea OE representativa en (d), (e) y (f).

**Figura 4** Aumento de la resistencia tanto al estrés salino como osmótico en las líneas OE en comparación con wt. Las plántulas hechas crecer en medio que contenía sacarosa al 1% se transfirieron a medio complementado con NaCl 75 mM (Na1), NaCl 125 mM (Na2), manitol 150 mM (M1) o manitol 250 mM (M2), en presencia o ausencia de sacarosa exógena. Las plántulas control (C) se transfirieron a medio que carecía de NaCl o manitol para medir el crecimiento en ausencia de estrés. Se muestra una línea OE representativa a partir de tres líneas independientes. (a) Fotografía representativa tomada tras 11 días. Las barras de escala corresponden a 4 cm. (b) Cuantificación del peso fresco (FW) tras 11 días. Los datos de las plántulas control corresponden al 50% de los verdaderos valores. (c) Cuantificación del crecimiento de raíces primarias tras 7 días. (d) Cuantificación del crecimiento de raíces secundarias tras 11 días. Los valores son promedios  $\pm$  EE para dos experimentos independientes (30 plántulas cada uno). (e) Determinación del contenido en prolina en líneas wt y OE tras el tratamiento con NaCl 125 mM durante 48 h.

**Figura 5.** Caracterización bioquímica de la enzima PPAT en la reacción inversa. (a) Esquema de la reacción reversible catalizada por PPAT. (b) Proteína de fusión MBP-PPAT recombinante en extracto bruto de *E. coli* (1) y tras la purificación mediante

cromatografía de afinidad (2). Se indica el peso molecular aparente de la proteína. (c) Cinética enzimática de MBP-PPAT recombinante. Se sometió a ensayo la enzima (40 nM) tal como se describe en los procedimientos experimentales y se monitorizó la velocidad de reducción de NADP en NADPH midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm. Se realizó el análisis de regresión de los datos ( $R^2=0,99$ ) usando el software Microsoft Excel con el fin de calcular la velocidad inicial ( $V_0$ ) de la reacción a diferentes concentraciones de sustrato. (d) Inhibición de la actividad de PPAT por CoA ( $\Delta$ ) y AcCoA ( $\blacksquare$ ). Los valores son promedios  $\pm$  DE para dos experimentos independientes. Se realizó el análisis de regresión de los datos usando el software Graph Pad 4.0.

10 **Figura 6.** Mediciones de ácidos grasos (AG) y acilCoA. (a) Contenido total en AG en semillas secas de los genotipos indicados. (b) Contenido en acilCoA en plántulas hechas crecer en +Sac al 1% o -Sac a los 5 DAI. (c, e) Contenido total en AG a los 0, 2 y 5 DAI de plántulas hechas crecer con +Sac al 1% o -Sac, respectivamente (d, f) Contenido en ácido eicosaenoico a los 0, 2 y 5 DAI de plántulas hechas crecer con +Sac o -Sac, respectivamente. Los valores son promedios  $\pm$  DE para 5 determinaciones separadas, expresados en una base de por semilla/plántula; \* indica  $P<0,03$  (prueba de la t de Student) en comparación con los datos de cada genotipo y wt en las mismas condiciones de crecimiento.

20 **Figura 7.** Velocidad de crecimiento en suelo de las líneas de tipo silvestre (wt), *ppat-1*, complementadas (Comp) y de sobreexpresión (OE). Se llevó a cabo un experimento en el tiempo para medir el número de hojas en roseta por planta a los 2, 5, 10, 12 y 15 días tras la transferencia al suelo de plántulas de 5 días de los fenotipos indicados. Los valores son promedio  $\pm$  SD (n=20). Se muestra una línea OE representativa.

25 **Figura 8.** Mayor producción de semillas de las líneas OE en comparación con el tipo silvestre. Los valores son promedio  $\pm$  SD de dos experimentos independientes (n=20). Los valores de las líneas OE representan datos de pool de tres líneas independientes.

30 **Figura 9.** Mayor generación de raíces secundarias en las líneas OE que las de tipo natural. Las plántulas crecidas en medio con 1% de sacarosa fueron transferidas a un medio suplementado con 125nM de NaCl o 250 mM de manitol, en presencia o ausencia de sucrosa exógena. Las plántulas control (C) fueron transferidas a un medio carente de NaCl o manitol para medir el crecimiento en ausencia de estrés. Fotografía

representativa tomada pasados 11 días. Las barras de escala corresponden a 4 cm. Se muestra una línea OE representativa de tres líneas independientes..

**Figura10.** Contenido en Acidos Grasos principales a partir de las líneas de tipo silvestre Col, ppat-1, complementadas (Comp) y de sobreexpresión (OE). Los valores son promedio  $\pm$  DE para 5 determinaciones separadas, expresados por semilla. El contenido de ácido oleico (18:1), linoleico (18:2), linolénico (18:3) y eicosanoico (20:1) fueron entre un 35-50% superior en las líneas OE que en las de tipo silvestre.

**Figura11.** Contenido en aminoácidos de plantas silvestres Col (Col) y líneas de sobreexpresión (OE). La determinación del contenido de aminoácidos (expresado en ng) se realizó mediante HPLC/MS en extractos de 30 plántulas, las cuales fueron crecidas en medio con 1% sacarosa (plus suc), sin sacarosa (minus suc), con 1% sacarosa y 125 mM NaCl (plus suc, plus salt) o bien sin sacarosa y 125 mM NaCl (minus suc plus salt).

**Figura12.** Representación gráfica de la modificación encontrada en los aminoácidos prolina (**A**) y glutamina (**B**)

**Figura 13.** Alineamiento de la proteína PPAT de *Arabidopsis thaliana* (query) con algunas proteínas ortólogas (con función equivalente) de otras especies vegetales: vid (*Vitis vinifera*), arroz (*Oryza sativa*), píceas (*Picea sitchensis*), musgo (*Physcomitrella patens*), colza (*Brassica napus*), col silvestre (*Brassica oleracea*), tomate (*Solanum lycopersicum*), patata (*Solanum tuberosum*), chopo (*Populus trichocarpa*). Se llevó a cabo una búsqueda en la base de datos <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (la cual incluye secuencias génicas y productos génicos de vid, arroz, píceas, musgo, colza y col), la base de datos de especies de solanáceas <http://www.sgn.cornell.edu/> (la cual incluye secuencias génicas y productos génicos de tomate y patata) y la base de datos del chopo ([http://genome.jgi-psf.org/Poptr1\\_1/Poptr1\\_1.home.html](http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html)). El gen que codifica las proteínas ortólogas en estas especies vegetales está indicado en el encabezamiento de cada uno de los alineamientos.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Tanto las bacterias como los organismos eucariotas siguen una ruta universal de cinco etapas para sintetizar CoA a partir de pantotenato. En las plantas, se ha notificado que dobles mutaciones nulas que conducen a un bloqueo completo de o bien la primera o bien la tercera etapa de la ruta biosintética de CoA, es decir de las actividades de PK y PPCDC, son letales para los embriones (Tilton *et al.*, 2006; Rubio *et al.*, 2006).

Con el propósito de averiguar la función del gen PPAT, la presente solicitud de patente lleva a cabo el estudio de una mutación de reducción de función viable que afecta a la penúltima etapa de la ruta biosintética de CoA, para estudiar su impacto sobre el crecimiento de las plantas y la respuesta al estrés. Así, se demuestra que la función de PPAT está relacionada con el crecimiento de las plantas y la resistencia al estrés, y el aumento de la biosíntesis de CoA a través de la sobreexpresión de PPAT, condujo a plantas con mayor vigor y resistencia al estrés que plantas de tipo silvestre. Por tanto, la presente invención amplía el conocimiento existente sobre la biosíntesis de CoA en plantas y su impacto sobre el crecimiento y la tolerancia al estrés.

El mutante *ppat-1* estudiado por el presente documento muestra una alteración notable en el crecimiento, que es evidente tanto en ausencia como en presencia de sacarosa exógena. Sin embargo, se observó que la expresión restante de *PPAT* es suficiente para el establecimiento de las plántulas, aunque el crecimiento adicional se vio alterado gravemente en comparación con las plantas de tipo silvestre. Así mismo, durante el crecimiento fotoautótrofo, se vieron alterados tanto el crecimiento vegetativo como reproductor en *ppat-1*. Resulta probable que estos fenotipos sean un reflejo del papel clave desempeñado por CoA en una multitud de reacciones enzimáticas, tales como la oxidación de los ácidos grasos, hidratos de carbono y aminoácidos, así como muchas reacciones biosintéticas (Begley *et al.*, 2001).

Así, con el fin de comprobar que, además del papel bien conocido tanto en el metabolismo primario como en el secundario, los efectos reguladores inesperados de CoA pueden ser responsables en parte de esta alteración del crecimiento (por ejemplo, efectos sobre la expresión génica a través de la modulación de la acetilación de histonas mediante los niveles de AcCoA), se complementaron los defectos de crecimiento de *ppat-1* con la introducción de una copia de *PPAT* de tipo silvestre bajo el control del promotor 35S. Aunque la mayor parte de las características de las líneas complementadas fueron similares a las de tipo silvestre, el contenido en ácidos grasos fue mayor que en las de tipo silvestre, de alguna manera asemejándose a una línea de sobreexpresión débil.

Por ello, se quiso comprobar si la introducción de PPAT (SEQ. ID. NO:2) bajo el control de un promotor 35S del VMCo pudiera conducir a niveles de expresión mayores de PPAT en ciertos tejidos que los obtenidos a partir del promotor nativo.

La sobreexpresión de *PPAT* condujo a un aumento del crecimiento vegetativo en comparación con el tipo natural. Por tanto, durante el crecimiento fotoautótrofo en el suelo, tanto el crecimiento vegetativo como el reproductor fueron mayores en las líneas

OE que en las plantas de tipo silvestre (figura 3). De manera similar, tanto el crecimiento de raíces como el peso fresco fueron mayores en las plántulas procedentes de las líneas OE hechas crecer *in vitro* en ausencia de Sac.

El aumento de la biomasa de raíces se asocia normalmente con un aumento de la tolerancia a la sequía (Park *et al.*, 2003; Verlues *et al.*, 2006). Las líneas OE, que mostraron mayor crecimiento de raíces que las de tipo natural en condiciones sin estrés, también mostraron mayor crecimiento de raíces primarias y secundarias que las plantas de tipo silvestre en condiciones de estrés. Como resultado, se encontró una mejor integración del crecimiento de las plantas con el estrés ambiental en estas líneas OE.

Sin embargo, es difícil establecer la verdadera magnitud de la implicación de CoA en la tolerancia osmótica. Por tanto, además de evitar el estrés mediante el aumento de la biomasa de raíces, podría conseguirse tolerancia al estrés a través tanto de la acumulación de solutos compatibles como de diferentes cambios metabólicos que evitan el daño celular provocado por la pérdida de agua. En relación con este aspecto, la presente invención muestra de manera interesante que, en condiciones de estrés osmótico, las líneas OE sintetizan niveles de prolina 2 veces mayores que las de tipo silvestre en medio carente de Sac exógena (figura 4e). Así mismo se comprobó que la Sac exógena estimuló 2 veces la síntesis de prolina en el tipo silvestre, mientras que tuvo un efecto moderado sobre las líneas OE.

Por tanto, la presente invención muestra que las líneas OE parecen ser menos dependientes que las de tipo silvestre de la complementación exógena de Sac para sintetizar prolina, hecho que se considera ventajoso para soportar el estrés hídrico, ya que se ven alterados la reducción de carbono y el transporte del floema en estas condiciones (Wardlaw, 1967; Tully *et al.*, 1979). La prolina se sintetiza principalmente a través de una ruta derivada del glutamato y, por tanto, la estructura principal del esqueleto de carbono se deriva del ciclo del ácido cítrico. Las líneas OE de PPAT de la presente invención tienen mayores niveles de CoA y AcCoA que las de tipo silvestre, lo que podría aumentar la síntesis de los diferentes productos intermedios del ciclo del ácido cítrico.

Estudios en *E.* y mamíferos indican que PPAT (SEQ. ID. NO:1) cataliza una etapa reguladora secundaria en la biosíntesis de CoA tras el punto regulador maestro de PK (Jackowski y Rock, 1984; Rock *et coli al.*, 2000; Rock *et al.*, 2003). En *E. coli*, se acumulan tanto pantotenato como 4'-fosfopanteteina en la célula en condiciones limitantes para la biosíntesis de CoA (Jackowski *et al.*, 1984). El aumento del flujo de la

ruta biosintética de CoA a través de la introducción de una versión de PK que no responde a la inhibición por CoA, condujo a una mayor acumulación de 4'-fosfopanteteína que de CoA, que ilustra que PPAT es un segundo sitio para la regulación de la biosíntesis de CoA tras PK (Rock *et al.*, 2003). En mamíferos, se acumula la 4'-fosfopanteteína como el segundo metabolito más abundante de la ruta de la CoA tras el pantotenato, lo que sugiere que tanto PPAT como PK catalizan etapas limitantes de la velocidad en la biosíntesis de CoA (Rock *et al.*, 2000). La sobreexpresión transitoria de PK1 $\beta$  suprimió la acumulación de pantotenato y dio como resultado un aumento de al menos 10 veces de los niveles de CoA intracelular, aunque también se midió una acumulación de 3 veces de 4'-fosfopanteteína (Rock *et al.*, 2000). Estos resultados ilustran que se produce una restricción de la velocidad de flujo tanto en las etapas catalizadas por PK como por PPAT, aunque la regulación en la etapa de PPAT parece ser secundaria a PK (Rock *et al.*, 2000).

A los efectos de estudiar el efecto limitante de PPAT en la producción de CoA, la presente invención comprobó que las líneas de sobreexpresión de *PPAT* contenían un aumento de los niveles de especies de CoA (figuras 3a y 6e), lo que indica que PPAT limita la producción de CoA en plantas en un cierto grado. Desgraciadamente, no pudo demostrarse directamente la actividad de PPAT (SEQ. ID. NO:1) en plántulas u hojas de *Arabidopsis* ni en extractos vegetales brutos ni tras la purificación parcial a través de filtración en gel de Sephadex G-25 y precipitación con sulfato de amonio (datos no mostrados). La abundancia presumiblemente baja de las enzimas de la biosíntesis de CoA podría explicar la no detección de actividad de PPAT en los extractos de plantas. Por ejemplo, la actividad de una enzima de la planta implicada en la biosíntesis del pantotenato sólo podía detectarse en mitocondrias purificadas a actividades específicas de 0,5 nmol/min por mg de proteína (Ottenhof *et al.*, 2004).

La presente invención lleva a cabo la caracterización enzimática de la PPAT de *Arabidopsis*. Para ello, se procedió a medir fácilmente la actividad de PPAT (SEQ. ID. NO:1) utilizando proteína recombinante y proporcionar parámetros cinéticos en el estado estacionario de la enzima (figura 5). La  $K_{cat}$  para PPAT (3,4 s<sup>-1</sup>) fue comparable a la notificada para PPAT de *E. coli* (3,3 s<sup>-1</sup>) y la enzima hepática de cerdo bifuncional (7,7 s<sup>-1</sup>), mientras que la  $K_m$  de PPAT de *Arabidopsis* para dPCoA (37  $\mu$ M) fue notablemente mayor que en las enzimas de bacterias y mamíferos (7 y 11  $\mu$ M, respectivamente) (Geerlof *et al.*, 1999; Aghajanian y Worrall, 2002).

Con el fin de evaluar la relevancia fisiológica del CoA sobre la actividad de PPAT (SEQ. ID. NO:1), se procedió a estimar la concentración de CoA libre en los diferentes

tejidos de la planta, en diferentes fases de desarrollo. Así, esta invención presenta el efecto inhibitor de CoA (CI50= 38  $\mu$ M) sobre la actividad de PPAT. Es difícil estimar con precisión la concentración de CoA libre en los diferentes tejidos de la planta, en diferentes fases de desarrollo (Tumaney *et al.*, 2004). En las hojas de espinaca, la concentración de AcCoA fuera del plastidio (probablemente dominada por el conjunto citosólico) es del orden de 40-65  $\mu$ M (Tumaney *et al.*, 2004). AcCoA está presente en un gran exceso con respecto a CoA libre en las semillas, pero en las hojas de espinaca o en las paredes de la silicua verde, ambas especies de CoA están en el mismo orden de magnitud (Tumaney *et al.*, 2004; Gibon *et al.*, 2002). Además, la CI50 de CoA en la actividad de PPAT es muy próxima a la Km para el sustrato dPCoA. Por tanto, parece razonable que CoA tenga un efecto inhibitor sobre la actividad de PPAT en condiciones fisiológicas que podría actuar como un mecanismo regulador por retroalimentación negativa. De hecho, el CoA está estrechamente unido a la enzima purificada de *E. coli* (Geerlof *et al.*, 1999), y se ha resuelto la estructura cristalina de PPAT de *E. coli* complejada con dPCoA, 4'-fosfopanteteina o CoA (Izard y Geerlof, 1999; Izard, 2002; Izard, 2003). El análisis de la estructura de PPAT:CoA revela que CoA se une al sitio activo de una forma distinta a dPCoA y 4'-fosfopanteteina (Izard, 2003). Estos resultados confirman por tanto que, el CoA no es un sustrato para PPAT y su unión a PPAT sugiere una regulación por retroalimentación negativa sobre la actividad de PPAT, tal como ya se ha establecido para PK (Rock *et al.*, 2003).

Para evaluar el papel regulador de PPAT en la acumulación de ácidos grasos en las semillas, se estudió este aspecto en los mutantes *ppat-1* y *PPAT* (O.E.). La mutación *ppat-1* tuvo un efecto moderado sobre la acumulación de AG en las semillas, mientras que la sobreexpresión de *PPAT* dio como resultado un aumento del 35-50% de algunos AG con respecto al tipo natural (figura 10). La alteración de la biosíntesis de CoA en el mutante *aaBb hal3* tampoco tuvo un efecto importante sobre la acumulación de AG en las semillas (Rubio *et al.*, 2006). Estos resultados sugieren que la expresión residual de *PPAT* y *HAL3B* a lo largo de la vida de la planta proporciona un suministro de CoA suficiente para la biosíntesis de AG. Aunque no se evitó el establecimiento de las plántulas en *ppat-1*, tal como se notificó para *aaBb hal3* (Rubio *et al.*, 2006), se observó una alteración grave del crecimiento temprano de las plántulas en comparación con las plántulas de tipo natural (figura 2c). El catabolismo temprano de los lípidos se detuvo en *ppat-1* cuando el medio se complementó con Sac exógena; mientras que en el medio que carecía de sacarosa exógena, el mutante *ppat-1* no mostró tal fenotipo con alteración drástica, aunque el uso de ácido eicosanoico fue más lento que en el tipo natural (figura

6). El retraso en el consumo de AG en *ppat-1* podría atribuirse a la alteración de la  $\beta$ -oxidación debido a la disminución de la biosíntesis de CoA, tal como se sugirió anteriormente para otro mutante de la ruta biosintética de CoA (Rubio *et al.*, 2006). Por el contrario, la presente invención demuestra que el retraso inesperado en el consumo de AG observado en la línea OE sugiere que el aumento de la biosíntesis de CoA puede conducir o bien a un uso más eficaz de la sacarosa exógena como fuente de energía y/o a un aumento de la sensibilidad a la inhibición relacionada con la señalización de azúcares del catabolismo de los lípidos de reserva.

Finalmente, el aumento de la producción de semillas de las líneas OE de *PPAT* de *Arabidopsis*, junto con la mayor acumulación de AG por semilla, demuestra que el refuerzo de la biosíntesis de CoA constituye un enfoque para la obtención por ingeniería genética de semillas de cultivo con mayor rendimiento de aceite.

Así mismo, las plantas y semillas obtenidas a partir de la invención presentan su composición aminoacídica alterada (Figuras 11 y 12) con respecto a las plantas silvestres, presentando gran utilidad en la industria de la alimentación animal

Así, en conclusión, es evidente el interés de la presente invención en la producción mejorada de aceites vegetales tanto para su uso en alimentación como de biodiesel. Adicionalmente, el aumento del crecimiento vegetativo y reproductor, así como la mejora concomitante en la resistencia al estrés osmótico de las líneas OE de *PPAT* y la alteración de su composición aminoacídica, hacen que la presente invención sea de gran interés para la obtención por ingeniería genética de cosechas con una mayor producción de biomasa y para ofrecer soluciones sostenibles a largo plazo para el uso de los terrenos agrícolas.

## **Aislamiento y caracterización de una mutación por inserción de ADN-T en el gen *PPAT* de *Arabidopsis***

Se identificó un alelo alterado por ADN-T de *PPAT* en la colección de SALK (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tadnexpress>), correspondiente al número de reserva de donante SALK\_093728 y designado como *ppat-1* (figura 1a). La inserción de ADN-T en *ppat-1* se ubica en el segundo intrón, 652 nucleótidos en sentido 3' del codón de iniciación ATG. Se identificaron tres líneas de ADN-T adicionales en las proximidades de la unidad de transcripción de *PPAT*, pero no afectaron significativamente a la expresión del gen *PPAT* (datos no mostrados). El mutante *ppat-1* mostró una reducción de un ~90% en la expresión de *PPAT* en comparación con el tipo natural (figura 1b). El análisis por

PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) detectó sistemáticamente una expresión residual de un ~10%, lo que sugiere que se produjo en cierto grado corte y empalme del intrón en el que se insertó el ADN-T.

Se observó una grave alteración en el crecimiento vegetativo para las plántulas de *ppat-1* tanto en medio que carece de o complementado con Sac al 1% (figura 2a y 2b); no obstante, el fenotipo no tuvo una alteración tan grave como la de las plántulas con *aaBb hal3* en medio que carece de sacarosa (Rubio et al., 2006) (figura 2c), y a diferencia de la progenie con *aaBb hal3*, no se vio comprometido el establecimiento de las plántulas en *ppat-1* (figura 2d). El mutante *ppat-1* era viable pero el porcentaje de supervivencia tras la transferencia de las plántulas germinadas en placas de MS al suelo fue inferior al 30% (datos no mostrados). El posterior crecimiento en el suelo y la producción de semillas de plantas con *ppat-1* se redujeron en comparación con las plantas de tipo natural (figura 2e y 2f). En general, se vio afectado el crecimiento reproductor en plantas con *ppat-1*, ya que estaban presentes menos tallos con inflorescencia por planta (véase más adelante la figura 3d). Con el fin de verificar que los fenotipos observados eran una consecuencia de la expresión alterada de *PPAT*, se generaron líneas de complementación para *ppat-1*. Con este fin, se puso ADNc de *PPAT* bajo el control del promotor 35S y se introdujo en *ppat-1* mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Se seleccionaron los transformantes primarios (T1) por su resistencia a la higromicina y se obtuvo una población T3 homocigótica para el transgén. La introducción de un alelo de *PPAT* de tipo natural complementó los fenotipos descritos anteriormente (figura 2; véase más adelante la figura 3d), lo que demostró que una mutación de reducción de función en *PPAT* era responsable de estos fenotipos.

## 25 **La sobreexpresión de PPAT conduce a un aumento del crecimiento y/o a la resistencia al estrés salino/osmótico**

Las plantas que sobreexpresan el gen que codifica la PPCDC de AtHAL3A muestran una velocidad de crecimiento más rápida y una tolerancia al estrés salino y osmótico mejorada (Espinosa-Ruiz et al., 1999). La sobreexpresión de *HAL3* de *Nicotiana tabacum* también aumenta la tolerancia al estrés salino y osmótico en células de tabaco en cultivo (Yonamine et al., 2004). Estos resultados sugieren que la regulación de la biosíntesis de CoA parece desempeñar un papel importante en la integración del crecimiento de las plantas y la resistencia al estrés. Para someter a prueba la magnitud de esta hipótesis, se generaron líneas de sobreexpresión (OE) de *PPAT* en una referencia de tipo silvestre. Se seleccionaron tres líneas homocigóticas para el marcador

de selección en la generación T3 y se usaron para análisis adicionales. Se determinó la cantidad combinada de CoA libre y acetil-CoA usando el ensayo espectrofotométrico de ciclación de enzimas descrito originariamente por Allred y Guy (1969) (figura 3a). Las líneas OE mostraron niveles 1,6-7 veces mayores en promedio de CoA libre + acetil-CoA que los de tipo natural (figura 3a). Por el contrario, el mutante *ppat-1* mostró una reducción de o bien un ~60% o bien un ~80% en comparación con el tipo natural en medio +Sac o -Sac, respectivamente (figura 3a). Aunque se redujo el crecimiento de hojas en plantas *ppat-1* en comparación con las de tipo silvestre (figura 2d), las líneas OE mostraron un aumento del crecimiento de hojas (figura 3b y 3c). La velocidad de crecimiento, estimada a partir del número de hojas en roseta por planta en un periodo de tiempo, no se vio alterada significativamente en las líneas OE (figura 7), aunque la producción de tallos florales fue 2 días más rápida en promedio en las líneas OE en comparación con las de tipo natural (18±1 días en las líneas OE, 20±1 días en wt). Adicionalmente, el crecimiento reproductor (figura 3d) y la producción de semillas (figura 8) fueron significativamente mayores en las líneas OE que en las de tipo natural. Las plántulas procedentes de las líneas OE hechas crecer en medio que carece de sacarosa mostraron tanto un peso fresco como un crecimiento de raíces mayores que en las de tipo silvestre (figura 3e y 3f). Estas diferencias se atenuaron cuando se hicieron crecer las plantas en medio complementado con sacarosa (figura 3e y 3f).

Para someter a prueba la sensibilidad al estrés salino y osmótico de las líneas OE, se transfirieron plántulas de 7 días hechas crecer en medio que contenían sacarosa al 1% a medio complementado con o bien NaCl o bien manitol, ambos en ausencia o presencia de sacarosa (figura 4). En comparación con las plantas de tipo silvestre, las líneas OE mostraron un peso fresco y un crecimiento de raíces primarias mayores en condiciones de estrés salino y osmótico (figuras 4b y c). Teniendo en cuenta que en ausencia de estrés, las líneas OE también mostraron un crecimiento mayor que las de tipo natural, la inhibición del crecimiento inducida por el aumento de la resistencia al estrés salino y osmótico podría ser, al menos parcialmente, una consecuencia del aumento del vigor observado en estas líneas. En estas condiciones de baja disponibilidad de agua, se observó una drástica reducción en el número y la longitud de las raíces secundarias en las plantas de tipo natural (figura 4d; figura 9). Las líneas OE experimentaron una reducción menos grave y la biomasa total de raíces fue notablemente mayor que en las plantas de tipo silvestre (figura 4d; figura 9). Una explicación parcial del crecimiento mejorado con estrés osmótico observado en las líneas OE podría ser un aumento de la acumulación de osmolitos compatibles, tales como

prolina. De hecho, el ajuste osmótico debido a un aumento de la deposición de prolina desempeña un papel importante en el mantenimiento del alargamiento de las raíces a bajos potenciales hídricos (Voetberg y Sharp, 1993). La figura 4e muestra que las líneas OE contenían niveles de prolina aproximadamente dos veces mayores que las de tipo silvestre en medio que carecía de complementación exógena de Sac. Por el contrario, con la complementación del medio con Sac, el contenido en prolina en ambos genotipos era alto y similar (figura 4e).

### Caracterización enzimática de PPAT

10 Previamente, se ha sometido a ensayo la actividad de PPAT de *Arabidopsis* añadiendo diferentes combinaciones de enzimas recombinantes a una mezcla de reacción que contenía pantotenato, ATP,  $Mg^{2+}$ , cisteína y DTT (Kupke *et al.*, 2003). Por ejemplo, una mezcla de CoaA, CoaB, CoaC y PPAT pudo catalizar la síntesis de dPCoA. Cuando se omitió la CoaC del ensayo, no se generó dPCoA, lo que indica que PPAT no  
15 acepta 4'-fosfopantotenoilcisteína como sustrato (producida por la acción combinada de CoaA y CoaB). Sin embargo, no se han investigado la cinética en estado estacionario ni la regulación bioquímica para la enzima PPAT individual. PPAT cataliza la transferencia reversible de un grupo adenilo desde  $Mg^{2+}$ -ATP hasta 4'-fosfopanteteína para formar dPCoA y PPI (figura 5a). Por tanto, es posible someter a ensayo la actividad de PPAT en  
20 sentido inverso usando hexokinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa para acoplar la producción de ATP a la reducción de NADP (Geerlof *et al.*, 1999). Por tanto, usando MBP-PPAT recombinante (figura 5b), se midió la velocidad inicial de la reacción inversa a concentraciones variables del sustrato comercial dPCoA (figura 5c). Se halló que los parámetros cinéticos para la reacción inversa eran  $K_M(dPCoA) = 37 \pm 2,1 \mu M$ ,  $K_{cat} = 3,4 \pm 0,2$   
25  $s^{-1}$  y  $V_{max} = 0,34 \pm 0,02 \mu mol \ min^{-1} \ mg^{-1}$  de proteína.

El producto intermedio metabólico de CoA, 4'-fosfopanteteína, está presente en cantidades significativas tanto en *E. coli* como en mamíferos, lo que sugiere que PPAT cataliza una etapa limitante de la velocidad en la ruta (Jackowski y Rock, 1984; Rock *et al.*, 2000). Tales enzimas están sometidas a menudo a regulación por retroalimentación por subproductos de la ruta. Por tantosee examinó el efecto de CoA y AcCoA sobre la  
30 actividad de PPAT (figura 5d). Aunque AcCoA casi no tuvo efecto sobre la actividad de PPAT hasta  $40 \mu M$ , CoA tuvo una  $CI_{50} = 38,6 \pm 1,9 \mu M$ , que es próxima a la  $K_m$  para dPCoA.

### Mediciones de ácidos grasos y acil-CoA

Se analizó el contenido en ácidos grasos (AG) en semilla seca de líneas de tipo natural, *ppat-1*, complementadas (Comp) y de sobreexpresión (OE) (figura 6a). El contenido total en ácidos grasos en *ppat-1* pareció ser menor que en las de tipo natural, aunque no fue estadísticamente significativo ( $p < 0,15$ ). Por tanto, aunque el rendimiento de semilla por planta fue menor para las plantas de *ppat-1*, se produjo la deposición normal de aceite dentro de las semillas individuales durante el desarrollo de las semillas. Se midió un aumento estadísticamente significativo en el contenido total en ácidos grasos tanto en las líneas complementadas ( $p < 0,026$ ) así como en OE ( $p < 0,012$ ). Los perfiles individuales de los ácidos grasos principales de semillas secas de *Arabidopsis* mostraron que las líneas OE contenían entre un 35-50% más de AG, concretamente de ácido oleico, linoleico, linolénico y eicosanoico, que las semillas de tipo natural (figura 10). La medición del conjunto total de acil-CoA se realizó a los 5 DAI tanto en medio que carecía de cómo complementado con Sac tal como describieron Larson y Graham (2001). De acuerdo con los resultados previos (Rubio *et al.*, 2006), la complementación con Sac condujo a la estimulación de la biosíntesis de acil-CoA en comparación con medio que carecía de Sac (figura 6b). Los niveles totales de acil-CoA en *ppat-1* fueron del ~68 y el 50% de los niveles en el tipo natural a los 5 DAI en medio +Sac y -Sac, respectivamente. Por el contrario, las líneas OE de PPAT contenían niveles ~1,4 y 1,3 veces mayores de las acil-CoA que las de tipo natural en medio +Sac y -Sac, respectivamente. Estos cambios imitaron ampliamente los observados para los niveles de CoA y AcCoA en plantas con más tiempo en estas líneas (figura 3); lo que indica una relación entre la disponibilidad de CoA libre y el tamaño del conjunto de acil-CoA.

Se realizó un análisis en el tiempo del contenido en AG de diferentes referencias genéticas a los 0, 2 y 5 cinco días tras la imbibición (DAI, *days after imbibition*) en medio complementado con Sac (figura 6c). La complementación con Sac condujo a un consumo más lento de estos lípidos de reserva (Eastmond *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2002; Jennifer *et al.*, 2002) y este retraso aumentó notablemente tanto en las líneas *ppat-1* como en las OE a los 2 DAI, cuando se detuvo el consumo de ácidos grasos (figura 6c). En particular, el nivel del ácido graso específico de reserva triacilglicerol, ácido eicosanoico (20:1n9), disminuyó un ~40% en las plántulas de tipo natural a los 2 DAI, mientras que no se observó casi reducción en las líneas de mutante *ppat-1* y OE (figura 6d). La acumulación de 20:1n9 en las líneas *ppat-1* y OE sugiere que se detuvo el catabolismo temprano de ácidos grasos en estas condiciones de germinación, a diferencia del intenso catabolismo observado en wt. Sin embargo, 20:1n9 se había consumido en su mayor parte a los 5

DAI, lo que sugiere que sólo se comprometió en estas líneas el uso temprano de los lípidos de reserva.

En medio que carecía de Sac exógena, se observó un consumo más rápido de los AG en los diferentes genotipos (figura 6e y 6f). La grave alteración del catabolismo de los ácidos grasos a los 2 DAI notificada anteriormente para las líneas *ppat-1* y OE no se observó en medio que carecía de Sac exógena. Por tanto, el nivel de ácido eicosanoico disminuyó un ~60% en las plántulas de tipo silvestre a los 2 DAI, mientras que se observó una reducción de un ~40% y un ~60% en las líneas de mutante *ppat-1* y OE, respectivamente (figura 6d).

10

## EXPOSICIÓN DETALLADA DE UN MODO DE REALIZACIÓN

### Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se hicieron crecer plantas de *Arabidopsis thaliana* rutinariamente en condiciones de invernadero en macetas que contenían una mezcla de vermiculita-tierra 1:3. Para el cultivo *in vitro*, las semillas se esterilizaron en superficie mediante el tratamiento con etanol al 70% durante 20 min, seguido por lejía comercial (hipoclorito de sodio al 2,5%) que contenía Triton X-100 al 0,05% durante 10 min, y finalmente cuatro lavados con agua destilada estéril. Las semillas se sembraron en placas con medio Murashige-Skoog (1962) (MS) compuesto por sales basales de MS, ácido 2-[N-morfolino]jetanosulfónico al 0,1%, agar al 1% y un pH ajustado hasta 5,7 con KOH antes de esterilizarlas en autoclave. Una vez establecido, se incluyó sacarosa al 1% en el medio. Se llevó a cabo la estratificación de las semillas en la oscuridad a 4°C durante 3 días. Tras la estratificación (=0 DAI), las placas se transfirieron a una cámara de crecimiento de entorno controlado a 22°C con un fotoperiodo de 16 h de luz, 8 h de oscuridad a 80-100  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### Generación de líneas OE de PPAT

Un grupo internacional conocido como AGI (iniciativa para el genoma de *Arabidopsis*, Nature, 408:796-815) secuenció el genoma de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. La disponibilidad de la secuencia completa de este genoma permitió que se creasen diversos proyectos para aclarar la función y el uso biotecnológico de los más de 25.000 genes identificados en esta planta modelo. En el caso de la enzima PPAT (SEQ. ID. NO:1), la secuencia codificante corresponde al gen At2g18250 (SEQ. ID. NO:2). Se amplificó por PCR la secuencia codificante del ADNc de At2g18250 usando los siguientes

pares de cebadores: FCoaD, 5'- GGATCCATGGCAGCTCCGGAAGATTC (SEQ. ID. NO:3) y RCoaD, 5'-GGATCCTCATG ATGCTTTTTTCTTCTG (SEQ. ID. NO:4). Se clonó el producto de PCR en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO (Invitrogen) y se recombinó mediante reacción de LR en el vector de destino pMDC32 (Curtis y Grossniklaus, 2003).

5 Se transfirió el constructo *pMDC32-35S:PPAT* a *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (pGV2260; Deblaere *et al.*, 1985) mediante electroporación y se usó para transformar plantas de tipo natural. Se usó el método de inmersión floral (Clough y Bent, 1998). Se hicieron crecer bacterias en la fase estacionaria en un cultivo de LB (10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl por litro) complementado con 25 mg/ml de

10 kanamicina. Se recuperaron las células mediante centrifugación y se resuspendieron en un medio de infiltración (sacarosa al 5% y Silwet L-77 al 0,05%). Se invirtieron plantas de *Arabidopsis* de cuatro semanas y se sumergieron en esta suspensión, tras lo cual se cubrieron con plástico para mantener la humedad. Tras 12-24 horas, se retiró la cubierta de plástico y se devolvieron las plantas al invernadero. Se recogieron las semillas de las

15 plantas tratadas tras 3-5 semanas. Éstas se almacenaron durante 3-4 semanas, tras las que se realizó una selección de los transformantes que contenían ADN-T transferido por *Agrobacterium*. Se recogieron las semillas de las plantas transformadas y se cultivaron en placa sobre medio de selección con higromicina (20 µg/ml) para identificar las plantas transgénicas T1. Se usaron para estudios adicionales las progenies T3 que eran

20 homocigóticas para el marcador de selección.

### Aislamiento de mutantes

Se identificó una línea (referencia Columbia) que contenía una única inserción de ADN-T en *PPAT (At2g18250)* a partir de la colección de ADN-T de SALK (Alonso *et al.*,

25 2003), correspondiente al número de reserva de donante SALK\_093728. Con el fin de identificar individuos homocigóticos para la inserción de ADN-T, se obtuvo el ADN genómico a partir de plántulas resistentes a kanamicina (50 µg/ml) y se sometió a genotipado por PCR usando los siguientes cebadores: 5'-GGGAGTCTGTGATGGCCCAAT (SEQ ID NO: 5) y 5'-CTTGACATAGGTCTCCACATTA

30 (SEQ ID NO: 6). Como cebador del extremo izquierdo de ADN-T del vector pROK2 se usó el siguiente: 5'-GCCGATTCGGAACCCAC CATC (SEQ ID NO: 7). La línea mutante marcada con el ADN-T se retrocruzó una vez con el tipo silvestre, se verificó mediante hibridación de inmunotransferencia en gel de ADN y también mediante el análisis de segregación del gen de resistencia a antibióticos codificado.

### Generación de líneas complementadas y de sobreexpresión

Se amplificó la secuencia codificante del ADNc de At2g18250 (obtenida a partir de ABRC, clon U61663) mediante PCR usando los siguientes pares de cebadores: FCoaD, 5'-GGATCCATGGCAGCTCCGGAAGATTC (SEQ ID NO: 3) y RCoaD, 5'-  
5 GGATCCTCATGATGCTTTTTCTTCTG (SEQ ID NO: 4). Se clonó el producto de PCR en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO (Invitrogen) y se recombinó mediante reacción de LR en el vector de destino pMDC32 (Curtis y Grossniklaus, 2003). Se transfirió el constructo *pMDC32-35S:PPAT* a *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (pGV2260; Deblaere *et al.*, 1985) mediante electroporación y se usó para transformar plantas  
10 mutantes *ppat-1* (líneas complementadas) y de tipo silvestre (líneas de sobreexpresión). Se recogieron las semillas de las plantas transformadas y se sembraron en medio de selección con higromicina (20 µg/ml) para identificar las plantas transgénicas T1. Se usaron para estudios adicionales las progenies T3 que eran homocigóticas para el marcador de selección.

15

### Ensayos de estrés y establecimiento de las plántulas

Se clasificó el establecimiento de las plántulas de las diferentes referencias genéticas como el porcentaje de semillas que desarrollaron cotiledones expandidos verdes y el primer par de verdaderas hojas. Se realizaron ensayos de tolerancia al estrés  
20 salino y osmótico mediante la transferencia de plántulas de 7 días hechas crecer en medio que contenía sacarosa a un medio complementado con NaCl 75 mM, NaCl 125 mM, manitol 150 mM o manitol 250 mM, respectivamente. Las plántulas se hicieron crecer verticalmente durante de 7 a 11 días y se exploraron periódicamente las placas en un escáner de lecho plano para producir archivos de imágenes adecuados para el  
25 análisis cuantitativo usando el software NIH Image (ImageJ v1.37).

### Determinación del contenido en aminoácidos

El contenido en aminoácidos se determinó mediante HPLC/EM en extractos vegetales preparados en etanol al 80% a partir de plántulas que o bien eran simuladas o  
30 bien se trataron con NaCl 125 mM durante 48 h. Se derivatizaron los aminoácidos libres en los extractos hasta sus derivados de cloroformiato de isobutilo tal como describe Husek (1991) y se analizaron mediante CL-EM como sus fragmentos MS2.

### Análisis de ARN

Se recogieron hojas en roseta y se congelaron en nitrógeno líquido. Se extrajo el ARN total utilizando un Mini Kit RNeasy Plant de Qiagen y se sometió a transcripción inversa 1  $\mu$  g de la disolución de ARN obtenida utilizando 0,1  $\mu$  g de cebador de oligo(dT)<sub>15</sub> y la transcriptasa inversa de VLM-M (Roche), hasta obtener finalmente una disolución de ADNc de 40  $\mu$  l. Se realizaron mediciones y amplificaciones por RT-qPCR utilizando un sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7000 (Perkin-Elmer Applied Biosystems). Las secuencias de los cebadores usados para las amplificaciones por PCR fueron las siguientes: para PPAT, directo 5'-GGGAGTCTGTGATGGCCCAAT (SEQ ID NO: 8) e inverso 5'-CTTGACATAGGT CTCCACATTA (SEQ ID NO: 9) y para  $\mu$ -actina-8 (At1g49420), directo 5'-AGTGGTCGTACAACCGGTATTGT (SEQ ID NO: 10) e inverso 5'-GAGGATAGC ATGTGGAAGTGAGAA (SEQ ID NO: 11).

Se monitorizaron las amplificaciones por RT-Q-PCR utilizando la cepa fluorescente Eva-Green™ (Biotium). Se llevó a cabo la cuantificación relativa de los datos de expresión génica utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  o de  $C_T$  comparativo (Livak y Schmittgen 2001). Se normalizaron los niveles de expresión utilizando los valores de  $C_T$  obtenidos para el gen de la  $\mu$ -actina-8. Se verificó adicionalmente la presencia de un único producto de PCR mediante análisis de disociación en todas las amplificaciones. Todas las cuantificaciones se realizaron por triplicado en las muestras de ARN.

20

### Ensayo de la enzima PPAT

Se sometió a ensayo la actividad de PPAT en el sentido inverso utilizando hexocinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa para acoplar la producción de ATP a la reducción de NADP (Geerlof *et al.*, 1999). La mezcla de ensayo contenía dPCoA 0,1 mM, PPi 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, NADP<sup>+</sup> 1 mM, glucosa 5 mM, DTT 1 mM, 4 unidades de hexocinasa y 1 unidad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8. Se obtuvo PPAT recombinante como una proteína de fusión con la proteína de unión a maltosa (MBP). Para este fin, se escindió la secuencia codificante de PPAT del vector de entrada pCR8/GW/TOPO utilizando digestión con BamHI y se clonó en pMalc2. Se indujo la expresión de MBP-PPAT recombinante con IPTG 1 mM en células DH5a de *E. coli* y se purificó la proteína de fusión mediante cromatografía de afinidad con amilosa según las instrucciones del fabricante (New England Biolabs).

Los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo a 25°C y se monitorizó el aumento de la absorbancia a 340 nm. Una unidad de actividad corresponde a la formación de 1  $\mu\text{mol}$  de producto/min usando un coeficiente de extinción para el NADPH de  $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Se corrigieron las velocidades para la reducción de la referencia de NADP.

5

#### Determinación de acetil coenzima A y coenzima A

Se determinaron AcCoA y CoA básicamente tal como se describe en Gibon *et al.*, (2002) con modificaciones minoritarias. Se redujeron a polvo muestras de tejido (100-200 mg de FW) utilizando mortero y mano de mortero y se extrajeron con (100-200  $\mu\text{l}$ ) de ácido tricloroacético al 16%. Tras la centrifugación, el sobrenadante se llevó a pH 6-7 mediante la adición de base Tris 2 M. Se determinó la suma de CoA y AcCoA utilizando el ensayo espectrofotométrico de ciclación de enzimas descrito originariamente por Allred y Guy (1969). Se colocaron alícuotas de extracto de 20  $\mu\text{l}$  en una microplaca y se añadieron 150  $\mu\text{l}$  de Tris/HCl pH 7,4 que contenía 0,25  $\mu\text{mol}$  de DTT y 12,5  $\mu\text{mol}$  de malato y se incubaron durante 10 min. A continuación, se añadieron 80  $\mu\text{l}$  de una mezcla que contenía 0,25  $\mu\text{mol}$  de DTT, 0,2  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NAD}^+$ , 0,6  $\mu\text{mol}$  de fosfato de acetilo, 2,5 unidades de fosfotransacetilasa, 1,25 unidades de citrato sintasa y 3 unidades de malato deshidrogenasa en Tris 100 mM/HCl pH 7,4, se incubó la mezcla de reacción a 25°C durante 20 min y se leyó la absorbancia a 340 nm. Con cada conjunto de determinaciones, se incluyeron curvas de calibración utilizando patrones de CoA y AcCoA (que oscilaban desde 0,5 hasta 10 pmol).

#### Obtención de perfiles de ácidos grasos y acil-CoA

Se extrajeron los lípidos de 20 semillas secas por repetición y se transmetilaron en sus ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) junto con tripentadecanoína como un patrón interno utilizando un procedimiento de 1 etapa (Browse *et al.*, 1986). Se disolvieron los EMAG en hexano y se inyectaron alícuotas de 2  $\mu\text{L}$  para el análisis de CG-FID utilizando una columna capilar BPX70 de 60 m x 0,25 mm de d.i. x 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de película (SGE) y un CG GC8000 Top de CE Instruments (Thermoquest). Se realizó la inyección en una corriente de gas portador de hidrógeno a  $1,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  (velocidad lineal promedio de  $35 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ) a una razón de fraccionamiento de 30:1. La temperatura se elevó tal como sigue: 110°C isoterma 1 min;  $7,5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  hasta 260°C; se enfrió a  $70^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  hasta 110°C; el tiempo total de análisis fue de 23 min. Se identificaron los EMAG mediante su comparación con una mezcla de 37 EMAG (Supelco). Se extrajeron cien plántulas por repetición (aproximadamente 3 mg para las plántulas de 0

DAI, 20 mg para las de 2 DAI y 30 mg para las de 5 DAI) para el análisis cuantitativo de acil CoA mediante HPLC con detección por fluorescencia de derivados de acil *eteno* CoA (Larson *et al.*, 2001; con modificaciones descritas por Larson *et al.*, 2002). Se utilizó la porción lipídica de los extractos de acil CoA para las determinaciones de ácidos grasos tal como se describió anteriormente.

### **Alineamiento de la proteína PPAT de *Arabidopsis Thaliana* con sus proteínas ortólogas.**

Teniendo en cuenta que el gen que codifica la enzima PPAT está conservado desde musgo hasta especies arbóreas (píceas, chopo) y desempeña una función imprescindible en la célula vegetal, para comprobar su conservación en las especies vegetales, se llevaron a cabo alineamientos de la proteína PPAT de *Arabidopsis thaliana* con algunas proteínas ortólogas (con función equivalente) de otras especies vegetales.

Para ello, se llevó a cabo una búsqueda en las bases de datos públicas que presentan los genomas vegetales disponibles (figura 13).

La base de datos <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> incluye secuencias génicas y productos génicos de vid, arroz, píceas, musgo, colza y col. Los alineamientos de la proteína PPAT de *Arabidopsis thaliana* obtenidos en esta base de datos permitió la identificación de los siguientes genes o productos génicos con los porcentajes de homología que se indican a continuación:

En vid (*Vitis vinifera*) se detectó la proteína con número de acceso [emb|CAO16378.1|](#) y nombre desconocido, que presenta una homología del 92% con PPAT de *Arabidopsis Thaliana*.

En arroz (*Oryza sativa Japonica Group*), se detectó un gen con número de identificación [GENE ID: 4342557 Os07g0179400 | Os07g0179400](#), que presenta un 83% de homología con PPAT de *Arabidopsis Thaliana*.

En Píceas (*Picea sitchensis*), se detectó una proteína desconocida identificada como [gb|ABK25768.1](#), con homología del 86% frente a PPAT de *Arabidopsis Thaliana*.

En Musgo (*Physcomitrella patens* subsp. *patens*), se identificó la proteína [gb|EDQ82844.1](#) que presenta homología del 86% con PPAT de *Arabidopsis Thaliana*.

En Colza (*Brassica napus*) se detectó [gi|95827801|gb|DW998276.1](#) que presenta homología del 85% con *Arabidopsis Thaliana*

En Col (*Brassica oleracea*) se detectó [gi|150912248|gb|ES942706.1](#), con homología del 85% frente a *Arabidopsis Thaliana*

La base de datos de especies de solanáceas <http://www.sgn.cornell.edu/> incluye secuencias génicas y productos génicos de tomate y patata. Los alineamientos de la proteína PPAT de *Arabidopsis thaliana* obtenidos en esta base de datos permitió la  
5 identificación de los siguientes genes o productos génicos con los porcentajes de homología que se indican a continuación:

En tomate (*Solanum lycopersicum*) se identificó [tomato|TC155758](#), que presenta homología del 88% con *Arabidopsis Thaliana*.

10 En patata (*Solanum tuberosum*) se identificó [SGN-U279993](#) que presenta homología del 94% con *Arabidopsis Thaliana*.

Los alineamientos de la proteína PPAT de *Arabidopsis thaliana* obtenidos en la base de datos del chopo ([http://genome.jgi-psf.org/Poptr1\\_1/Poptr1\\_1.home.html](http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html)) permitió la identificación de los siguientes genes o productos génicos con los porcentajes de  
15 homología que se indican a continuación:

En chopo (*Populus trichocarpa*) se identificó [eugene3.00570163](#) que presenta homología del 80% con *Arabidopsis Thaliana*.

Así, los resultados de estos alineamientos (mostrados en la figura 13) corroboran la presencia del producto génico PPAT en los genomas vegetales y por tanto su  
20 conservación en distintas especies vegetales.

## REFERENCIAS

- Aghajanian,S. and Worrall,D.M.** (2002). Identification and characterization of the gene encoding the human phosphopantetheine adenylyltransferase and dephospho-CoA kinase bifunctional enzyme (CoA synthase). *Biochem. J.* **365**, 13-18.
- 5 **Allred,J.B. and Guy,D.G.** (1969). Determination of coenzyme A and acetyl CoA in tissue extracts. *Anal. Biochem.* **29**, 293-299.
- Alonso,J.M., et al.,** (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653-657.
- Begley,T.P., Kinsland,C. and Strauss,E.** (2001). The biosynthesis of coenzyme A in  
10 bacteria. *Vitam. Horm.* **61**, 157-171.
- Browse,J., McCourt,P.J. and Somerville,C.R.** (1986). Fatty acid composition of leaf lipids determined after combined digestion and fatty acid methyl ester formation from fresh tissue. *Anal. Biochem.* **152**, 141-145.
- Curtis,M.D. and Grossniklaus,U.** (2003). A gateway cloning vector set for high-  
15 throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol* **133**, 462-469.
- Daugherty,M., Polanuyer,B., Farrell,M., Scholle,M., Lykidis,A., Crecy-Lagard,V. and Osterman,A.** (2002). Complete reconstitution of the human coenzyme A biosynthetic pathway via comparative genomics. *J. Biol. Chem.* **277**, 21431-21439.
- Deblaere,R., Bytebier,B., De Greve,H., Deboeck,F., Schell,J., Van Montagu,M. and  
20 Leemans,J.** (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.* **13**, 4777-4788.
- Eastmond,P.J., Germain,V., Lange,P.R., Bryce,J.H., Smith,S.M. and Graham,I.A.** (2000). Postgerminative growth and lipid catabolism in oilseeds lacking the glyoxylate cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 5669-5674.
- 25 **Espinosa-Ruiz,A., Belles,J.M., Serrano,R. and Cullianez-Macia,F.A.** (1999). *Arabidopsis thaliana* AtHAL3: a flavoprotein related to salt and osmotic tolerance and plant growth. *Plant J.* **20**, 529-539.

- Geerlof,A., Lewendon,A. and Shaw,W.V.** (1999). Purification and characterization of phosphopantetheine adenylyltransferase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **274**, 27105-27111.
- Gibon,Y., Vigeolas,H., Tiessen,A., Geigenberger,P. and Stitt,M.** (2002). Sensitive and high throughput metabolite assays for inorganic pyrophosphate, ADPGlc, nucleotide phosphates, and glycolytic intermediates based on a novel enzymic cycling system. *Plant J.* **30**, 221-235.
- Husek, P.** (1991). Amino acid derivatization and analysis in five minutes. *FEBS Lett.* **280**, 354-356.
- 10 **Izard,T. and Geerlof,A.** (1999). The crystal structure of a novel bacterial adenylyltransferase reveals half of sites reactivity. *EMBO J.* **18**, 2021-2030.
- Izard,T.** (2002). The crystal structures of phosphopantetheine adenylyltransferase with bound substrates reveal the enzyme's catalytic mechanism. *J. Mol. Biol.* **315**, 487-495.
- Izard,T.** (2003). A novel adenylate binding site confers phosphopantetheine adenylyltransferase interactions with coenzyme A. *J. Bacteriol.* **185**, 4074-4080.
- 15 **Jackowski,S. and Rock,C.O.** (1984). Metabolism of 4'-phosphopantetheine in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **158**, 115-120.
- Kupke,T., Hernandez-Acosta,P. and Culianez-Macia,F.A.** (2003). 4'-phosphopantetheine and coenzyme A biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* **278**, 38229-38237.
- 20 **Larson,T.R. and Graham,I.A.** (2001). Technical Advance: a novel technique for the sensitive quantification of acyl CoA esters from plant tissues. *Plant J.* **25**, 115-125.
- Larson,T.R., Edgell,T., Byrne,J., Dehesh,K. and Graham,I.A.** (2002). Acyl CoA profiles of transgenic plants that accumulate medium-chain fatty acids indicate inefficient storage lipid synthesis in developing oilseeds. *Plant J.* **32**, 519-527.
- 25 **Leonardi,R., Zhang,Y.M., Rock,C.O. and Jackowski,S.** (2005). Coenzyme A: back in action. *Prog. Lipid Res.* **44**, 125-153.
- Livak,K.J. and Schmittgen,T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408.

- Martin,T., Oswald,O. and Graham,I.A.** (2002). Arabidopsis seedling growth, storage lipid mobilization, and photosynthetic gene expression are regulated by carbon:nitrogen availability. *Plant Physiol* **128**, 472-481.
- Murashige,T. and Skoog,F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**, 473-497.
- Ottenhof,H.H., Ashurst,J.L., Whitney,H.M., Saldanha,S.A., Schmitzberger,F., Gweon,H.S., Blundell,T.L., Abell,C. and Smith,A.G.** (2004). Organisation of the pantothenate (vitamin B5) biosynthesis pathway in higher plants. *Plant J.* **37**, 61-72.
- Park,S., Li,J., Pittman,J.K., Berkowitz,G.A., Yang,H., Undurraga,S., Morris,J., Hirschi,K.D. and Gaxiola,R.A.** (2005). Up-regulation of a H<sup>+</sup>-pyrophosphatase (H<sup>+</sup>-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 18830-18835.
- Rock,C.O., Calder,R.B., Karim,M.A. and Jackowski,S.** (2000). Pantothenate kinase regulation of the intracellular concentration of coenzyme A. *J. Biol. Chem.* **275**, 1377-1383.
- Rock,C.O., Park,H.W. and Jackowski,S.** (2003). Role of feedback regulation of pantothenate kinase (CoaA) in control of coenzyme A levels in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **185**, 3410-3415.
- Rubio,S., Larson,T.R., Gonzalez-Guzman,M., Alejandro,S., Graham,I.A., Serrano,R. and Rodriguez,P.L.** (2006). An Arabidopsis mutant impaired in coenzyme A biosynthesis is sugar dependent for seedling establishment. *Plant Physiol* **140**, 830-843.
- Tilton,G.B., Wedemeyer,W.J., Browse,J. and Ohlrogge,J.** (2006). Plant coenzyme A biosynthesis: characterization of two pantothenate kinases from Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* **61**, 629-642.
- To,J.P., Reiter,W.D. and Gibson,S.I.** (2002). Mobilization of seed storage lipid by Arabidopsis seedlings is retarded in the presence of exogenous sugars. *BMC. Plant Biol.* **2**, 4.
- Tully,R.E., Hanson,A.D. and Nelsen,C.E.** (1979). Proline Accumulation in Water-stressed Barley Leaves in Relation to Translocation and the Nitrogen Budget. *Plant Physiol* **63**, 518-523.

**Tumaney,A.W., Ohlrogge,J.B. and Pollard,M.** (2004). Acetyl coenzyme A concentrations in plant tissues. *J. Plant Physiol* **161**, 485-488.

**Verslues,P.E., Agarwal,M., Katiyar-Agarwal,S., Zhu,J. and Zhu,J.K.** (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J.* **45**, 523-539.

**Voetberg,G.S. and Sharp,R.E.** (1991). Growth of the Maize Primary Root at Low Water Potentials : III. Role of Increased Proline Deposition in Osmotic Adjustment. *Plant Physiol* **96**, 1125-1130.

**Wardlaw,I.F.** (1967). The effect of water stress on translocation in relation to photosynthesis and growth. I. Effect during grain development in wheat. *Aust. J. Biol. Sci.* **20**, 25-39.

**Yonamine,I., Yoshida,K., Kido,K., Nakagawa,A., Nakayama,H. and Shinmyo,A.** (2004). Overexpression of NtHAL3 genes confers increased levels of proline biosynthesis and the enhancement of salt tolerance in cultured tobacco cells. *J. Exp. Bot.* **55**, 387-395.

**REINVINDICACIONES**

1. Uso del gen que codifica la enzima PPAT en especies vegetales como regulador de la síntesis de CoA.
- 5 2. Uso del gen que codifica la enzima PPAT según reivindicación 1, donde dicho gen es homólogo al gen PPAT de *A. Thaliana*.
3. Uso del gen que codifica la enzima PPAT según reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque dicha regulación se produce por ganancia de función del gen que codifica la PPAT.
- 10 4. Uso del gen que codifica la enzima PPAT según la reivindicación 3, caracterizado porque dicha ganancia de función es por sobreexpresión de PPAT
5. Uso del gen que codifica la enzima PPAT según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la sobreexpresión es producida por inserción de una copia adicional del gen PPAT en el genoma de la planta.
- 15 6. Uso del gen que codifica la enzima PPAT según la reivindicación 5, caracterizado porque la copia adicional del gen PPAT es insertada bajo el control de un promotor constitutivo.
7. Uso del gen que codifica la enzima PPAT según la reivindicación 6, caracterizado porque la copia adicional del gen PPAT es insertada bajo el control del promotor constitutivo 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor en el genoma de la planta.
- 20 8. Uso del gen que codifica la enzima PPAT según la reivindicaciones 1 a 7 caracterizado porque dicha regulación implica un aumento en los niveles de síntesis de CoA.
9. Uso del gen que codifica la enzima PPAT según reivindicaciones 1 a 8 caracterizado porque los niveles de CoA+ACoA son 1,6 veces los niveles de CoA+ACoA en plantas silvestres.
- 25 10. Uso del gen que codifica la enzima PPAT según reivindicaciones 1 a 9 caracterizado porque dicha regulación implica el aumento del crecimiento vegetativo y reproductivo de las plantas, aumento de la producción de semillas, disminución del tiempo de floración, mayor resistencia al estrés osmótico y salino, aumento del contenido en ácidos grasos en las semillas y composición aminoacídica modificada.
- 30

11. Uso del gen que codifica la enzima PPAT según reivindicación 10 caracterizado porque el tiempo de floración disminuye en dos días en comparación con plantas de tipo silvestre.
- 5 12. Uso del gen que codifica la enzima PPAT según reivindicaciones 10 y 11 caracterizado porque la mayor resistencia al estrés osmótico y salino es debido a la acumulación de prolina
13. Uso del gen que codifica la enzima PPAT según reivindicación 12 caracterizado porque la acumulación de prolina es dos veces mayor que los niveles de prolina en plantas silvestres.
- 10 14. Uso del gen que codifica la enzima PPAT según reivindicaciones 10 a 13 caracterizado porque el aumento del contenido en ácidos grasos se produce en ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico y ácido eicosanoico.
- 15 15. Uso del gen que codifica la enzima PPAT según reivindicaciones 10 a 14 caracterizado porque el contenido en ácidos grasos en las semillas es 35-50% superior que en las semillas de plantas silvestres.
- 20 16. Uso del gen que codifica la enzima PPAT según las reivindicaciones 1 a 15, para la obtención de plantas transgénicas que presenten mayor crecimiento vegetativo y reproductivo, mayor producción de semillas, disminución del tiempo de floración, mayor resistencia al estrés osmótico y salino, aumento del contenido en ácidos grasos en las semillas y composición aminoacídica modificada.
- 25 17. Plantas modificadas genéticamente, según la reivindicación 16, caracterizada por su ganancia de función del gen PPAT para regular la síntesis de CoA.
18. Planta modificada genéticamente según reivindicación 17 caracterizada porque la ganancia de función del gen PPAT es producida por inserción de una copia adicional del gen PPAT.
- 30 19. Planta modificada genéticamente según reivindicaciones 17 y 18 caracterizada porque la inserción de la copia adicional del gen PPAT se produce bajo el control de un promotor constitutivo.
20. Planta modificada genéticamente según reivindicaciones 17 a 19 caracterizada porque la inserción de la copia adicional del gen PPAT se produce bajo el control del promotor constitutivo 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor.

- 5 21. Planta modificada genéticamente según reivindicaciones 17 a 20 caracterizada por presentar mayor crecimiento vegetativo y reproductivo, mayor producción de semillas, disminución del tiempo de floración, mayor resistencia al estrés osmótico y salino y mayor contenido en ácidos grasos en las semillas, que las plantas silvestres, así como composición aminoacídica modificada.
22. Semillas producidas por las plantas modificadas genéticamente según reivindicaciones 17 a 21, caracterizadas por presentar mayor contenido en ácidos grasos en las semillas, que las semillas de plantas silvestres
- 10 23. Semillas producidas por las plantas modificadas genéticamente según reivindicaciones 17 a 22, caracterizadas porque el aumento del contenido en ácidos grasos se produce principalmente en ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico y ácido eicosanoico.
- 15 24. Semillas producidas por las plantas modificadas genéticamente según reivindicaciones 17 a 23, caracterizadas porque el contenido en ácidos grasos en las semillas es 35-50% superior que en las semillas de plantas silvestres.
25. Uso de las semillas y/o plantas transgénicas según reivindicaciones 17 a 24 en la producción de aceites vegetales.
26. Uso de las plantas según reivindicación 25 en la producción de aceites vegetales.
27. Uso de las semillas según reivindicación 26 en la producción de aceites vegetales.
- 20 28. Uso de las semillas y plantas transgénicas según reivindicaciones 25 a 27 caracterizado porque dichos aceites son para uso en alimentación
29. Uso de las semillas y/o plantas transgénicas según reivindicaciones 25 a 27 caracterizado porque dichos aceites son para uso en la industria del biodiesel.
- 25 30. Uso de las semillas y/o plantas transgénicas según reivindicaciones 17 a 24 en la industria de la alimentación animal.
31. Uso de las semillas transgénicas según reivindicación 30 en la industria de la alimentación animal.
32. Uso de las plantas transgénicas según reivindicación 30 en la industria de la alimentación animal.

FIGURAS

FIGURA 1

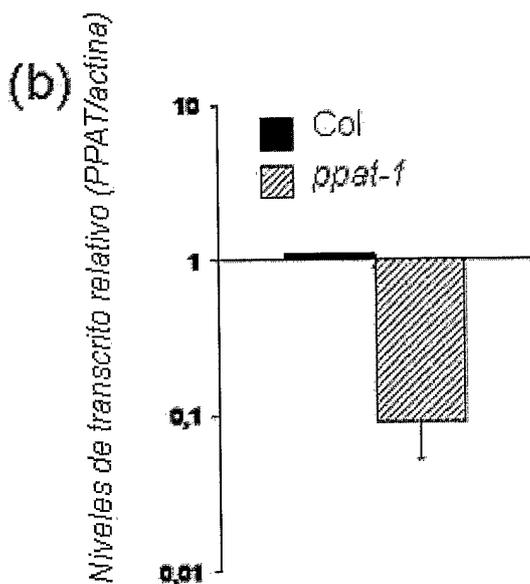
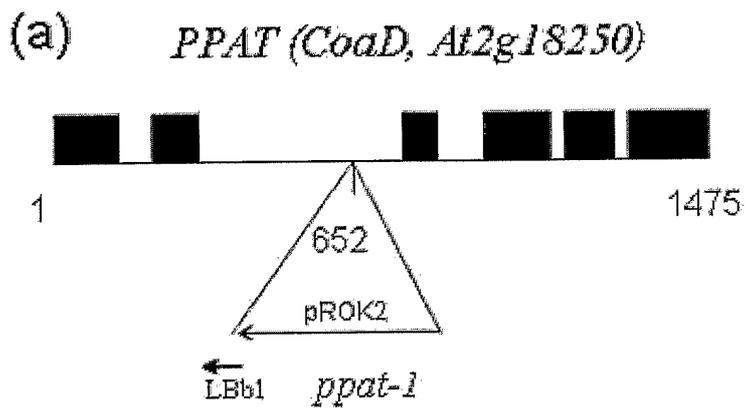


FIGURA 2

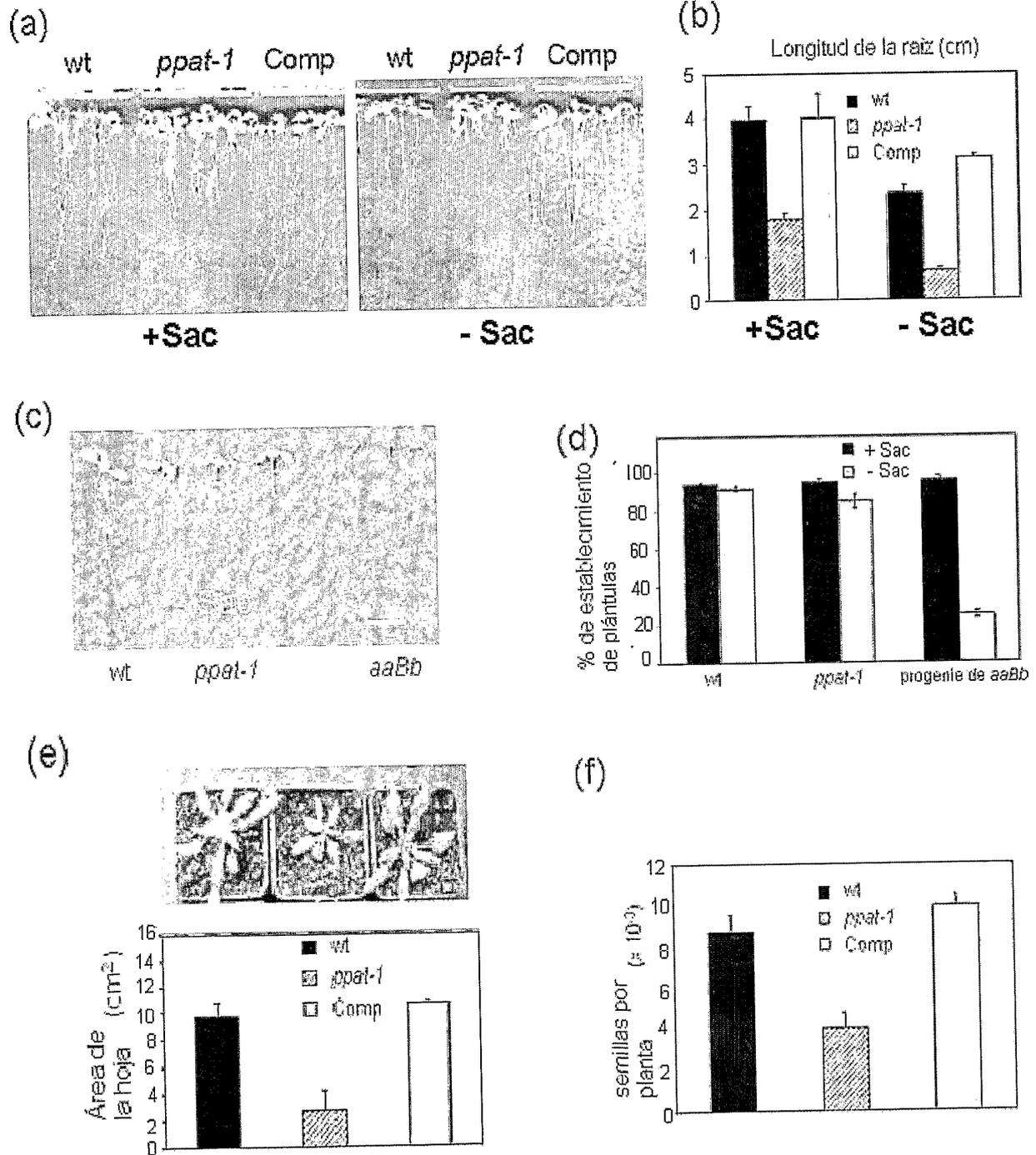
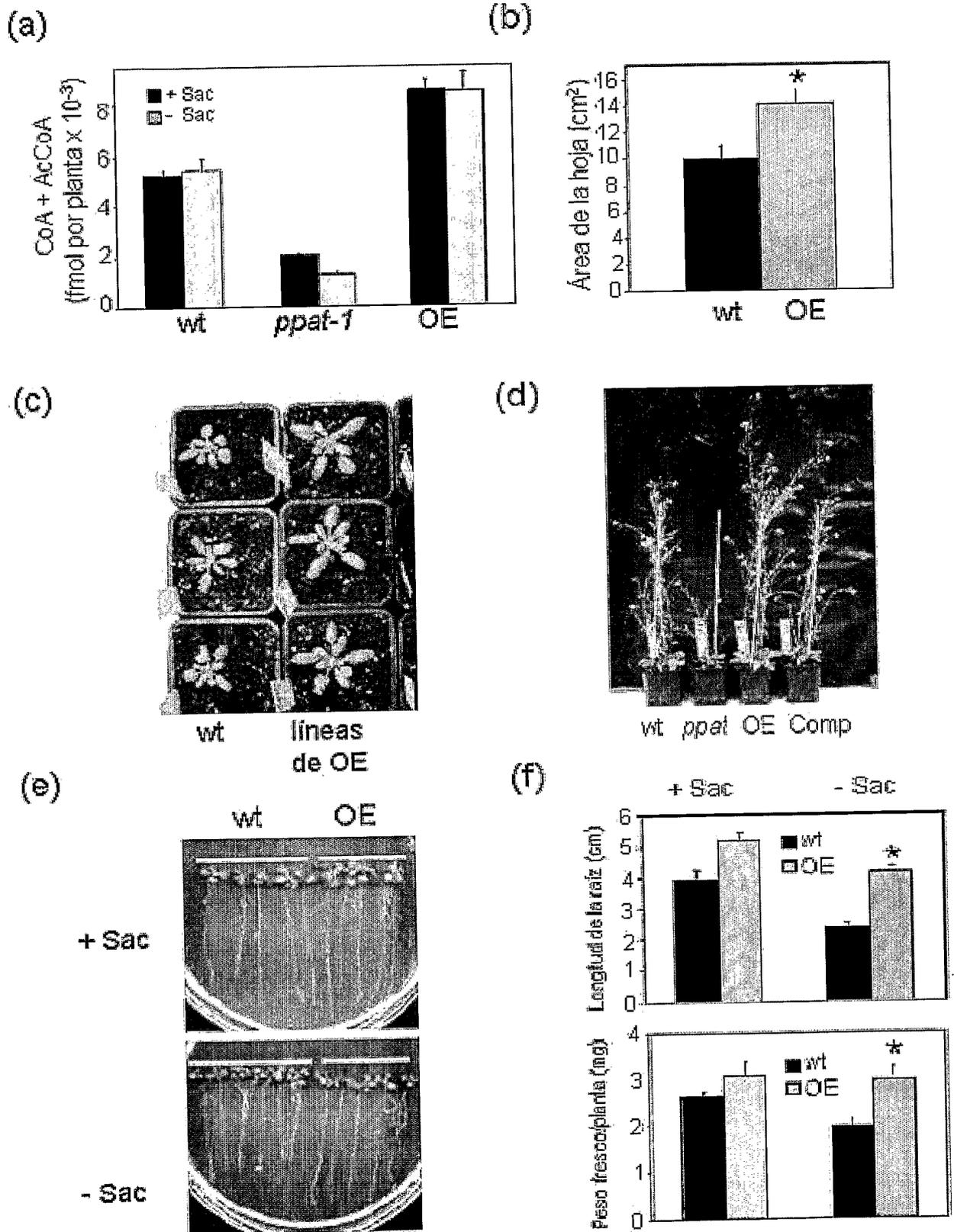


FIGURA 3



4/14

FIGURA 4

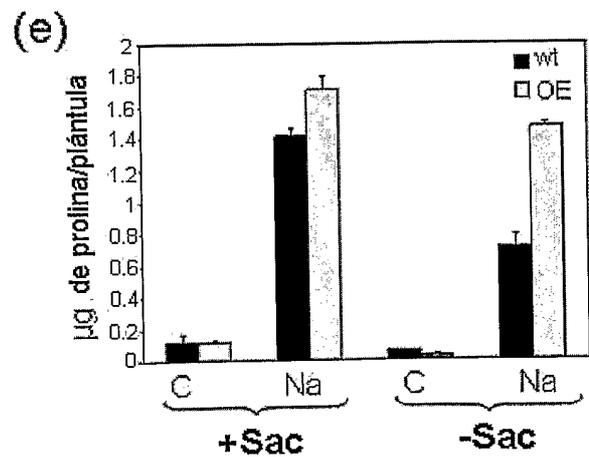
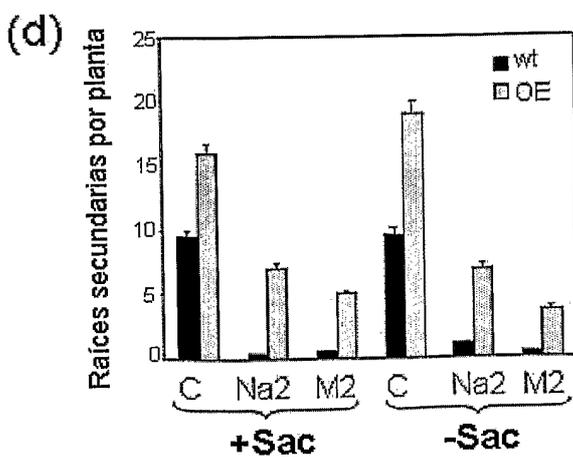
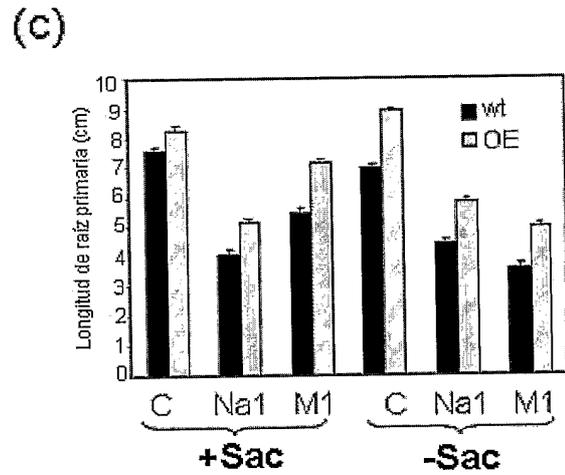
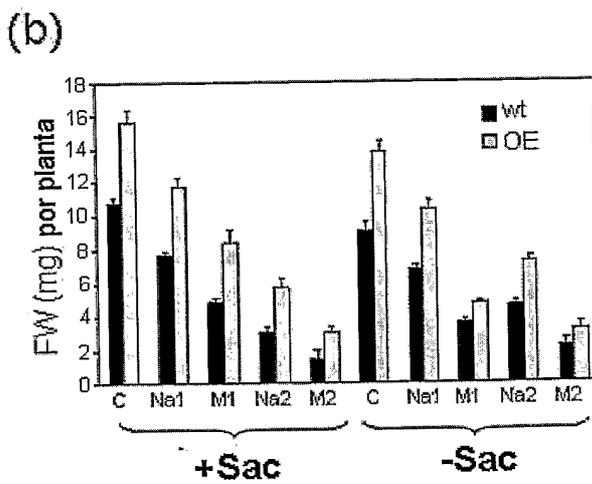
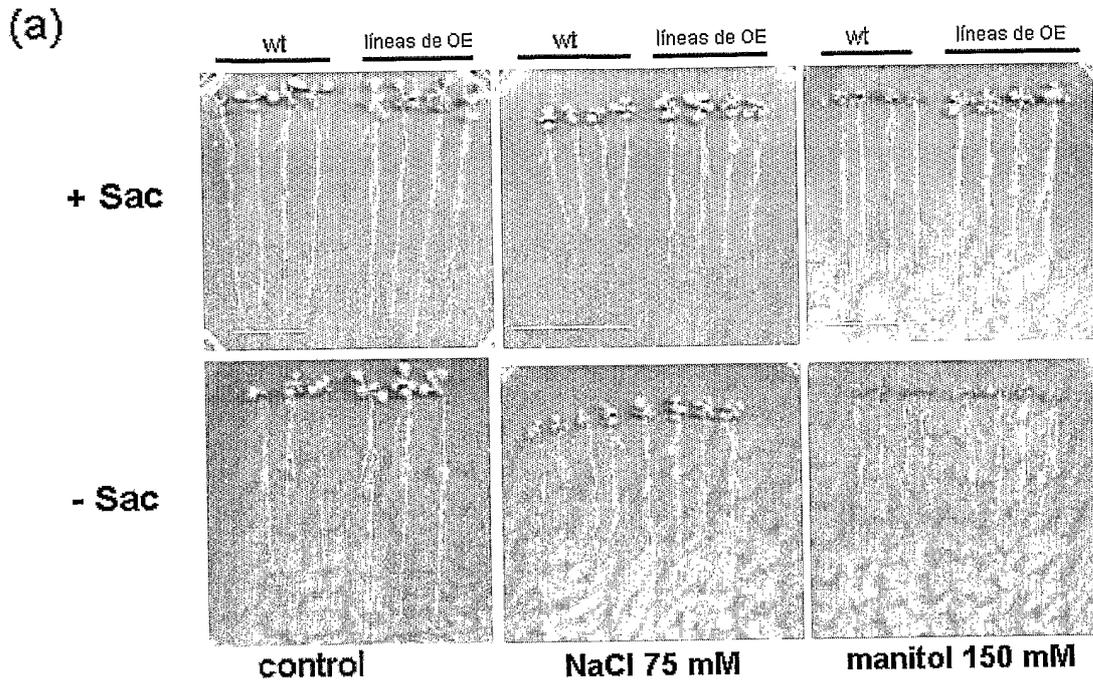


FIGURA 5

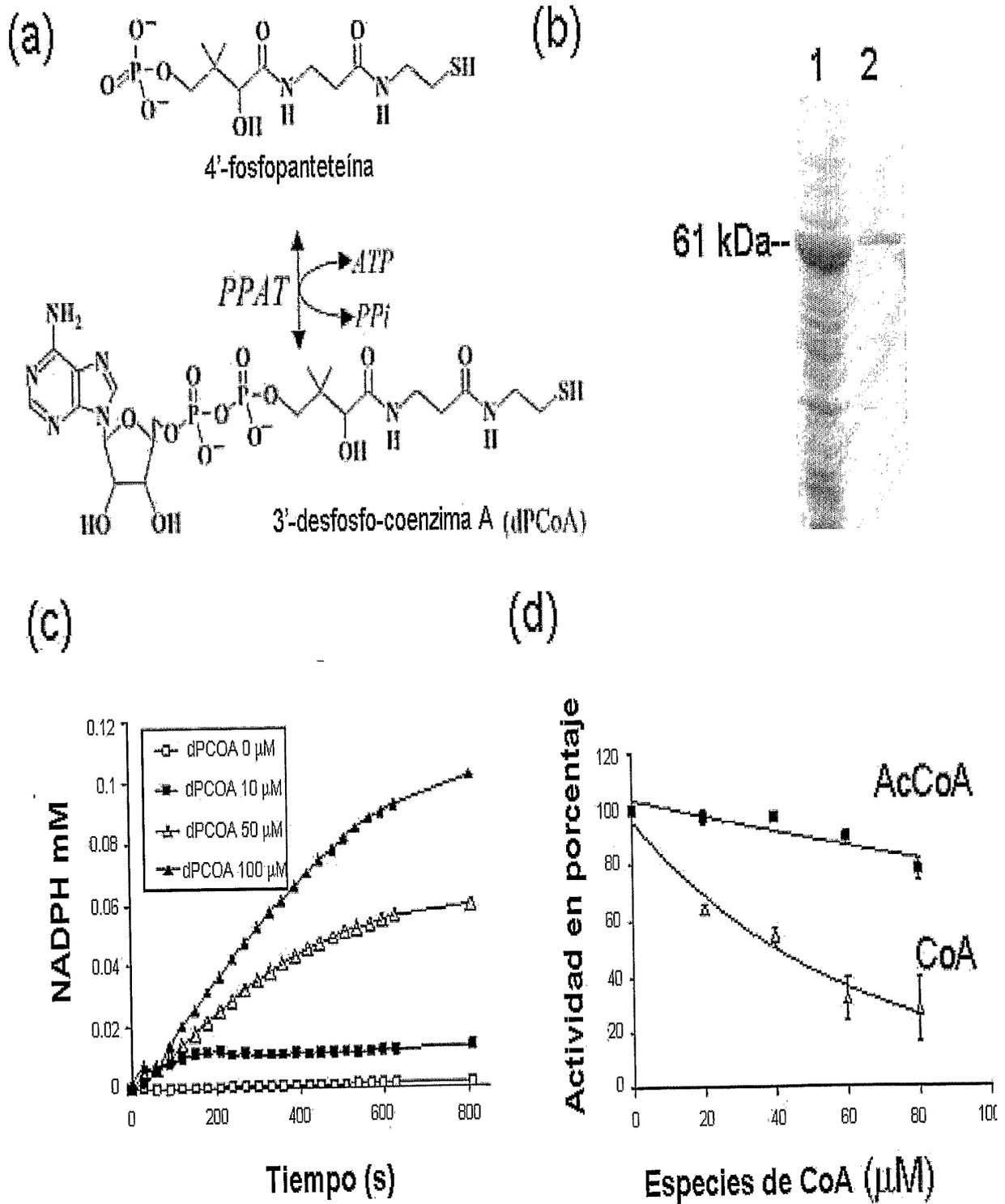


FIGURA 6

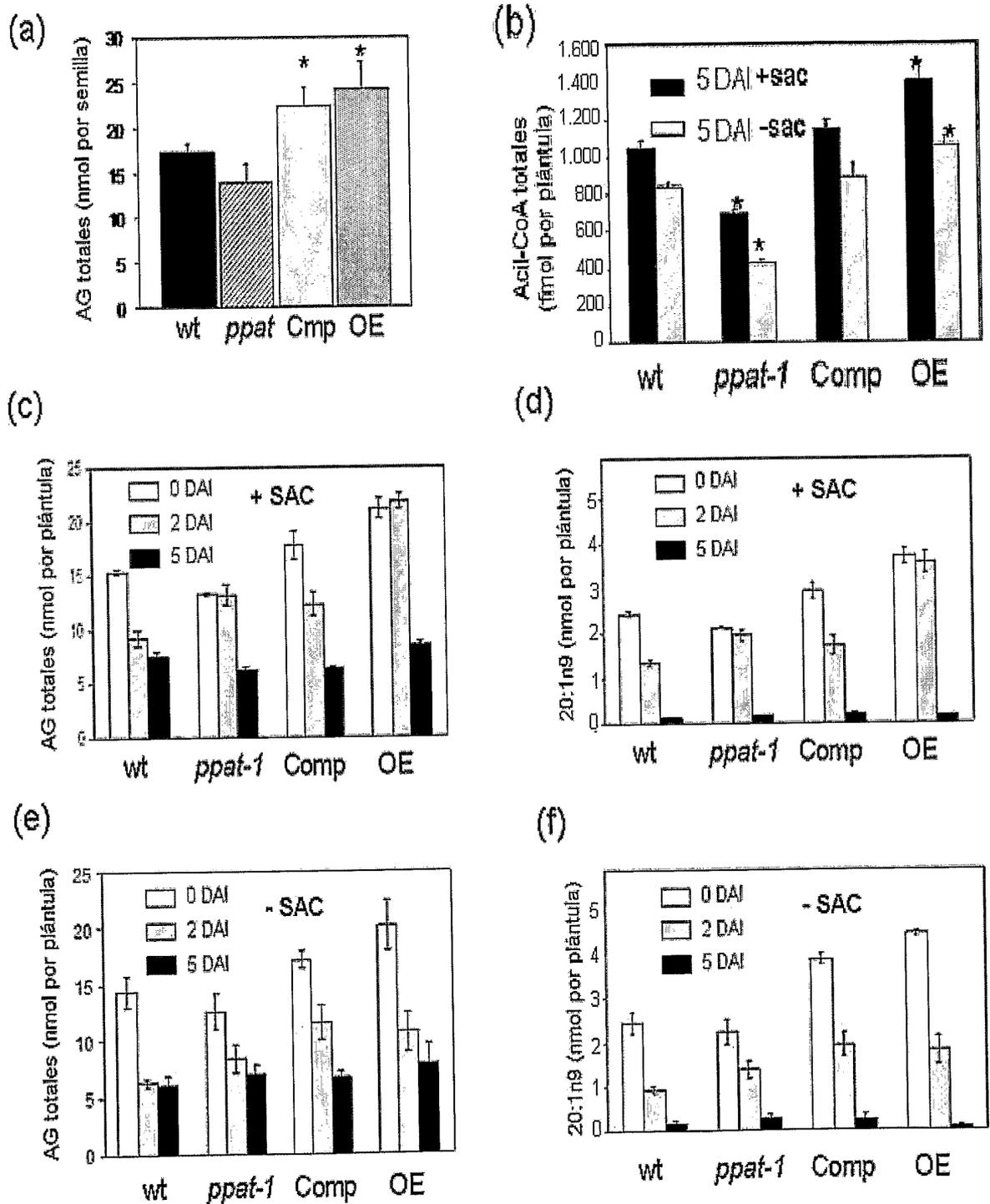


FIGURA 7

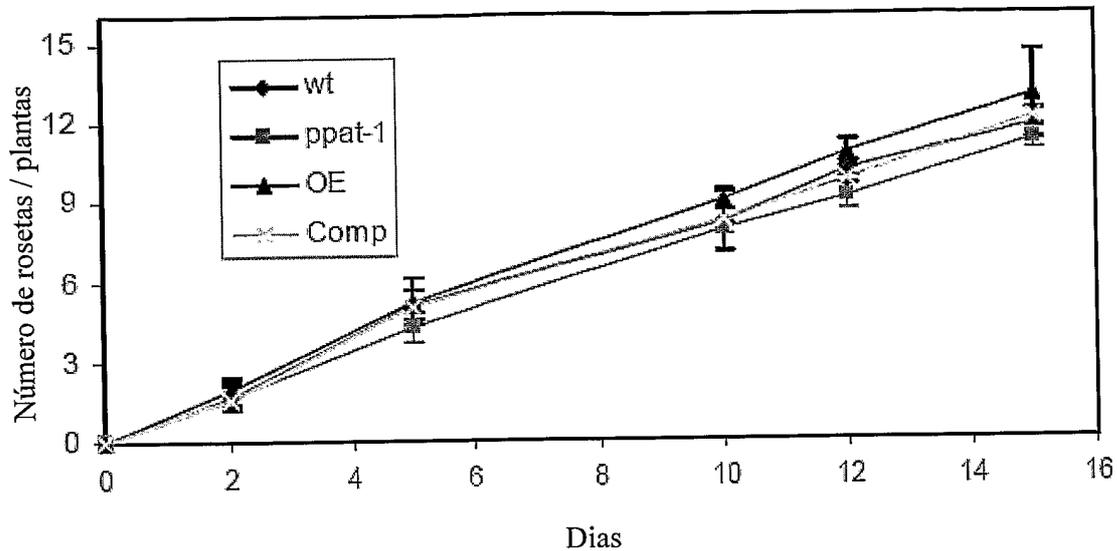
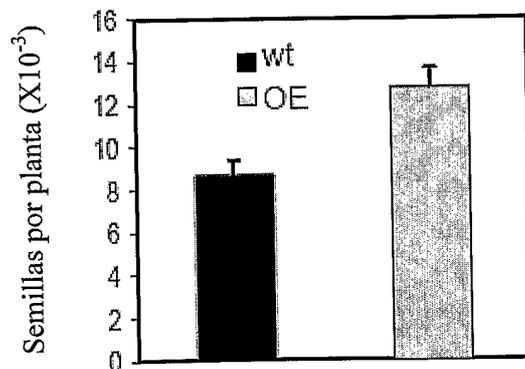


FIGURA 8



8/14

FIGURA 9

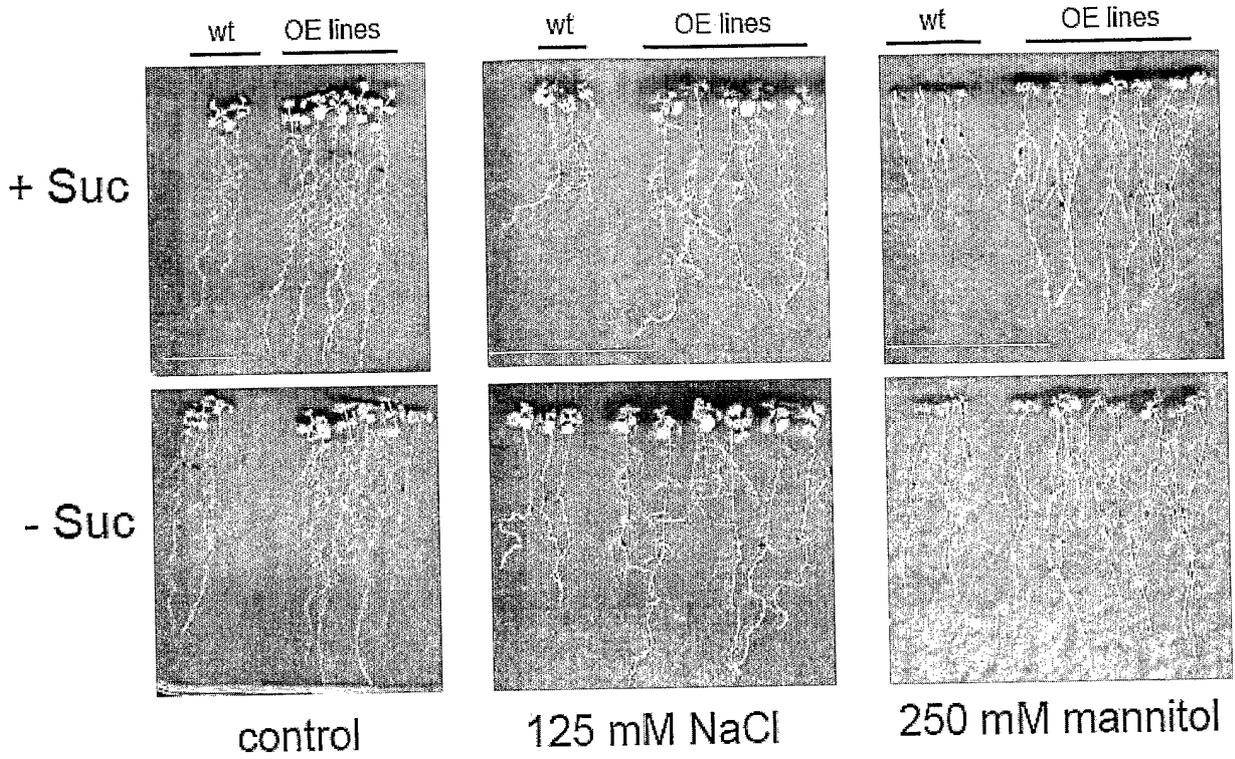
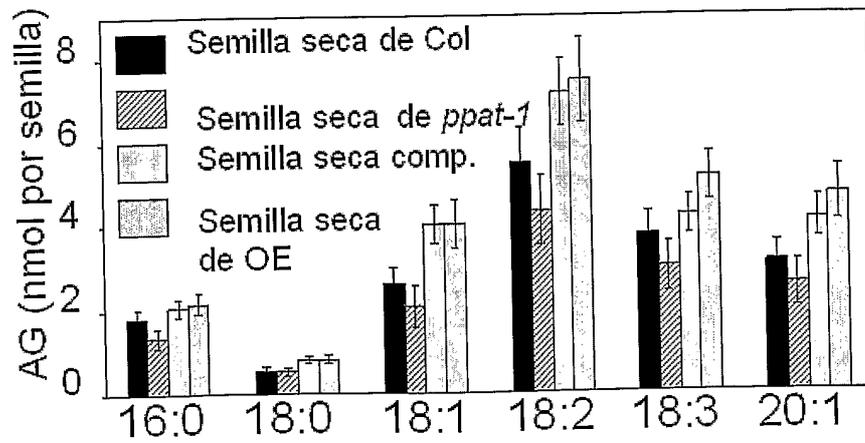


FIGURA 10



9/14

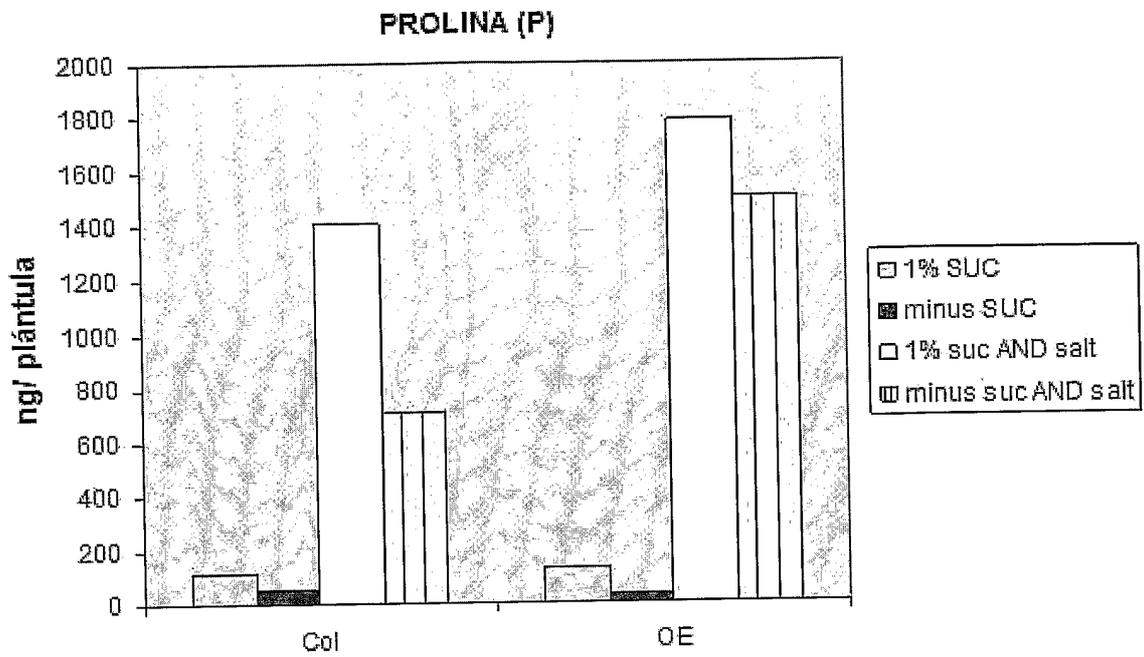
FIGURA 11

**Average ng of each AA per 30 seedlings**

	A	G	V	L	I	P	M	S	T	F	D	J	C
Col plus suc	6125,7	19538,3	960,5	250,3	269,0	4473,4	46,4	24633,9	4402,0	318,5	4854,1	332,8	45,0
Col minus suc	2898,4	6774,5	716,4	254,9	218,2	1631,0	24,0	13020,4	2460,1	272,4	3769,2	71,3	10,8
Col plus suc plus salt	2918,8	598,2	3360,6	203,4	165,1	42342,7	29,3	22499,3	3622,4	258,6	1271,6	52,1	9,5
Col minus suc, plus salt	3039,4	580,8	1597,9	176,4	95,7	21344,6	35,7	19151,1	2830,5	302,0	260,5	45,3	10,3
OE plus suc	8623,2	34992,3	903,6	358,5	232,1	4161,2	80,8	25382,8	6389,7	403,1	913,5	634,6	7,1
OE minus suc	3148,7	2082,2	731,4	311,4	237,5	1130,7	21,4	11565,1	2443,4	336,9	552,6	119,2	6,6
OE plus suc plus salt	3002,6	614,0	3011,0	260,3	219,4	49066,5	21,6	15681,5	4593,2	294,0	2281,8	83,1	11,9
OE minus suc plus salt	2986,9	772,5	2051,4	175,8	175,5	45012,2	22,2	24314,3	6022,9	242,5	4787,2	90,5	14,7
	E	N	K	Q	R	H	Y	B	CIT	ORN	AAA	GABA	
Col plus suc	4702,4	58530,2	279,0	251516,5	24583,3	349,2	136,2	25,3	10416,2	441,8	111,3	614,1	
Col minus suc	4048,7	28618,4	352,2	89702,5	23643,1	324,4	110,3	7,8	3634,7	553,5	31,3	587,8	
Col plus suc plus salt	1556,3	15561,3	276,5	55087,9	4259,1	393,7	79,0	1,8	3529,5	417,1	26,2	297,7	
Col minus suc, plus salt	1103,6	13829,8	243,3	46523,9	3901,3	330,8	71,0	4,0	2694,2	420,3	17,2	278,2	
OE plus suc	1439,0	59583,6	367,1	495831,5	52140,8	603,7	132,9	8,4	9369,5	777,8	25,1	1199,3	
OE minus suc	564,6	34999,1	524,3	151543,4	45947,3	381,9	103,1	10,3	3047,8	640,2	25,1	790,6	
OE plus suc plus salt	3727,2	19009,1	316,6	58186,0	3835,4	522,5	104,1	4,6	2084,6	442,2	31,1	300,3	
OE minus suc plus salt	2346,1	17822,2	256,5	93943,1	10395,7	301,7	52,9	4,4	3779,3	135,0	29,0	530,4	

FIGURA 12

a)



b)

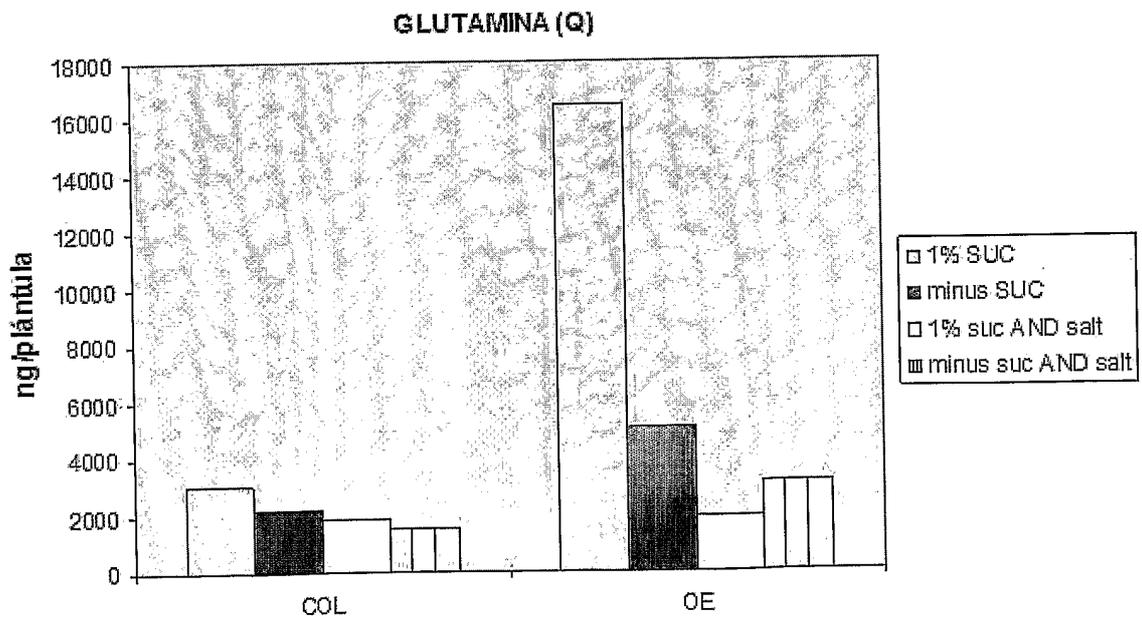


FIGURA 13

**GENE ID: 816341 ATCOAD | ATCOAD (4-PHOSPHOPANTETHEINE ADENYLYLTRANSFERASE) ;  
nucleotidyltransferase/ pantetheine-phosphate adenylyltransferase  
[Arabidopsis thaliana]**

Query	1	MAAPEDSKMSPANSFGAVVLGGTFDRLHDGHRMFLKAAAELARDRIVVGCDGPMLTKKQ	60
		MAAPEDSKMSPANSFGAVVLGGTFDRLHDGHRMFLKAAAELARDRIVVGCDGPMLTKKQ	
Sbjct	1	MAAPEDSKMSPANSFGAVVLGGTFDRLHDGHRMFLKAAAELARDRIVVGCDGPMLTKKQ	60
Query	61	FSDMIQPIEERMNRNVETYVKS IKPELVVQAEPI TDPYGPSIVDENLEAIVVSKETLPGGL	120
		FSDMIQPIEERMNRNVETYVKS IKPELVVQAEPI TDPYGPSIVDENLEAIVVSKETLPGGL	
Sbjct	61	FSDMIQPIEERMNRNVETYVKS IKPELVVQAEPI TDPYGPSIVDENLEAIVVSKETLPGGL	120
Query	121	SVNRKRAERGLSQLKIEVVEIVSDGSSGNKISSSTLRKMEAEKASKQKQPAEEKAS	176
		SVNRKRAERGLSQLKIEVVEIVSDGSSGNKISSSTLRKMEAEKASKQKQPAEEKAS	
Sbjct	121	SVNRKRAERGLSQLKIEVVEIVSDGSSGNKISSSTLRKMEAEKASKQKQPAEEKAS	176

**emb|CAO16378.1| unnamed protein product [Vitis vinifera]**

Length=174

Query	7	SKMSPANSFGAVVLGGTFDRLHDGHRMFLKAAAELARDRIVVGCDGPMLTKKQFSDMIQ	66
		S +SP NS GAVVLGGTFDRLHDGHR+FLKA+AE+ARDRIV+GV DGPML+KKQF+D+I	
Sbjct	11	SNISPPNSHGAVVLGGTFDRLHDGHRFLKASAEVARDRIVIGVSDGPMLSKKQFADLIA	70
Query	67	PIEERMNRNVETYVKS IKPELVVQAEPI TDPYGPSIVDENLEAIVVSKETLPGGLSVNRKR	126
		PIE+RM +V+ Y+KSIKPELVVQ EPI DYPGSIIVDENLEAIVVSKETLPGGLSVN+KR	
Sbjct	71	PIEKRMHDVKEYIKSIKPELVVQVEPIIDPYPGSIIVDENLEAIVVSKETLPGGLSVNKKR	130
Query	127	AERGLSQLKIEVVEIVSDGSSGNKISSSTLRKMEAE	162
		AERGLSQLKIEV++I+ + S+G K+SS+TLR++EAE	
Sbjct	131	AERGLSQLKIEVIDILPEESTGEKLSSTTLRLEAE	166

**GENE ID: 4342557 Os07g0179400 | Os07g0179400 [Oryza sativa Japonica Group]**

Query	2	AAPEDSKMSPANSFGAVVLGGTFDRLHDGHRMFLKAAAELARDRIVVGCDGPMLTKKQF	61
		A P S+ A +G+VVLGGTFDRLHDGHR LKA+A+LARDRIVGVC GPML KK++	
Sbjct	14	APPPSQEEDAPPYGSVVLGGTFDRLHDGHRLLKASADLARDRIVGVC TGPMLAKKEY	73
Query	62	SDMIQPIEERMNRNVETYVKS IKPELVVQAEPI TDPYGPSIVDENLEAIVVSKETLPGGLS	121
		+++I+P+E+RM+ VE Y+KS+KPELVVQ EPI DYPGSI+D+ L+AI+VSKETL GG +	
Sbjct	74	AELIEPVEKRMKAVEDYIKSVKPELVVQVEPIEDPYPGSIIDDKLD AIIVSKETLNGGFA	133
Query	122	VNRKRAERGLSQLKIEVVEIVSDGSSGNKISSSTLRKMEAEKASKQKQPA	171
		VNRKR E+GL LK+EVV+++S G+ G K+SSS LRK+EAEKA++Q+ A	
Sbjct	134	VNRKREEKGLPLLKVEVVDDLSSGAEKEKLSSSALRKLEAEKANQQEGAA	183

**gb|ABK25768.1| unknown [*Picea sitchensis*]**

Length=194

```

Query 13 NSFGAVVLGGTFDRLHDGHRMFLKAAAELARDRIVVGVC DGPMLTKKQFSDMIQPIEERM 72
NS+ AVVLGGTFDRLHDGHR LKAAAELAR R+VVGVC GPML K+ + +I+P+E+R+
Sbjct 14 NSYDAVVLGGTFDRLHDGHRLLKAAAELARVVRVVVGVC TGPML ENKELAH LIEPVEKRI 73

Query 73 RNVETYVKS IKPELVVQAEPITDPYGPSIVDENLEAIVVSKETLPGGLSVNRKRAERGLS 132
+ +E Y+KSIKP LVVQAEPITDPYGPSIVDE+LEAIVVSKETL GGLSVN++RAERGLS
Sbjct 74 KAIENYIKSIK PGLVVQAEPITDPYGPSIVDEDLEAIVVSKETLAGGLSVNRKRAERGLS 133

Query 133 QLKIEVVEIVSDGSSGNKISSSTLRKMEAEKA 164
QLK+EVV +V + +G K+SS+ LR+++A +A
Sbjct 134 QLKVEVVNLVFEAGNGEKLSSALRQLDAFEA 165
    
```

**gb|EDQ82844.1| predicted protein [*Physcomitrella patens* subsp. *patens*]**

Length=194

```

Query 13 NSFGAVVLGGTFDRLHDGHRMFLKAAAELARDRIVVGVC DGPMLTKKQFSDMIQPIEERM 72
N + AVVLGGTFDRLH GH + LKAAAELAR+R+VVG+ G ML+ K+++ +IQP++ R
Sbjct 10 NKYSAVVLGGTFDRLHPGHHVLLKAAAELARERVVVGISTGQMLSNKEYAHLIQPLDVR 69

Query 73 RNVETYVKS IKPELVVQAEPITDPYGPSIVDENLEAIVVSKETLPGGLSVNRKRAERGLS 132
+ VE ++KS+KPEL VQ EPITDPYGPSIVD LEAIVVSKET+ GG SVN+KRAERGLS
Sbjct 70 QAVEVFIKSVKPELVQTEPITDPYGPSIVDPELEAIVVSKETIKGGESVNRKRAERGLS 129

Query 133 QLKIEVVEIVSDGSSGNKISSSTLRKMEAEKASKQKQ 169
QL++EVV+++ + + KISS+ LR+ E K +K+ Q
Sbjct 130 QLQVEVVDLLFEDGNTEKISSAILREREV-QQTKESQ 165
    
```

**gi|95827801|gb|DW998276.1|DW998276**

Length = 606

```

Query: 1 MAAPEDSKMSPANSFGAVVLGGTFDRLHDGHRMFLKAAAELARDRIVVGVC DGPMLTKKQ 60
MAA EDSK+S A+SFGAVVLGGTFDRLHDGHR FLKAAAELARDR+VVGVC DGPML KQ
Sbjct: 49 MAAEEDSKVSTADSF GAVVLGGTFDRLHDGHR TFLKAAAELARDRMVVGVC DGPMLKNKQ 228

Query: 61 FSDMIQPIEERM RNVETYVKS IKPELVVQAEPITDPYGPSIVDENLEAIVVSKETLPGGL 120
F++MIQPIEERM NV+TYVKS IKP+LVVQ +PITDPYGPSIVDE LEAIVVSKETLPGGL
Sbjct: 229 FAEMIQPIEERMLNVQTYVKS IKPDLVVQTD P ITDPYGPSIVDEALEAIVVSKETLPGGL 408

Query: 121 SVNRKRAERGLSQLKIEVVEIVXXXXXXXXXXXXTLRKMEAEKASKQKQPAEEKAS 176
SVNRKRAER LSQLKIEVVEIV TLRK+EAEK + + AE++AS
Sbjct: 409 SVNRKRAERCLSQLKIEVVEIVSDGSSGNKISSSTLRKLEAEK--QNQHAAEQEAS 570
    
```

gi|150912248|gb|ES942706.1|ES942706

Length = 637

Query: 1 MAAPEDSKMSPANSFGAVVLGGTFDRLHDGHRMFLKAAAELARDRIVVGVCDGPMLTKKQ 60  
 MAA EDSK+S A+SFGAVVLGGTFDRLHDGHR FLKAAAELARDR+VVGVCDCGPML KQ  
 Sbjct: 9 MAAAEDSKVSTADSFAGAVVLGGTFDRLHDGHRTFLKAAAELARDRMVVGVCDCGPMLKNKQ 188

Query: 61 FSDMIQPIEERMNRNVETVYVKSIPKPELVVQAEPITDPYGPSIVDENLEAIVVSKETLPGGL 120  
 F++MIQPIEERM NV+TYVKSIPK+LVVQ EPITDPYGPSIVDE LEAIVVSKETLPGGL  
 Sbjct: 189 FAEMIQPIEERMLNVQTYVKSIPKPDLVVQTEPITDPYGPSIVDEALEAIVVSKETLPGGL 368

Query: 121 SVNRKRAERGLSQLKIEVVEIVXXXXXXXXXXXXTLRKMEAEKASKQKQPAEEKAS 176  
 SVNRKRAERGLSQLKIEVVEIV TLRK+EAEK + + AE++AS  
 Sbjct: 369 SVNRKRAERGLSQLKIEVVEIVSDGSSGNKISSSTLRKLEAEK--QNQHAAEQEAS 530

tomato|TC155758 similar to GB|AAQ65117.1|34365611|BT010494 At2g18250  
 {Arabidopsis thaliana;}

Length = 1213

Query: 78 YVKSIPKPELVVQAEPITDPYGPSIVDENLEAIVVSKETLPGGLSVNRKRAERGLSQLKIE 137  
 Y++SIKPEL+V+ EPI DPYGPSIVDENLEAIVVSKETLPGGLSVNR+RAE+GLSQLKIE  
 Sbjct: 702 YIQSIKPELIVEVEPIVDPYGPSIVDENLEAIVVSKETLPGGLSVNRRRAEKGLSQLKIE 881

Query: 138 VVEIVXXXXXXXXXXXXTLRKMEAEK 163  
 VV++V LRK+EAEK  
 Sbjct: 882 VVDLVSEESSGDKLSSTALRKLEAEK 959

Score = 302 (111.4 bits), Expect = 4.2e-59, Sum P(2) = 4.2e-59  
 Identities = 56/81 (69%), Positives = 72/81 (88%), Frame = +3

Query: 9 MSPANSFGAVVLGGTFDRLHDGHRMFLKAAAELARDRIVVGVCDGPMLTKKQFSDMIQPI 68  
 +SP NS+ AVVLGGTFDRLH+GHR+FLK+AAELA++RIVVGVCDGPML KKQ++D+I+PI  
 Sbjct: 213 LSPPNSYTA VVLGGTFDRLHEGHRLEFLKSAAEELAKNRIVVGVCDGPMLIKKQYADLIEPI 392

Query: 69 EERMNRNVETVYVKSIPKPELVVQ 89  
 E RM +VE Y+K +P ++VQ  
 Sbjct: 393 ELRMEHVEDYIKE-EPSILVQ 452

tomato|TC155759 similar to GB|AAQ65117.1|34365611|BT010494 At2g18250  
 {Arabidopsis thaliana;}

Length = 459

Query: 7 SKMSPANSFGAVVLGGTFDRLHDGHRMFLKAAAELARDRIVVGVCDGPMLTKKQFSDMIQ 66  
 S +SP NS+ AVVLGGTFDRLH+GHR+FLK+AAELA++RIVVGVCDGPML KKQ++D+I+  
 Sbjct: 136 STLSPNSYTA VVLGGTFDRLHEGHRLEFLKSAAEELAKNRIVVGVCDGPMLIKKQYADLIE 315

Query: 67 PIEERMNRNVETVYVKSIPKPELVVQAEPITDPYGPSIVDENLEAIVVSKE 114  
 PIE +M +VE Y+KSIKPEL+V+ EPI DPYGPSIVDENLEAIVVSKE

14/14

Sbjct: 316 PIELKMEHVEDYIKSIKPELIVEVEPIVDPYGPSIVDENLEAIVVSKE 459

**SGN-U279993 Solanum tuberosum #4 [3 ESTs aligned] arabidopsis/peptide:**

Length = 725

Query: 7 SKMSPANSFGAVVLGGTFDRLHDGHRMFLKAAAELARDRIVVGVCDGPMLTKKQFSDMIQ 66  
S +SP NS+ +VVLGGTFDRLH+GHR+FLK+AAELA++RIVVGVCDGPMLTKKQ++D+I+  
Sbjct: 18 STLSPPNYSYTSVVLGGTFDRLHEGHRLFLKSAEELAKNRIVVGVCDGPMLTKKQYADLIE 197

Query: 67 PIEERMNRNVETVYVKSIPKPELVVQAEPIITDPYGPSIVDENLEAIVVSKETLPGGLSVNRKR 126  
PIE RM++VE Y+KSIKPEL+V+ EPI DPYGPSIVDENLEAIVVSKETLPGGLSVNR+R  
Sbjct: 198 PIELRMKHVEDYIKSIKPELIVEVEPIVDPYGPSIVDENLEAIVVSKETLPGGLSVNRRR 377

Query: 127 AERGLSQLKIEVVEIVSDGSSGNKISSSTLRKMEAEK 163  
AE+GLSQL+IEVV++VS+ SSG+K+SS+ LRK+EAEK  
Sbjct: 378 AEKGLSQLQIEVVDLVSEESSGDKLSSTALRKLEAEK 488

**eugene3.00570163**

Length = 178

Query: 6 DSKMSPANSEFGAVVLGGTFDRLHDGHRMFLKAAAELARDRIVVGVCDGPMLTKKQFSDMI 65  
++K+SP NS+ AVVLGGTFDRLHDGHR+FLKAAAELA+DRIV+GVCDGPML KQF+++I  
Sbjct: 10 NTKLSPPNYSYSAVVLGGTFDRLHDGHRFLKAAAELAKDRIVIGVCDGPMLKKNQFAELI 69

Query: 66 QPIEERMNRNVETVYVKSIPKPELVVQAEPIITDPYGPSIVDENLEAIVVSKETLPGGLSVNRK 125  
QPIEERM NVE Y+KS KPELVVQ E ITDPYGPSIVDENL AIVVSKET+ GGLSVN+K  
Sbjct: 70 QPIEERMHNVENYIKSFKPELVVQTETITDPYGPSIVDENLGAIIVVSKETVAGGLSVNKK 129

Query: 126 RAERGLSQLKIEVVEIVXXXXXXXXXXXXXXXXTLRKMEAEKASKQKQPAEE 173  
RA+RGLSQLKIEVV++V T + +K++Q E  
Sbjct: 130 RADRGLSQLKIEVVDLVPEESGANKLSSTTLRRLESEKAKEQOTPTE 177

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ ES 2009/000242

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES, EPODOC, TXT

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KUPKE T. ET AL. 4'- Phosphopantetheine and coenzyme A biosynthesis in plants. The Journal of Biological Chemistry 2003 Vol.278, pages 38229-38237. Page 38237.	1 - 8
X	LEONARDI R. ET AL. Coenzyme A: Back in action. Progress in Lipid Research. Vol. 44 pages 125-153. Page 138.	1 - 8
A	YONAMINE I. ET AL. Overexpression of <i>NiHAL3</i> genes confers increased levels of proline biosynthesis and the enhancement of salt tolerance in cultured tobacco cells. Journal of Experimental Botany 2004. Vol.55(396), pages 387-395.	9 - 32
A	US 2003/0056246 A1 ( SASKATCHEWAN WHEAT POOL ) 20.03.2003.	9 - 32

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 September 2009 (04.09.2009)

Date of mailing of the international search report

(09/09/2009)

Name and mailing address of the ISA/  
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.  
Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

I.Rueda Molins

Telephone No. +34 91 349 32 79

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2009/000242

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003056246 A	20.03.2003	CA 2340998 A US 6737564 B	21.09.2002 18.05.2004
<hr/>			

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2009/000242

## CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*C12N 15/82* (2006.01)

*A01H 5/00* (2006.01)

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°  
PCT/ ES 2009/000242

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C12N, A01H

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

INVENES, EPODOC, TXT

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	KUPKE T. ET AL. 4'- Phosphopantetheine and coenzyme A biosynthesis in plants. The Journal of Biological Chemistry 2003 Vol.278, páginas 38229-38237. Página 38237.	1 - 8
X	LEONARDI R. ET AL. Coenzyme A: Back in action. Progress in Lipid Research. Vol. 44, páginas 125-153. Página 138.	1 - 8
A	YONAMINE I. ET AL. Overexpression of <i>NtHAL3</i> genes confers increased levels of proline biosynthesis and the enhancement of salt tolerance in cultured tobacco cells. Journal of Experimental Botany 2004. Vol.55 (396), páginas 387-395.	9 - 32
A	US 2003/0056246 A1 ( SASKATCHEWAN WHEAT POOL ) 20.03.2003.	9 - 32

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos  Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>“A” documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>“E” solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>“L” documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>“O” documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>“P” documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>“T” documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>“X” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>“Y” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>“&amp;” documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

04 Septiembre 2009 (04.09.2009)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

09 de Septiembre de 2009 (09/09/2009)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.  
N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

I.Rueda Molins

N° de teléfono +34 91 349 32 79

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/000242

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US 2003056246 A	20.03.2003	CA 2340998 A US 6737564 B	21.09.2002 18.05.2004
<hr/>			

**CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD**

***C12N 15/82*** (2006.01)

***A01H 5/00*** (2006.01)