

Genética química aplicada a la señalización por giberelinas y fosfato en Arabidopsis



Federico Grau Enguix

Directores

Miguel Ángel Blázquez Rodríguez
David Alabadí Diego

Valencia, septiembre de 2017

RESUMEN

La genética química es una potente herramienta basada en el empleo de moléculas para estudiar funciones génicas conocidas o descubrir nuevas funciones, mediante la identificación de compuestos químicos que interfieran o promuevan ciertos procesos biológicos de interés. En esta tesis se ha explorado el uso de la genética química con el fin de diseccionar rutas de señalización en plantas, tanto con un objetivo de generar conocimiento fundamental, como con un objetivo más aplicado. En ambos casos, el abordaje ha consistido en el rastreo de una quimioteca de 10 mil compuestos, para encontrar aquéllos con las propiedades deseadas.

Las giberelinas son hormonas vegetales que regulan distintas transiciones del desarrollo de las plantas, y permiten optimizar el patrón de crecimiento en función de las condiciones ambientales. La señalización por giberelinas supone la inducción de la degradación de las proteínas DELLA, proteínas de localización nuclear que regulan la expresión génica mediante la interacción física con más de 100 factores de transcripción. El hecho de que estas hormonas provoquen efectos tan amplios nos ha impulsado a la búsqueda de compuestos equivalentes a las giberelinas pero que afecten sólo a algunos procesos en concreto, sin alterar el resto. Para ello hemos realizado dos rastreos: el primero buscando compuestos agonistas de giberelinas en la expansión celular en *Arabidopsis*, y el segundo buscando compuestos que impidan de forma selectiva la interacción entre DELLAs y sólo un subgrupo reducido de factores de transcripción mediante el ensayo de doble híbrido en levadura. En ambos casos, los rastreos han permitido identificar moléculas con el comportamiento deseado: moléculas que activan la ruta de giberelinas de forma independiente de su receptor (es decir, en etapas posteriores de la señalización), y moléculas que inhiben la interacción de DELLAs preferentemente con ARR1, BZR1, PIF4 o KAN1.

El fósforo es un componente esencial para las plantas, y éstas lo toman en forma de fosfato inorgánico, cuya fuente, la roca fosfórica, es un recurso limitado, no renovable y del que no se dispone alternativa. Debido a ello, la fertilización fosfatada sufre un encarecimiento sostenido. En colaboración con Dadelos Agrosolutions S.L. se han buscado compuestos que mejoren la capacidad de asimilación de fosfato, usando la línea marcadora *IPS1::GUS* en

Arabidopsis. La expresión de este testigo se induce en presencia de concentraciones bajas de fosfato, y el rastreo de la quimioteca de 10 mil compuestos ha permitido encontrar aquellos que mantienen la expresión del testigo reprimida incluso en bajo fosfato. Aún más importante es la observación de que algunos de estos compuestos mejoran el crecimiento de las plantas en concentraciones subóptimas de fosfato, y que los análisis metabolómicos y transcriptómicos sugieren que estos compuestos favorecen la asimilación de fosfato.

RESUM

La genètica química és una potent eina basada en l'ús de molècules per estudiar funcions gèniques conegudes o descobrir noves funcions, mitjançant la identificació de compostos químics que interfereixin o promoguin certs processos biològics d'interès. En aquesta tesi s'ha explorat l'ús de la genètica química per tal de dissecionar rutes de senyalització en plantes, tant amb un objectiu de generar coneixement fonamental, com amb un objectiu més aplicat. En ambdós casos, l'abordatge ha consistit en el rastreig d'una quimioteca de 10 mil compostos, per trobar aquells amb les propietats desitjades.

Les gibberel·lines són hormones vegetals que regulen diferents transicions del desenvolupament de les plantes, i permeten optimitzar el patró de creixement en funció de les condicions ambientals. La senyalització per gibberel·lines suposa la inducció de la degradació de les proteïnes DELLA, proteïnes de localització nuclear que regulen l'expressió gènica mitjançant la interacció física amb més de 100 factors de transcripció. El fet que aquestes hormones generin efectes tan amplis ens ha impulsat a la recerca de compostos equivalents a les gibberel·lines però que afectin només a alguns processos en concret, sense alterar la resta. Per això hem realitzat dos rastrejos: el primer buscant compostos agonistes de gibberel·lines en l'expansió cel·lular en *Arabidopsis*, i el segon buscant compostos que impedeixin de manera selectiva la interacció entre DELLAs i només un subgrup reduït de factors de transcripció mitjançant l'assaig de doble híbrid en llevat. En tots dos casos, els rastrejos han permès identificar molècules amb el comportament desitjat: molècules que activen la ruta de gibberel·lines de forma independent del seu receptor (és a dir, en etapes posteriors de la senyalització), i molècules que inhibeixen la interacció de DELLAs preferentment amb ARR1, BZR1, PIF4 i KAN1.

El fòsfor és un component essencial per a les plantes, i aquestes ho prenen en forma de fosfat inorgànic, del qual la font, la roca fosfòrica, és un recurs limitat, no renovable i del qual no es disposa alternativa. A causa d'això la fertilització fosfatada pateix un encariment sostingut. En col·laboració amb Dadelos Agrosolutions S.L. s'han buscat compostos que millorin la capacitat d'assimilació de fosfat, mitjançant el rastreig de la quimioteca i la selecció de molècules que permetin reprimir l'expressió del marcador IPS::GUS en *Arabidopsis* en condicions subòptimes de fosfat en les que aquest està

normalment encès. S'han pogut trobar tres compostos que augmenten la capacitat del fòsfat per a reprimir l'expressió gènica, alhora que augmenten la capacitat de creixement de les plantes en presència de concentracions subòptimes de fòsfat.

ABSTRACT

Chemical genetics is a powerful approach that uses small molecules to probe gene function. In this Thesis, we have explored the use of chemical genetics to dissect plant signaling pathways, both with an academic goal of generating new knowledge of those pathways, and also from a biotechnological perspective. Our approach has consisted in screening a library of 10.000 compounds to search those with the expected effects in different situations.

Gibberellins are plant hormones that regulate multiple processes in plant development and that allow them to tune their growth and development according to the environmental conditions. Gibberellin signaling proceeds through the degradation of DELLA proteins, the negative regulators of the pathway that regulate gene expression through the interaction with multiple transcription factors. To further dissect this pathway, we have sought to identify compounds with gibberellin-like activity affecting only a subset of processes. For that purpose, we have performed two screenings, in one of them we have searched for compounds affecting cell expansion in Arabidopsis seedlings, and in the other for compounds that prevent the interaction of a DELLA protein with a particular transcription factor in yeast two-hybrid assays. We have identified compounds with the expected behavior: compounds that activate the pathways downstream of the receptor, and others that prevent interaction with ARR1, BZR1, PIF4 or KAN1.

Gibberellins are plant hormones known to regulate multiple aspects of plant development mainly transferring environmental information to pre-established developmental programs. Gibberellin signaling proceeds through the degradation of nuclear localized DELLA proteins, which regulate gene expression through physical interaction with over 100 transcription factors. The vast effect of gibberellins on plant growth has prompted us to search for compounds that exert gibberellin-like effects limited to certain agronomically important traits without affecting the rest of the processes. Here we have attempted two strategies: in the first one, we have tried to identify gibberellin agonists for cell expansion in Arabidopsis; and in the second one we have searched for compounds that specifically prevent the interaction of DELLAs with a smaller set of transcription factors. The first screening has yielded compounds that mimic gibberellin action but act downstream of the gibberellin receptor,

and the second one has allowed the identification of molecules that specifically impair the interaction with ARR1, BZR1, PIF4 or KAN1.

Phosphorus is an essential component for plants, which is taken up in the form of inorganic phosphate. The source of phosphate fertilizers is limited at a global scale, not renewable, and currently without an alternative. In collaboration with Dadelos Agrosolutions SL, we have searched for compounds which improve phosphate assimilation, using the Arabidopsis reporter line *IPS1::GUS*. The expression of this reporter gene is induced in the presence of low phosphate concentrations, and we have successfully screened the collection of 10.000 compounds to find those that allow repression of this reporter gene at low phosphate. Importantly, some of these compounds also improve plant growth under suboptimal phosphate concentrations, and the metabolomic and transcriptomic analyses in the presence of these compounds suggest that they favor phosphate assimilation.



ABREVIATURAS

Abreviaturas

ABA	Ácido abscísico
ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
bHLH	Hélice-bucle-hélice básica / <i>Basic helix-loop-helix</i>
BR	Brasinosteroides
CK	Citoquinas
DMSO	Dimetilsulfóxido
FC	Tasa de cambio / <i>Fold change</i>
FR	Rojo lejano / <i>Far-red</i>
GA	Giberelina
GUS	β -glucuronidasa
H	Histidina
HR	Humedad relativa
IAA	Ácido indolacético
JA	Ácido jasmónico
L	Leucina
LD	Día largo / <i>Long day</i>
Ler	Landsberg <i>erecta</i>
MoA	Modo de acción / <i>Mode-of-action</i>
OD	Densidad óptica
P	Fósforo
PAC	Paclobutrazol
PCA	Análisis de componentes principales Reacción de cadena de la polimerasa / <i>Polymerase Chain</i>
PCR	<i>Reaction</i>
Pi	Fosfato inorgánico
PS	Fotosistema
PSI	Inducible por ayuno de fosfato / <i>Pi-starvation-inducible</i>
qPCR	PCR cuantitativa
R	Rojo / <i>Red</i>
RNasa	Ribonucleasa
RT	Transcripción reversa
SA	Ácido salicílico
SD	Día corto / <i>Short day</i>
T	Triptófano
TF	Factor de transcripción / <i>Transcription factor</i>

TR	Regulador de transcripción / <i>Transcription regulator</i>
UV	Ultravioleta
Y2H	Sistema de doble híbrido en levadura / <i>Yeast two hybrid</i>
3AT	3-amino-1,2,4-triazol



ÍNDICE

I	INTRODUCCIÓN	14
1.	Genética química.	15
2.	Fitohormonas: giberelinas.	22
3.	Las proteínas DELLA.	26
4.	Degradación de las DELLA inducida por GAs: complejo GA-GID1-DELLA.	28
5.	Las DELLA como <i>hubs</i> .	30
6.	Fosfato inorgánico: la forma del fósforo asimilable por las plantas.	32
7.	Importancia biológica del fósforo.	33
8.	Respuestas ante la carencia de fosfato.	35
9.	Señalización por ayuno de fosfato.	35
II	OBJETIVOS	39
III	RESULTADOS	41
1.	Identificación de análogos o activadores de la señalización por GAs.	44
1.1	Puesta a punto del rastreo.	44
1.2	Rastreo de 10.000 moléculas de la colección DIVERSet™.	46
1.3	Estudio de homología estructural de las moléculas seleccionadas.	47
1.4	Efecto de los compuestos en mutantes de la ruta de GAs.	48
1.5	Efecto de los compuestos en la degradación de las proteínas DELLA.	50

2.	Identificación de inhibidores selectivos de la interacción de las proteínas DELLA.	53
2.1	Puesta a punto del rastreo.	53
2.2	Rastreo de 10.000 moléculas de la colección DIVERSet™.	56
2.3	Cinética de crecimiento de cultivos de levadura en respuesta al tratamiento con los 12 compuestos seleccionados.	58
3.	Identificación de moléculas que faciliten la absorción de fosfato.	62
3.1	Preparación del rastreo.	62
3.2	Rastreo de 10.000 moléculas de la colección DIVERSet™.	63
3.3	Estudio de homología estructural de las moléculas seleccionadas.	64
3.4	Caracterización fisiológica de la respuesta a los compuestos.	64
3.5	Análisis de la expresión de genes PSI ante el tratamiento con los compuestos seleccionados.	68
3.6	Análisis del metaboloma de plántulas de Arabidopsis tratadas con los compuestos seleccionados.	70
3.7	Análisis transcriptómico de plántulas de Arabidopsis tratadas con los compuestos seleccionados.	72
3.8	Derivatización del compuesto #268	74
3.9	Caracterización fisiológica de la respuesta a los análogos de #268.	75
IV	DISCUSIÓN	78
V	CONCLUSIONES	85

VI	MATERIALES Y METODOS	87
1.	Colección de compuestos químicos.	88
2.	Material vegetal y esterilización de semilla.	88
3.	Medios de cultivo y condiciones de crecimiento en los rastreos de Arabidopsis.	89
4.	Material bacteriano: protocolo de transformación y condiciones de crecimiento.	90
5.	Levadura: protocolo de transformación y condiciones de crecimiento.	91
6.	Purificación de DNA plasmídico.	93
7.	Reacciones de clonaje Gateway™ BP y LR.	93
8.	Protocolos de PCR y electroforesis.	93
9.	Extracción de DNA a partir de geles.	94
10.	Extracción de RNA total.	95
11.	Síntesis de cDNA.	95
12.	Análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR.	95
13.	Análisis de la actividad GUS.	96
14.	Extracción de proteínas y western blot.	96
15.	Análisis del metaboloma primario.	97
16.	Análisis de RNA-Seq.	97
17.	Análisis estadístico para determinar similitud a nivel transcriptómico entre en tratamiento con los diferentes compuestos y el fosfato.	99
18.	Análisis de ontología génica.	99
19.	Derivatización y pruebas de analogía y similitud de moléculas.	100
VII	REFERENCIAS	101

I. INTRODUCCIÓN

1. Genética química

En los primeros tiempos de la investigación genética en plantas, un gen sólo podía identificarse a partir de alteraciones fenotípicas. Es decir, partiendo del fenotipo de un mutante se identificaba el locus en el que se había producido la mutación responsable del fenotipo alterado, y se intentaba clonar el gen correspondiente. Ésta es la llamada genética “directa”, cuyo término es utilizado como sinónimo en sentido amplio de genética “clásica”. Los avances aportados por la llegada de la biología molecular permitieron invertir el abordaje: partiendo de un gen conocido, se determinaba su función mediante el empleo de herramientas de genética molecular y transgénesis para generar mutantes, y el análisis de su fenotipo se deducía la función. Ésta es la conocida como genética “reversa”.

La genética química es una nueva y potente herramienta para estudiar la función génica que en lugar de mutaciones utiliza moléculas para descubrir genes o funciones de interés (Figura 1.1). La labor fundamental de la genética química puede resumirse en identificar y caracterizar moléculas bioactivas mediante cribado, bioensayos y optimización química, y emplear esas moléculas como herramientas químicas para estudiar dianas biológicas.

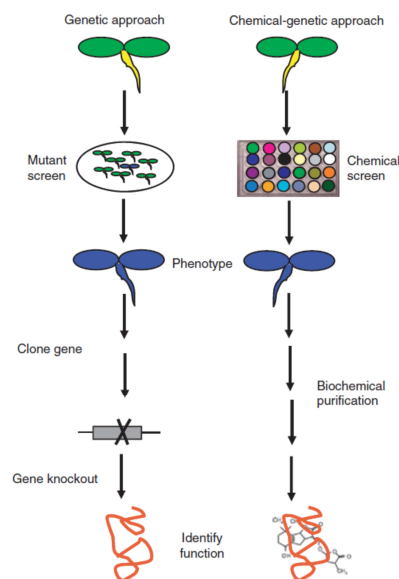


Figura 1.1: Comparación entre un rastreo genético clásico y un rastreo de genética química. (A) La estrategia genética generalmente conlleva rastrear una gran población de mutantes en busca de un fenotipo de interés, obtener la generación F2 entre el mutante y su parental silvestre, y clonar el gen. (B) En el abordaje de genética química el rastreo de fenotipos alterados se efectúa frente a una colección de moléculas. Una vez identificado un fenotipo de interés, se pueden usar estrategias bioquímicas para identificar la diana del compuesto. (De McCourt and Desveaux, 2009).

Dependiendo del tipo de abordaje, suele distinguirse entre genética química directa y reversa (Figura 1.2). En el primer caso, el enfoque consiste en someter a un organismo a un rastreo frente a una colección de moléculas. Una vez seleccionado un fenotipo inducido químicamente, la identificación de la diana del compuesto puede realizarse por una aproximación genética –por ejemplo rastreando mutantes resistentes al compuesto–, o bien mediante técnicas bioquímicas que permitan purificar dicha diana por su interacción con el compuesto químico. Es decir, se parte de una molécula que produce un fenotipo específico y se intenta identificar la proteína que se enlaza con la molécula y causa el fenotipo al tener su función modulada. En el abordaje reverso el punto de partida es una proteína de interés, y se intenta interferir químicamente con su función con una colección de compuestos o diseñando moléculas sintéticas específicas que puedan modular su actividad, evaluando el fenotipo obtenido en el organismo de interés (Serrano et al., 2015; Dejonghe and Russinova, 2017).

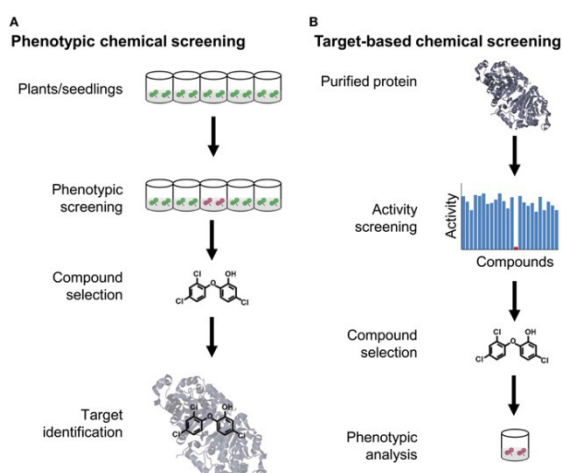


Figura 1.2: Comparación entre abordajes de genética química directa (A) y reversa (B). (A) El objetivo del rastreo directo o fenotípico es identificar, a partir de una colección de sustancias químicas, un compuesto bioactivo que provoque una alteración fenotípica. Una vez que se encuentra este compuesto, se identifica el objetivo molecular. (B) El objetivo del rastreo reverso o basado en diana es identificar un compuesto que module la actividad de una proteína de interés. Posteriormente, el compuesto químico se utiliza para determinar el efecto fenotípico. (De Serrano et al., 2015).

El conjunto de todas las estructuras moleculares posibles se denomina universo químico, y se caracteriza por la variación en múltiples propiedades: el peso molecular, el área superficial, la carga eléctrica, el índice de hidrofobicidad, el número de donadores o aceptores de enlaces por puentes de hidrógeno y el número de enlaces de rotación libre. Las regiones del universo químico donde residen componentes biológicamente activos definen el espacio químico de interés biológico (Fu, 2012). La identificación de moléculas activas mediante rastreos se basa en la existencia de este espacio químico, es decir, en una colección de moléculas (quimioteca) complementaria al espacio diana explorado, biológico. Y el tamaño de ese espacio químico o quimioteca dependerá en gran medida del conjunto de propiedades que se escojan. Las moléculas que ocupan el espacio químico biológico se definen mediante descriptores de diversa índole como descriptores fenotípicos –si causan alteraciones en el fenotipo–, o descriptores de bioactividad –si tienen efecto sobre la actividad enzimática.

Los requisitos de los compuestos que componen el espacio de interés biológico en el campo de la agroquímica (Tabla 1.1) se rigen por las mejoras propuestas por Ghose et al., 1999 a la ‘regla de cinco de Lipinski’ (Lipinski et al., 1997), con ligeras modificaciones para herbicidas e insecticidas (Tice, 2001).

Tabla 1.1: Parámetros asociados a la bioactividad de una molécula.

<u>Propiedad molecular</u>	
Peso molecular (Da)	150 - 500
Donadores de enlaces por puentes de H	≤ 5
Aceptores de enlaces por puentes de H	≤ 10
log <i>P</i> (coeficiente de reparto octanol/agua)	≤ 5
Radicales de rotación libre	≤ 12

Además de la regla de Lipinski, las quimiotecas de compuestos bioactivos deben cumplir una serie de características para considerarse útiles: variedad en complejidad estructural, gran diversidad química, muy baja reactividad química, exhaustivos estudios de relación estructura-actividad (SAR) a partir del análisis de derivados de los compuestos para identificar qué grupo contribuye a la bioactividad, y elevada probabilidad de identificar dianas tanto por abordajes genéticos como bioquímicos (Toth and van der Hoorn, 2010).

La confluencia de los progresos en las áreas de la química, biología y genética por un lado, y en las técnicas de automatización y computación por otro, han posibilitado en gran medida la irrupción de la genética química. Además, los avances y el abaratamiento de los últimos años en las tecnologías de secuenciación y síntesis química han sido cruciales en el éxito de la genética química. La secuenciación y la subsecuente genómica comparada han revelado un gran número de posibles dianas. De forma paralela, los avances en química combinatoria han posibilitado la confección de quimiotecas sintéticas y la comercialización de moléculas que hasta el momento eran económicamente inviables. Todo ello ha contribuido a la búsqueda sistemática de moduladores moleculares que nos permitan elucidar las complejas redes de los sistemas biológicos.

El creciente interés de la industria farmacéutica, y más recientemente de la biotecnología, en la identificación y catalogación de productos naturales y moléculas sintéticas para dirigirlos contra dianas específicas, ha supuesto un empuje que ha propiciado la rápida progresión de la genética química. Tal es así, que en los últimos años se ha intensificado la búsqueda de fármacos y el desarrollo de moléculas bioactivas que sirvan como medicinas y como herramientas moleculares en investigación básica, abriendo nuevas posibilidades para investigaciones funcionales.

Los ensayos de genética química requieren rastreos de alto rendimiento, por lo que resultan esenciales sistemas fácilmente reproducibles y maleables genéticamente como los cultivos celulares o levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). En cuanto a los organismos modelo utilizados en genética química, es necesario que produzcan un gran número de embriones. Entre ellos encontramos *Caenorabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis* o *Danio rerio*. En la biología vegetal, el modelo más utilizado ha sido *Arabidopsis thaliana*.

Los rastreos de genética química realizados en *Arabidopsis* han consistido principalmente en sembrar semillas silvestres en medio al que se ha añadido una colección de compuestos y ver qué moléculas causan un determinado fenotipo en la plántula (Figura 1.3A). Mientras que la continuación más habitual ha sido identificar mutantes resistentes a ese compuesto para identificar el genes implicados en la actividad del compuesto (Figura 1.3B).

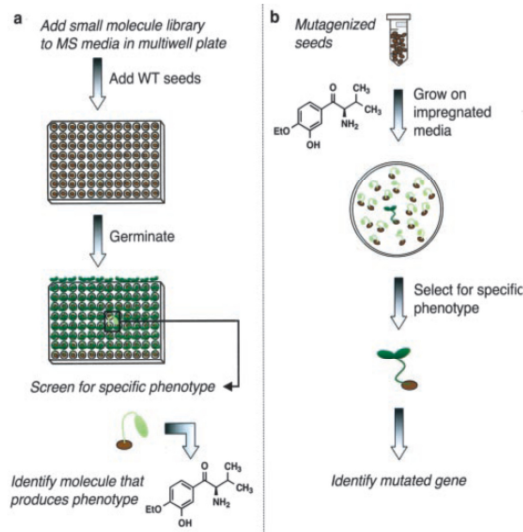


Figura 1.3: Rastros de genética química en plantas. (A) Rastreo directo para identificar moléculas causantes de un fenotipo específico. (B) Rastreo de mutantes resistentes a los efectos de un determinado compuesto. (De Blackwell and Zhao, 2003).

La mayoría de los rastros químicos en plantas hechos hasta la fecha están basados en la selección por fenotipo (Tabla 1.2) y han estado relacionados con la señalización de hormonas de crecimiento. Por ejemplo, relacionado con la ruta de brasinosteroides (BR) se ha identificado la bikinina, una molécula que activa la señalización de BR aguas abajo del receptor de BR. Esta molécula interactúa con 7 de las 10 GSK3s (glycogen synthase kinase 3) de *Arabidopsis* que modulan la señalización de BR, actuando como competidor del ATP e inhibiendo su actividad. La inhibición de estas 7 GSK3s es suficiente para activar las respuestas a BR, lo que sugiere que la inactivación de GSK3s es una etapa esencial en la señalización de esta hormona (De Rybel et al., 2009). En otro rastreo químico se ha encontrado el brassinopride (BRP), un compuesto que inhibe la señalización de BR y activa la respuesta a etileno (Gendron et al., 2008).

Tabla 1.2: Rastreo de genética química en planta basados en fenotipo.

Compuesto	Modo de acción	Referencia
Señalización hormonal		
Gravacin	Inhibidor del transporte de auxinas	(Surpin et al., 2005)
Proauxins	Activadores de la señalización por auxinas	(Savaldi-Goldstein et al., 2008)
Yucasin	Inhibidor de la síntesis de IAA	(Nyshimura et al., 2014)
Rootin	Altera de la distribución de PIN mediada por auxina	(Jeong et al., 2015)
Germostatin	Activador de la señalización por auxinas	(Ye et al., 2016)
Pyrabactin	Agonista selectivo de ABA	(Zhao et al., 2007)
DFPM	Regulador negativo de la señalización por ABA	(Kim et al., 2011)
AA1	Antagonista de ABA	(Ye et al., 2017)
Bestatin	Activador de la señalización por JA	(Zheng et al., 2006)
Jarin-1	Inhibidor de la señalización por JA	(Meesters et al., 2014)
Brassinopride	Inhibidor de la síntesis de BR	(Gendron et al., 2008)
Bikinin	Activador de la señalización por BR	(De Rybel et al., 2009)
Accinones	Inhibidores de la síntesis de etileno	(Lin et al., 2010)
L-kynurenine	Inhibidor de la síntesis de auxinas regulada por etileno	(He et al., 2011)
Cotylimides	Inhibidor de la síntesis de estrigolactonas	(Tsuchiya et al., 2010)
Soporidine	Inhibidor de la señalización por estrigolactonas	(Holbrook-Smith et al., 2016)

Compuesto	Modo de acción	Referencia
Desarrollo		
PATI-1 a -4 HYVP-1 a -3 OVP-1 y -2	Modificadores del patrón vascular	(Carland et al., 2016)
C17	Inhibidor de la síntesis de celulosa	(Hu et al., 2016)
Hyperphyllin	Aumenta la tasa de formación de hojas	(Poretska et al., 2016)
Bubblin	Inhibidor de la división asimétrica estomatal	(Sakai et al., 2017)
Tráfico de membranas		
Endosidin1	Inhibidor de la actina del citoesqueleto	(Robert et al., 2008)
Endosidin2	Inhibidor de exocitosis	(Zhang et al., 2016)
Endosidin9	Inhibidor de endocitosis	(Dejonghe et al., 2016)
Inmunidad y muerte celular		
Oxytriazine Fluazinam Cantharidin Epiclonil Triclosan	Modificadores de la respuesta inmune desencadenada por el patrón molecular asociado a patógenos (PAMP)	(Serrano et al., 2007)
Imprimatin A y B	Potenciadores de muerte celular activada por patógenos. Afectan al metabolismo de SA.	(Noutoshi et al., 2012)
Asimilación de fosfato		
Phosphatin	Alivia las respuesta a ayuno de fosfato	(Arnaud et al., 2014)
Phostin	Inductor de las respuestas a ayuno de fosfato	(Bonnot et al., 2016)

No solo se han encontrado compuestos que permiten inferir elementos conocidos en las distintas rutas de señalización. Los abordajes de genética química también han conseguido identificar nuevas dianas como SIR1, un regulador positivo de auxinas (Zhao et al., 2003), PGP19 (P-glycoprotein19), una diana de la gravacina, la cual altera el gravitropismo a través de la inhibición del transporte de auxina llevado a cabo por los complejos PGP19-PIN (Rojas-Pierce et al., 2007), o BIL4, una proteína transmembrana que regula la elongación celular mediando en la señalización de BR (Yamagami et al., 2009).

Los sistemas de doble híbrido en levadura (Y2H) son una herramienta especialmente adecuada para identificar moléculas que interfieran con las interacciones proteína-proteína y, especialmente, con los complejos receptores de hormonas (Quini, 2014). Este tipo de rastreo se ha empleado para encontrar agonistas y antagonistas de JA (Fonseca et al., 2014) y también para identificar la quinabactina, un agonista de ABA que activa los receptores PYR1, PYL1, PYL2 y PYL3. (Okamoto et al., 2013).

Las posibilidades de la genética química son amplias, y dependiendo del enfoque con el que se plantee un rastreo químico, se puede dirigir en gran medida el tipo de actividad de las moléculas obtenidas a partir de éste.

2. Fitohormonas: giberelinas.

Las hormonas vegetales son compuestos orgánicos principalmente derivados de las rutas de metabolitos secundarios, que actúan a muy bajas concentraciones y que son capaces de regular procesos fisiológicos. Además, la mayoría poseen la facultad de ser transportadas a través de los tejidos conductores a lo largo de la planta desde el lugar de síntesis hasta el lugar donde realizan su acción.

Tienen dos características distintivas con respecto a las hormonas animales: ejercen efectos pleiotrópicos, actuando sobre numerosos procesos fisiológicos, y su síntesis no está restringida a un órgano especializado, sino que casi todos los tipos celulares tienen capacidad de síntesis, y existe una variación cualitativa y cuantitativa según los órganos.

Previamente a su descubrimiento, investigaciones del S. XIX ya demostraron que determinados procesos del crecimiento vegetal estaban regidos por ciertas sustancias móviles. Ya en el S. XX empezaron a determinarse los primeros reguladores, los que hoy conforman las denominadas hormonas clásicas (auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico). El número ha ido aumentando con la identificación posterior de brasinosteroides, ácido salicílico, jasmonatos, y estrigolactonas.

Las hormonas se han venido separando en dos grupos: las hormonas de crecimiento (auxinas, citoquininas, giberelinas o brasinosteroides) y aquellas que están relacionadas con procesos de estrés (etileno, ácido jasmónico o ácido salicílico). Sin embargo, estudios recientes apuntan a que muchos de estos reguladores están implicados en ambos tipos de procesos (desarrollo y estrés) (Jaillais and Chory, 2010).

Las giberelinas (GAs) son una amplia familia de diterpenos ácidos cuyo esqueleto básico está constituido por un anillo de ent-giberelano. Se dividen en GAs de 19 ó 20 átomos de C, siendo estas últimas las que tienen mayor actividad. Deben su nombre al hongo *Gibberella fujikuroi*, causante de una enfermedad detectada en 1926 que provocaba un hipercrecimiento de la caña de arroz y su posterior encamado. En 1938 Yabuta y Sumiki aislaron la sustancia causante de dicho efecto y la denominaron giberelina. En la década de los 50 comprobó que las plantas también podían sintetizar GAs y se empezó a sugerir que actuaban como reguladores endógenos del crecimiento (Radley, 1956; Phinney et al., 1957).

Durante las décadas de los 60 y 70 acontecería el hito que más tarde revelaría la gran importancia que las GAs tienen en la agricultura moderna: la "Revolución Verde". Ésta se basó en la obtención de forma empírica de variedades enanas de los principales cultivos extensivos a nivel mundial, principalmente cereales (maíz, trigo y arroz), que aportaban una mayor relación grano/paja además de ciertas tolerancias a determinados tipos de estrés. Más tarde se sabría que dichas variedades eran mutantes de señalización de GAs (Peng et al., 1999).

Existen más de 125 GAs en plantas superiores, pero sólo unas pocas tienen actividad biológica. El resto son precursores o productos inactivos. Las más bioactivas son GA₁, GA₃ y GA₄. GA₁ es además la GA más común en plantas.

La síntesis de GAs se realiza a través de la vía de los terpenoides y transcurre en tres compartimentos celulares (Hedden and Phillips, 2000). Comienza en los plastos con la formación de ent-kaureno a partir de geranil geranil difosfato (GGDP) mediante reacciones de ciclización, el cual se oxida en el retículo endoplasmático a GA₁₂-aldehído, la primera GA. A partir de GA₁₂ se sintetizan las demás giberelinas en el citosol mediante una serie de reacciones de oxidación catalizadas principalmente por dos grupos de oxidasas, las GA20-oxidasas (GA20ox) y las GA3-oxidasas (GA3ox), al final de las cuales se obtiene GA4 (Figura 1.4) (Appleford et al., 2006; Sponsel, 2006), la giberelina más bioactiva en Arabidopsis. GA₁₂ es también sustrato de las GA13-oxidasas (GA13ox), que la oxidan a GA₅₄, precursor de GA₁, la giberelina más activa en arroz.

Las GAs también son susceptibles a la desactivación enzimática. La reacción mejor conocida es la llevada a cabo por las GA2-oxidasas (GA2ox), las cuales oxidan las GAs bioactivas a formas inactivas (Figura 1.4). Además también son capaces de oxidar los precursores directos de las GAs bioactivas, regulando de este modo la cantidad de sustrato disponible para las GA3ox durante la síntesis de GAs (Thomas et al, 1999; Schomburg et al., 2003).

La síntesis de GAs, así como los niveles de GAs bioactivas, están regulados por mecanismos de retroalimentación (Hedden and Phillips 2000). El propio contenido de GA regula los niveles de expresión de las GA20ox, GA3ox y GA2ox para establecer la homeostasis. De este modo, ante un déficit de GA aumentan los niveles de expresión de GA20ox y GA3ox (Phillips et al., 1995; Yamaguchi et al., 1998; Xu et al., 1999) y disminuye el de GA2ox (Thomas et al, 1999). Al contrario ocurre si los niveles son altos.

Además de este mecanismo de autorregulación, existen otros estímulos que modulan los niveles de GAs bioactivas, y por lo tanto están implicados en la homeostasis de GA. Es el caso de hormonas tales como las auxinas, que inducen la expresión de los genes del metabolismo de GAs en Arabidopsis (Frigerio et al., 2006), los brasinosteroides, que inducen la expresión de AtGA20ox1 (Bouquin et al., 2001), el ABA, que tiene un efecto negativo sobre los genes de biosíntesis de GA (Schomburg et al., 2003), o el etileno, cuyo efecto sobre el contenido de GA depende del proceso de desarrollo (Achard et al., 2007).

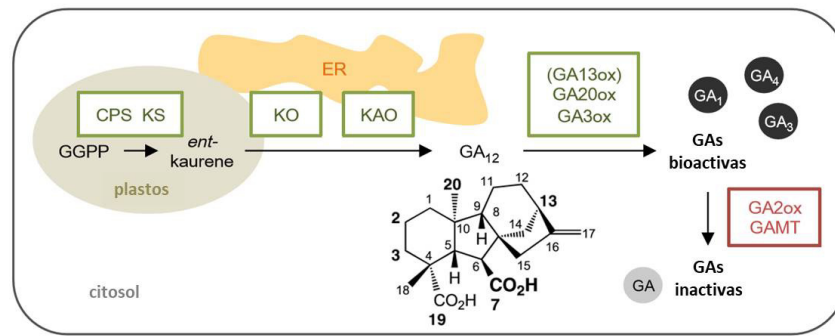


Figura 1.4: Biosíntesis de giberelinas. ER: retículo endoplásmico; GGDP: geranylgeranyldiphosphate; CPS: ent-copalyl diphosphate synthase KS: ent-kaurene synthase; KO: ent-kaurene oxidase; KAO: ent-kaurenoic acid oxidase; GA13ox: GA 13-oxidase; GA20ox: GA 20-oxidase; GA3ox: GA 3-oxidase; GA2ox: GA 2-oxidase; GAMT: gibberellin methyltransferase; (Adaptado de Schmunk, 2014).

Algunos estímulos ambientales también han demostrado ser importantes moduladores de los niveles de GAs bioactivas. La luz es uno de los principales estímulos que afectan a los procesos de desarrollo, y hay varios trabajos que relacionan las señales lumínicas con la producción de GAs. En semillas la luz induce la síntesis de GAs aumentando los niveles de expresión de *GA20ox* y *GA3ox*, y reprimiendo la expresión de *GA2ox* (Yamaguchi et al., 1998; Oh et al., 2006, Yamauchi et al., 2007). Curiosamente, después de la germinación el efecto de la luz es justamente el contrario, es decir, disminuye la expresión de los genes de biosíntesis y aumenta la de *GA2ox* (Achard et al., 2007; Alabadí et al., 2008). La temperatura es otro importante factor externo que afecta al desarrollo vegetal, en parte a través de la modulación de los niveles de GAs. La estratificación de semillas de *Arabidopsis* en condiciones de oscuridad y bajas temperaturas promueve la síntesis de GA promoviendo la expresión de los genes de síntesis *GA20ox* y *GA3ox* y reprimiendo los genes *GA2ox* (Yamauchi et al., 2004). El efecto de la temperatura en crecimiento de hipocotilo es el contrario una vez germinadas las semillas (Stavang et al., 2009).

Por último, es bien conocido que las plantas reducen su tasa de desarrollo ante condiciones de estrés, y esto es en parte debido a que decrece el contenido de GA. Por ejemplo, las plantas que crecen en condiciones de

salinidad poseen menos GAs bioactivas (Achard et al., 2006), y se ha propuesto como causa la sobrerregulación de *GA2ox7* (Yamaguchi, 2008).

Estos resultados apuntan a que la homeostasis de GA está regulada por diversos factores, tanto internos como externos, que actúan en conjunto conseguir que se sintetice la cantidad óptima de GA.

3. Las proteínas DELLA.

La señalización por GAs se basa en la degradación de las proteínas DELLA, que son represoras del crecimiento. El modo en que las GAs promueven el crecimiento es a través de la inactivación de estas proteínas, actuando como “inhibidor de un inhibidor” (Harberd et al., 2009) mediante la creación del complejo GA-GID1-DELLA.

Las proteínas DELLA forman parte de la familia génica GRAS, compuesta por factores de transcripción altamente conservados específicos de vegetales, que juegan un papel central en distintos procesos de desarrollo, transducción de señales y mantenimiento de meristemas (Bolle, 2004). Consta al menos de 33 miembros en *Arabidopsis* divididos en 8 subfamilias. Las 5 DELLAs descritas en *Arabidopsis* constituyen la subfamilia IV.

Las proteínas GRAS poseen un dominio C-terminal conservado, llamado dominio GRAS. Éste a su vez está formado por una región de interacción rica en leucina y una región reguladora (Figura 1.5). La parte N-terminal es variable y confiere singularidad a cada subfamilia.

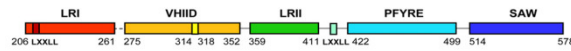
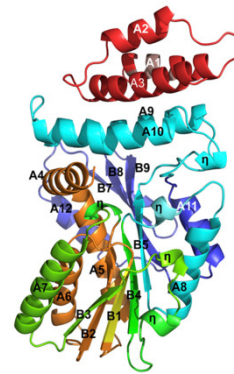


Figura 1.5: Motivos conservados (arriba) y estructura del dominio GRAS de OsSCL7 (derecha) (De Li et al., 2016).



Las DELLAs son represores de la señalización de GAs, y reciben este nombre por el dominio homónimo que se encuentra en el tercio N-terminal, el cual contiene dos motivos altamente conservados (DELLA y VHYNP) y una región Poly S/T, diana de fosforilaciones o glicosilaciones y que regula la actividad represora (Bolle, 2004) (Figura 1.6). Los motivos LHR pueden mediar interacciones entre proteínas; de hecho a esta primera parte del dominio C-terminal rica en leucina se la conoce como dominio de dimerización, y fue caracterizado mediante ensayos de doble híbrido en levadura donde se comprobó la formación de homodímeros de SLR1 (Itoh et al., 2002).

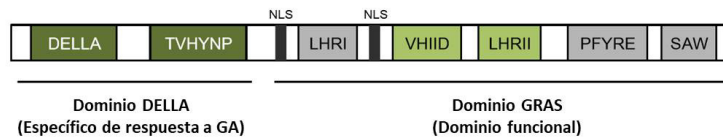


Figura 1.6: Representación esquemática de las proteínas DELLA. LHR, Leu heptad repeat; NLS, nuclear localization signal. (Adaptado de Sun and Gubler, 2004 y de Davière and Achard, 2013).

Las DELLAs se localizan en el núcleo. Son estables a bajas concentraciones de GAs, pero se desestabilizan rápidamente al aumentar los niveles de GAs (Peng and Harberd, 1997; Silverstone et al., 2001). El dominio DELLA es esencial para la degradación inducida por GAs. Consecuentemente, mutantes DELLA carentes de este motivo son estables en presencia de GAs (Peng et al., 1997; Dill et al, 2001).

Las 5 proteínas DELLA descritas en Arabidopsis son GAI, RGA, RGL1, RGL2 y RGL3. GAI (*Gibberellic Acid Insensitive*) y RGA (*Repressor of ga1-3*) fueron las

primeras en ser caracterizadas (Peng et al., 1997; Silverstone et al., 1998). Ambas comparten más del 80% de la secuencia de aminoácidos y tienen funciones parcialmente redundantes.

La redundancia de DELLAs en *Arabidopsis*, así como el solapamiento de funciones, se ha puesto de manifiesto mediante el análisis de combinaciones de mutantes nulos. Por ejemplo, las mutaciones nulas simples de *GAI* y *RGA* son similares fenotípicamente a las plantas silvestres. Ambas mutaciones (*gai-t6* y *rga-24*) tienen un efecto sinérgico, recuperando conjuntamente el fenotipo silvestre en un fondo deficiente en GAs (*ga1-3*) (Figura 1.7) (Dill and Sun, 2001), lo cual indica que son reguladores negativos de la vía. Este resultado apunta a que *GAI* y *RGA* participan en el control del tamaño de la planta, teniendo *RGA* un rol predominante. Sin embargo, no restauran la germinación de semillas ni el desarrollo floral. En estas funciones tienen una mayor relevancia las otras tres DELLAs: *RGL1*, *RGL2* y *RGL3* (Hussain and Peng, 2003; Gallego-Bartolomé et al., 2010).

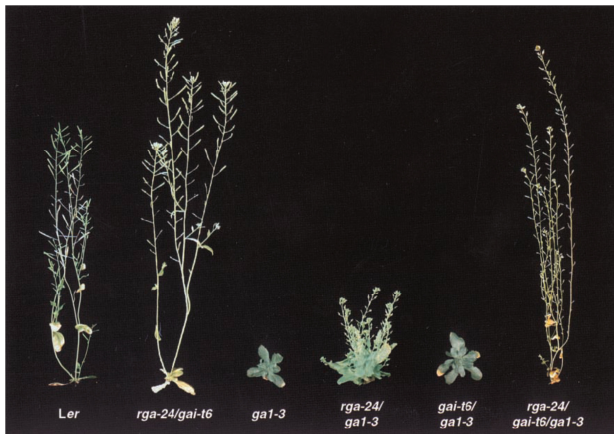


Figura 1.7: Fenotipos de mutantes *ga1-3*, *gai-t6*, *rga-24* y combinaciones. (De Hussain and Peng, 2003).

4. Degradación de las DELLAs inducida por GAs: complejo GA-GID1-DELLA.

Las DELLAs restringen el crecimiento y las respuestas a GAs. Las GAs ejercen su actividad liberando la represión de las DELLAs mediante la formación de un complejo proteico y posterior degradación.

Este complejo requiere la presencia de GID1 (GA Insensitive Dwarf1), un receptor soluble de GAs caracterizado en arroz y que consta de tres parálogos en Arabidopsis (GID1a-c) (Ueguchi-Tanaka et al., 2005). GID1 posee un bolsillo central en el que pueden acomodarse GAs bioactivas. La recepción de una GA causa un cambio alostérico en GID1 consistente en el plegamiento de la parte N-terminal sobre la apertura del bolsillo. Este cambio posibilita la interacción de la zona exterior del plegamiento de GID1 con el dominio DELLA de la proteína DELLA, formando así el complejo GA-GID1-DELLA (Figura 1.8A) (Murase et al., 2008). Dicho complejo induce un cambio conformacional en el dominio GRAS de la proteína DELLA estabilizando el complejo. El complejo estable es reconocido por un complejo E3 ubiquitin-ligasa de tipo SCF compuesto en Arabidopsis por la proteína F-box SLEEPY1 (SLY1), que promueve la poliubiquitinización y subsiguiente degradación de las DELLAs por el proteosoma 26S (Figura 1.8B) (Dill et al., 2004; Ariizumi et al., 2008), activando así las respuestas a GAs.

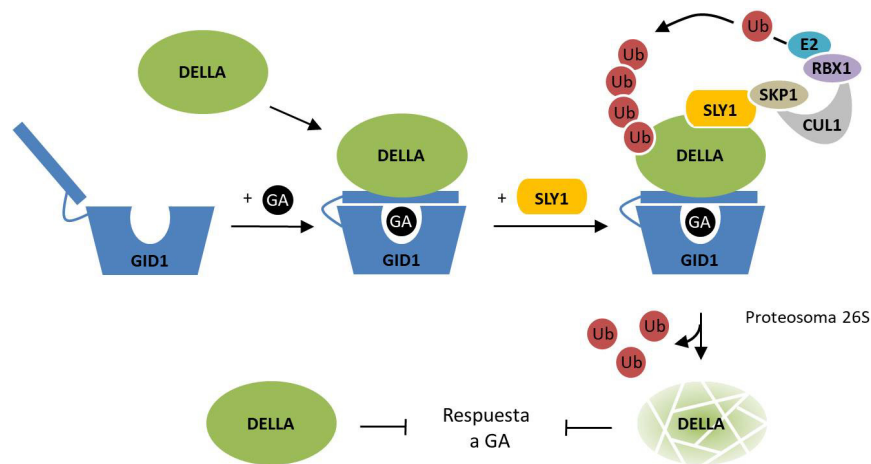


Figura 1.8: Formación del complejo GA-GID1-DELLA (A) y degradación de proteínas DELLA dependiente de GAs (B) (Adaptado de Davière and Achard, 2013).

En los últimos años se han hecho diversos análisis transcriptómicos que muestran cambios en los niveles de expresión en respuesta a GAs en diferentes contextos. De éstos se extraen dos conclusiones: que las GAs regulan diversos conjuntos de genes en diferentes tejidos y etapas de desarrollo, y que casi

todos los cambios en la expresión génica en respuesta a GAs están mediados por las proteínas DELLA (Cao et al., 2006; Gallego-Bartolome et al, 2011).

5. Las DELLAs como hubs.

Las proteínas DELLA no tienen sitio de unión a DNA, pero hay evidencias de que modulan la expresión génica a través de la interacción con otros factores de transcripción formando dímeros a través de los dominios LHR (Marín-de la Rosa, 2014), y lo hacen de dos modos distintos: bien mediante el secuestro de factores (TF) o reguladores (TR) de la transcripción lejos de la cromatina, o bien en el contexto de la cromatina mediante la interacción con factores de transcripción unidos a DNA, pudiendo activar o reprimir la transcripción en ambos casos (Figura 1.9).

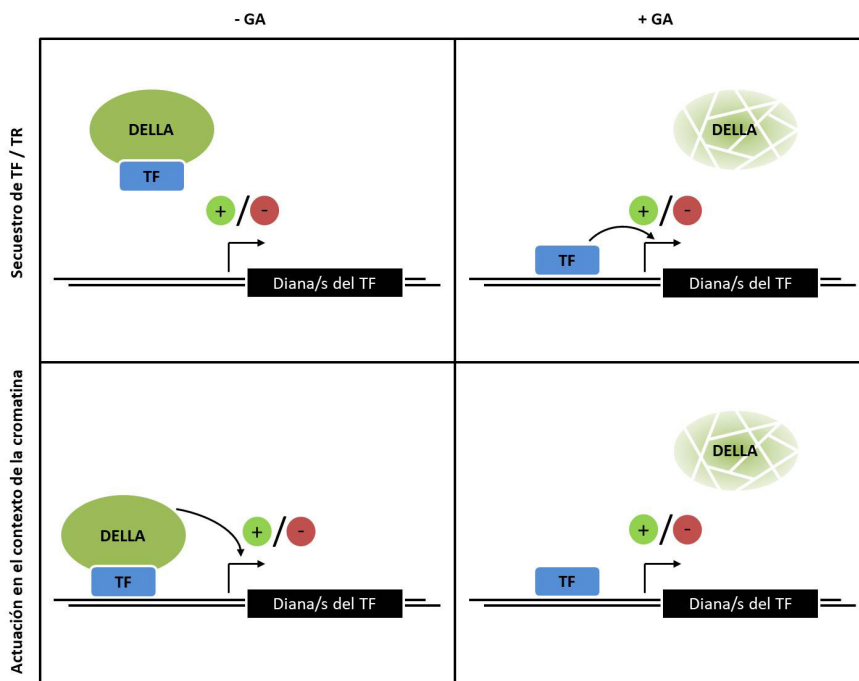


Figura 1.9: Mecanismo de acción de las proteínas DELLA: Secuestro de factores de transcripción (arriba) y actuación en el contexto de la cromatina (abajo). (Adaptado de Davière and Achard, 2013).

La unión de las proteínas DELLA con PIF4 es un ejemplo del primer caso (secuestro de TF). PIF4 (Phytochrome Interacting Factor 4) es un factor de transcripción de unión a DNA de tipo bHLH regulado negativamente por luz y que activa la elongación celular. En ausencia de GAs es secuestrado por las DELLAs, manteniendo bloqueada su respuesta. Por el contrario, en presencia de GAs las proteínas DELLA son degradadas, liberando así a PIF4 que puede unirse a DNA y activando la elongación celular (de Lucas et al., 2008).

La unión de las proteínas DELLA GAI y RGA con ARR1 es un ejemplo de la acción de las DELLAs como transactivadores. ARR1 es un factor de transcripción ARR (Arabidopsis Response Regulator) de tipo B de unión a DNA que regula la respuesta a citoquininas (CK). A bajos niveles de GAs, ARR1 recluta a las DELLAs hacia las regiones promotoras de los genes de respuesta a CK. La DELLA interacciona con ARR1 y actúa como activador transcripcional de éste, aumentando así la respuesta a CK. En cambio, a altos niveles de GAs, las DELLAs son degradadas, por lo que no pueden ser reclutadas por ARR1. De este modo se ve reducida la respuesta a CK (Marín-de la Rosa et al., 2015).

Hasta la fecha se han publicado numerosas interacciones de las proteínas DELLA con diversos factores de transcripción, involucrando a las DELLAs en numerosas rutas de señalización (Daviere and Achard, 2013; Locascio et al, 2013) (Figura 1.10). Se ha descrito la interacción con PIF3 (Feng et al., 2008) y PIF4 (de Lucas et al., 2008), relacionando así la luz y la señalización por GAs. Se ha determinado la relación de la ruta de GAs con las rutas hormonales de BR, citoquininas (CKs) y etileno a través de la interacción de las proteínas DELLA con BZR1 (Gallego-Bartolome et al., 2012), ARR1 (Marín-de la Rosa et al., 2015) y EIN3 (An et al., 2012) respectivamente. También se ha identificado la interacción con varios TCP de tipo I y II, implicando a las DELLAs en procesos de desarrollo vegetativo y germinación (Davière et al., 2014; Resentini et al., 2015). Además, las DELLAs interaccionan con varias subunidades del complejo prefoldina, lo que relaciona las DELLAs con la organización de microtúbulos (Locascio et al., 2013).

Las DELLAs también parecen poder interactuar con otras proteínas diferentes a factores de transcripción, como es el caso de las proteínas JAZ (Jasmonate ZIM-domain), reguladores negativos de la ruta de señalización de jasmonato (Hou et al., 2010).

Todos estos ejemplos descritos sitúan a las proteínas DELLA en un lugar central entre diversas redes de señalización en plantas y apuntan a que ejercen como *hubs* o “conectores” entre ellas. Identificar los posibles interactores de las DELLAs, así como entender el modo de interacción con cada uno de ellos, son avances clave para entender el mecanismo de señalización por GAs.

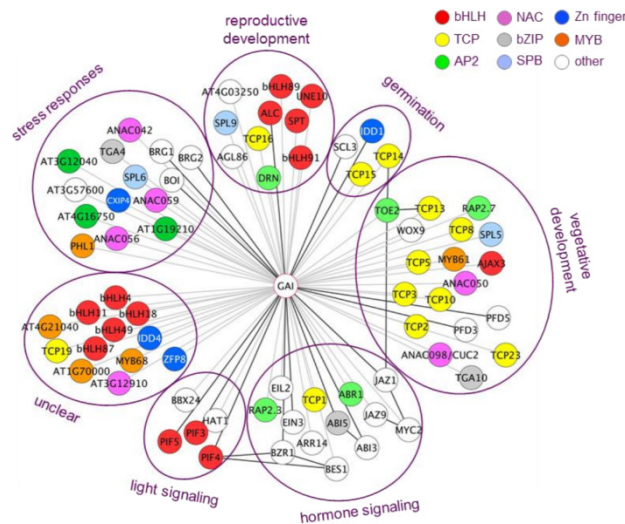


Figura 1.10: Interactores de la proteína DELLA GAI agrupados según el tipo de proceso biológico en el que participan. (De Marín-de la Rosa et al., 2014).

6. Fosfato inorgánico: la forma del fósforo asimilable por las plantas.

El fósforo (P) es componente esencial de importantes moléculas orgánicas tales como ácidos nucleicos, ATP y fosfolípidos de membrana. Está presente en suelos, aunque por lo general en formas no disponibles para la planta, por ejemplo formando complejos con calcio, hierro, aluminio o compuestos orgánicos. La principal forma de fósforo asimilable es el fosfato inorgánico (Pi), que en suelo tiene una movilidad muy reducida y una baja disponibilidad. Éste es el motivo por el que muchos suelos, aun teniendo niveles totales de fósforo que superan con creces las necesidades de la planta, no son aptos para el cultivo por su bajo contenido relativo de fósforo asimilable. El

fosfato inorgánico es el principal factor limitante en la fertilización fosfatada debido a su baja solubilidad y alta capacidad de sorción, y explica que la recuperación efectiva por parte de las plantas no supere el 20% del fosfato total presente en los fertilizantes.

La agricultura moderna depende del fósforo derivado de la roca fosfórica, que es un recurso no renovable y del que no se dispone de una fuente alternativa. Las existencias totales de fosfato mineral podrían cubrir las necesidades agrícolas durante unos pocos cientos de años. Sin embargo, los depósitos de mayor calidad se están esquilmando rápidamente y se estima que se agotarán durante la segunda mitad del S. XXI (Gilbert, 2009). Aunque este pronóstico puede ser discutido, está ampliamente reconocido que la calidad de la roca fosfórica restante disminuye, mientras los costes de producción están aumentando. La explotación de depósitos de menor calidad va asociada a una mayor contaminación por cadmio y otros metales pesados que son altamente tóxicos para las plantas y otros organismos de la cadena trófica. Encontrar modos de recuperar el fósforo y mejorar la eficiencia en el uso del fosfato son pues prioridades para la agricultura del S. XXI.

Junto con el nitrógeno (N) y el potasio (K), el fósforo es uno de los tres principales nutrientes para el desarrollo de las plantas. Las cantidades de fósforo requeridas por los cultivos son relativamente grandes. La concentración de P total oscila entre 0,1 y 0,5%, dependiendo del cultivo.

El fósforo penetra en las plantas a través de la punta de la raíz y los pelos radiculares. También puede entrar a través de las micorrizas. Es absorbido por la planta principalmente como ion ortofosfato primario (H_2PO_4^-) o secundario (HPO_4^{2-}), desplazándose hacia esta segunda forma a medida que se incrementa el pH del suelo. El transporte de fosfato por la planta ocurre como iones ortofosfato o incorporado en compuestos orgánicos.

7. Importancia biológica del fósforo.

El fósforo juega un papel clave en diferentes procesos de gran importancia para el desarrollo vegetal, principalmente en aquellos que implican transferencia de energía. Los fosfatos de alta energía son parte de la estructura

química del adenosín difosfato (ADP) y trifosfato (ATP), fuente de energía de multitud de reacciones. La liberación de los fosfatos de alta energía de estas moléculas (hidrólisis) desencadena una gran cantidad de procesos esenciales para la planta. Uno de los principales usos de dicha energía es para el transporte de nutrientes, la cual posibilita atravesar membranas y contrarrestar las fuerzas osmóticas al tomar nutrientes que en el suelo están a concentraciones más bajas que a las que se encuentran en el interior de las células.

Igualmente importante que el uso de la energía es la producción de la misma, y esto ocurre fundamentalmente en la fotosíntesis, proceso durante el cual la energía lumínica se convierte en energía química y queda capturada en forma de ATP. Es evidente, pues, la importancia del fósforo en la fotosíntesis.

El fósforo es también esencial de los procesos de transferencia genética, puesto que forma parte de las moléculas contienen el código genético así como de los cromosomas.

Por último, como parte de los fosfolípidos, el fósforo es componente estructural de las membranas y participa en procesos de señalización transmembrana.

Los puntos señalados sitúan al fósforo como elemento necesario e insustituible para el desarrollo de las plantas. Más allá de estos roles estrictamente necesarios, un correcto aporte en fósforo ayuda a un rápido desarrollo del sistema radicular, incrementa la eficiencia en el uso del agua, acelera la maduración, punto importante para la cosecha y eficiencia del cultivo, y contribuye a aumentar la resistencia a enfermedades en algunas especies vegetales.

Por el contrario, la deficiencia de fósforo causa un retraso generalizado en el desarrollo de la planta afectando al crecimiento, la floración y la maduración. El resultado son pues plantas más pequeñas, con sistema radicular poco desarrollado y hojas con forma distorsionada y coloraciones purpúreas tanto más intensas cuanto mayor es el estrés por déficit de fosfato. En la mayoría de las plantas estos síntomas comienzan a aparecer cuando la concentración del fósforo en las hojas baja del 0,2%.

En la práctica, la detección de la carencia de fósforo en un cultivo se suele producir de forma tardía, cuando la planta ha alcanzado ya cierto grado de desarrollo vegetativo en el que ya es difícil apreciar ralentizaciones en la tasa de crecimiento. Este es el motivo por el que en el campo el déficit de fósforo muchas veces se evidencia demasiado tarde, por una pérdida en el rendimiento final de la cosecha.

8. Respuestas ante la carencia de fosfato.

Para hacer frente a las limitaciones de fosfato, las plantas han desarrollado respuestas adaptativas complejas que incluyen modificaciones morfológicas y fisiológicas (Péret et al., 2011). La más característica es la modificación del sistema radicular, donde se produce una inhibición del crecimiento de la raíz primaria mientras se incrementa la formación de raíces laterales y pelos radiculares. También hay un aumento de la dominancia apical, de forma que los pocos recursos disponibles se concentren en desarrollar el tallo principal y así priorizar la producción de semilla.

Las plantas también han desarrollado una serie de respuestas bioquímicas y metabólicas orientadas principalmente a mejorar la capacidad captación y movilización del fosfato del suelo, aumentar la eficiencia del uso del fosfato disponible y proteger a la planta del estrés provocado por el ayuno de fosfato. En este sentido, se incrementa la actividad de transportadores de fosfato de alta afinidad, fosfatasa y RNAsas, y hay una secreción de protones y ácidos orgánicos al medio externo. Asimismo, se promueve la utilización de vías glicolíticas o respiratorias alternativas que eluden etapas que requieren Pi o ATP, y se sustituyen los fosfolípidos por lípidos polares, como sulfolípidos y galactolípidos. También se acumulan antocianinas, las cuales actúan como protectores frente a la fotoinhibición.

9. Señalización por ayuno de fosfato.

Para responder a la disponibilidad de fosfato en los suelos, las plantas han desarrollado una amplia gama de respuestas mediadas por una red de

señalización multidimensional de hormonas, azúcares, miRNAs y otros reguladores que actúan en diferentes niveles de regulación (Chiou et al, 2011).

La señalización por ayuno de fosfato sitúa en un papel central a PHR1 (PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1) y PHL1 (PHR1-like1). De hecho, prácticamente todas las respuestas a ayuno de fosfato se ven afectadas en el doble mutante *phr1 phl1* (Figura 1.11). PHR1 y PHL1 son factores de transcripción de tipo MYB que controlan aproximadamente el 70% de los genes de respuesta a ayuno de fosfato, entre ellos los principales. Este control lo ejercen esencialmente a través de la unión al motivo P1BS (GNATATNC) (Rubio et al., 2001; Bustos et al., 2010), muy enriquecido en las regiones promotoras de los genes inducidos por ayuno de fosfato (genes PSI). Los genes reprimidos por ayuno de fosfato, por contra, no presentan enriquecimiento del motivo P1BS en sus regiones promotoras, de lo que se predice que el control de las respuestas de represión transcripcional por parte de PHR1 y PHL1 es indirecto (Bustos et al., 2010).

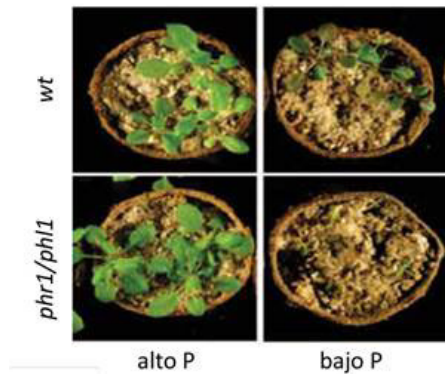


Figura 1.11: Respuesta de plantas de *Arabidopsis silvestres* (wt) y el doble mutante *phr1phl1* a alto y bajo contenido en P. (De Del Pozo y Paz-Ares, 2016).

Otros elementos importantes en la señalización por ayuno de fosfato son las proteínas que contienen dominios SPX y que actúan de manera dependiente de fosfato, por lo que se pueden calificar como sensores de fosfato. SPX1 y SPX2 inhiben a PHR1 a través de la interacción con éste, y esta interacción y la fuerza de la misma es altamente dependiente de los niveles de fosfato (Puga et al., 2014). Por su parte, SPX3 es un regulador negativo de SPX1 (Duan et al., 2008).

PHF1, cuya expresión está regulada por PHR1, controla el tráfico de los transportadores de fosfato de alta afinidad PHT1 desde el retículo endoplásmico hasta la membrana (González et al., 2005). Este tráfico está regulado negativamente por una caseína quinasa (CK2) que fosforila los transportadores en respuesta a fosfato e inhiben su interacción con PHF1 (Chen et al., 2015).

PHR1 también ejerce un control postranscripcional a través de la regulación positiva de los microRNAs mir399 y mir827 (Chiou et al., 2006, Lin et al., 2010) Estos microRNAs regulan la expresión de PHO2 y NLA, enzimas implicadas en la ubiquitinación y degradación de PHO1, proteína relacionada en el transporte de fosfato a través de la vasculatura, y PHT1 respectivamente (Bari et al., 2006; Lin et al., 2010). Por último, IPS1 codifica un RNA no codificante con papel regulador que inhibe la acción del mir399 (Franco-Zorrilla et al., 2007).

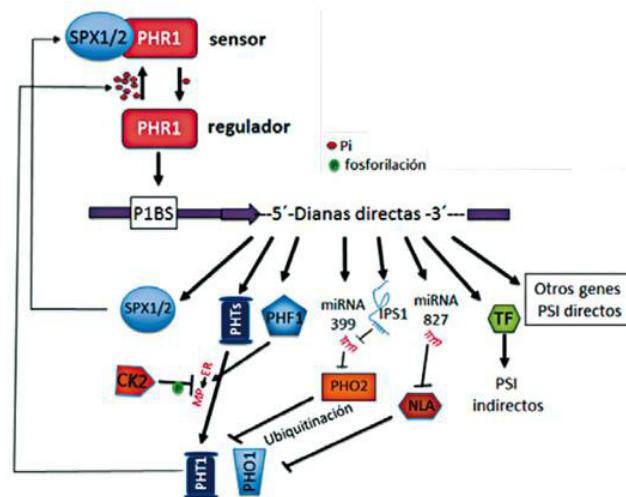


Figura 1.12: Esquema de la ruta de señalización que regula la expresión génica en función de la disponibilidad de fosfato (De Del Pozo y Paz-Ares, 2016).

La señalización por fosfato también está sujeta a regulación hormonal y, a su vez, cambios en la disponibilidad de fosfato pueden alterar la producción y transporte de hormonas. Hay evidencias de que las principales hormonas alteran en mayor o menor medida la respuesta al ayuno de fosfato (Misson et al., 2005; Rubio et al., 2009). Por ejemplo, el ABA actúa como un modulador

positivo de los genes de respuesta a ayuno de fosfato, y las GAs como represor de algunos de estos genes. Las auxinas y el etileno regulan la aparición de raíces secundarias y la elongación de la raíz respectivamente en condiciones de estrés por déficit de fosfato (Lopez-Bucio, et al., 2002; Ma et al., 2003).

El efecto hormonal sobre la regulación de la respuesta al ayuno de fosfato mejor conocido y de mayor impacto es el de las citocininas (CK), a su vez íntimamente relacionado con el efecto de los azúcares sobre esta respuesta. Las CK y los azúcares tienen una interacción bidireccional y antagónica: los mutantes *cre1* y *ahk3* deficientes en los receptores de CK son más sensibles a la sacarosa, y el mutante del sensor de glucosa *hxx1* es más sensible a las CK (Moore et al., 2003). El ayuno de fosfato reduce la expresión de los receptores de CK *CRE1* (Franco-Zorrilla et al., 2002) y, a su vez, las CK reprimen la expresión de los genes PSI (Martín et al., 2000). Se ha propuesto un mecanismo de interacción entre las CK, los azúcares y el ayuno de fosfato, que sitúan a las CK como reguladoras negativas de los genes PSI y a los azúcares como reguladores positivos de los PSI (Figura 1.13) (Franco-Zorrilla et al., 2005; Bustos et al., 2010).

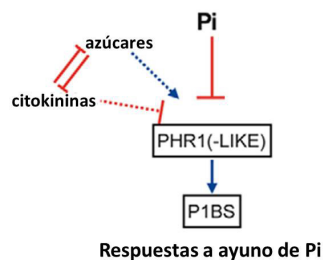


Figura 1.13: Modelo de la señalización por ayuno de fosfato mostrando el papel integrador de PHR1(-LIKE) y la función que sobre él ejercen las CK y azúcares (adaptado de Bustos et al., 2010).



II. OBJETIVOS

La genética química ha demostrado ser una herramienta de gran utilidad para estudiar la función génica y modular rutas de señalización a través de la identificación de moléculas bioactivas y el posterior empleo de éstas para estudiar dianas biológicas.

En este trabajo vamos a explorar el uso de la genética química en dos procesos de interés para el laboratorio, uno como prueba de concepto con una intención académica, y otro como posible forma de encontrar nuevos compuestos para su uso en agricultura:

- 1) Identificar nuevas moléculas que alteren de forma limitada la señalización por giberelinas.
 - a. Análogos o activadores de la señalización por giberelinas en el proceso concreto de la expansión celular.
 - b. Inhibidores específicos de la interacción de las proteínas DELLA con alguno de sus factores de transcripción diana.
- 2) Identificar una molécula que ayude a la asimilación de fosfato por parte de la planta para, posteriormente, introducirla en un formulado que permita reducir la fertilización fosfatada.



III. RESULTADOS

Elección de la quimioteca y plataforma de rastreo

Los abordajes de Genética Química parten en su inmensa mayoría de un escrutinio masivo de moléculas. La elección del tipo de moléculas a rastrear es una importante decisión a tomar que depende de diversos factores, siendo el principal el organismo o sistema que se va a someter al rastreo. Asimismo, la plataforma a emplear, el grado de automatización o el tipo de respuesta que se espera observar también influyen a la hora de determinar el tipo de compuesto a rastrear.

Para cumplir con los objetivos de esta Tesis, los rastreos químicos se debían realizar sobre plántulas de *Arabidopsis* y cultivos de levadura (*S. cerevisiae*). Los ensayos en planta iban a ser tanto fenotípicos como histológicos (tinción GUS), y los compuestos en levadura se evaluarían en base a la capacidad de crecimiento del cultivo. Atendiendo a esto, se escogió la colección DIVERSet™ de ChemBridge, que ya se había empleado anteriormente con éxito en rastreos similares tanto en planta como en levadura (Armstrong et al., 2004; De Rybel et al., 2009; Huang et al., 2004; Surpin et al., 2005; Zhao et al., 2007).

Las moléculas de la colección DIVERSet™ reúnen una serie de condiciones que las hacen idóneas para el tipo de rastreo que se va a realizar. Son moléculas pequeñas con un peso molecular inferior a los 500 Da; su log P es inferior a 5, lo que indica solubilidad y movilidad en fases acuosas y, por lo tanto, disponibilidad para ser absorbidos por las plantas a través de sus raíces; tienen un máximo de 8 radicales de rotación libre, 5 donadores de enlaces por puentes de H y 10 aceptores de enlaces por puentes de H. Estas propiedades sitúan a las moléculas de la colección DIVERSet™ dentro del espacio de interés biológico en el campo de la agroquímica (Tabla 1.1).

Los compuestos de la colección DIVERSet™ presentan siete tipos de farmacóforos, entendiéndose éstos como conjunto de rasgos estructurales en una molécula que es reconocido en un sitio receptor y es responsable para la actividad biológica de esa molécula (Gund, 1977). Estos siete tipos son: donadores de enlaces por puentes de H, aceptores de enlaces por puentes H, centros de carga positiva, centros de anillos aromáticos, centros hidrofóbicos, grupos acídicos y grupos básicos. Cada molécula de la colección tiene una combinación de tres farmacóforos, lo que aumenta el potencial de interacción de las moléculas DIVERSet™ con dianas biológicas.

La elección de la quimioteca condicionó en gran medida la elección de la plataforma y sistema de rastreo. La colección DIVERSet™ se presenta en placas de 96 pocillos con los compuestos disueltos de DMSO (Figura 2.1A). Cada placa contiene 80 compuestos, quedando libres los 16 pocillos la primera y última columna.

Por comodidad y por el hecho de disponer de 16 pocillos en los que poder situar los controles, se decidió mantener esta misma plataforma (placas de 96 pocillos) para hacer los rastreos. Para manejar la colección de compuestos se utilizó el sistema de pipeteo Rainin Liquidator™ 96 (Mettler Toledo) (Figura 2.1B), que permite pipetear simultáneamente 96 muestras entre placas de 96 pocillos manteniendo la posición de cada muestra en la placa, facilitando así la reproducibilidad y la trazabilidad de las moléculas, además del manejo de la quimioteca.

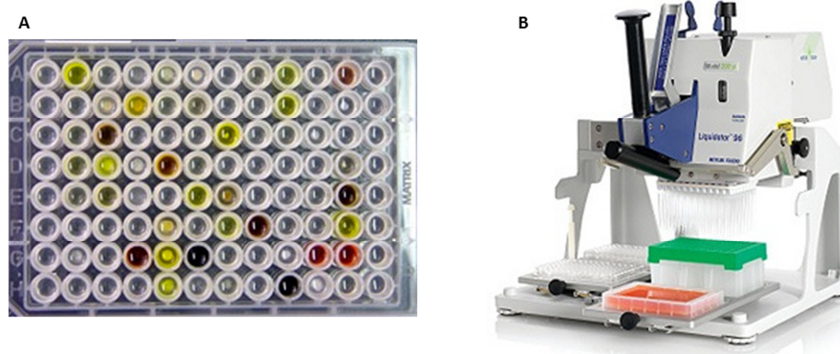


Figura 2.1: (A): Muestra de placa en la que se proveen los compuestos de la colección DIVERSet™. (B) Sistema de pipeteo simultáneo Rainin Liquidator™ 96.

1. Identificación de análogos o activadores de la señalización por GAs.

1.1. Puesta a punto del rastreo.

Las GAs promueven la división y elongación celular, de modo que son promotores del crecimiento. El PAC inhibe la síntesis de GAs, y su efecto fenotípico más visible en plántulas es una reducción en la longitud del hipocotilo. La aplicación de GAs exógenas revierte este fenotipo (Figura 2.2). Con el fin de identificar agonistas de GAs o activadores de la señalización por GAs se diseñó un rastreo que enfrentara plántulas de *Arabidopsis* ecotipo Landsberg *erecta* (*Ler*) cultivadas en presencia del inhibidor de la síntesis de GAs paclobutrazol (PAC) a 10.000 moléculas de la colección DIVERSet™.

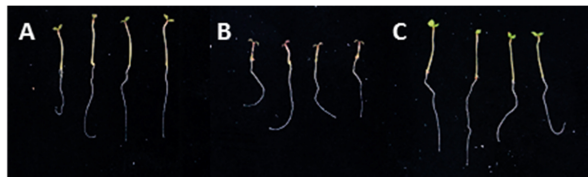


Figura 2.2: Plántulas de *Arabidopsis* de 7 días (A), cultivadas en presencia de 1 μM PAC (B) y 1 μM + 10 μM GA_3 (C).

Dado que en la oscuridad el contenido de GAs es más alto y se maximizan las diferencias en tratamientos con PAC, se planeó realizar el rastreo en ausencia de luz. Sin embargo, la presencia de 1% DMSO como solvente interfirió con la germinación de las semillas en la oscuridad. Esto encaja con observaciones anteriores en las que se puso de manifiesto que el DMSO afecta al crecimiento de las plantas a concentraciones superiores al 0,8% (Schmitz and Skoog, 1970) e incluso puede causar toxicidad celular a concentraciones superiores al 3%.

Hubo pues que ajustar las concentraciones de PAC y DMSO y permitir la germinación en la luz antes de transferir las plántulas a la oscuridad. El protocolo con el que se alcanzó una germinación elevada (> 90%) y crecimiento homogéneo consistió en provocar el establecimiento de las plántulas en luz continua durante los primeros cuatro días de vida, y posteriormente mantenerlas en la oscuridad durante cuatro días más. El medio de cultivo contenía PAC a 0,4 μM y DMSO al 0,2%.

La concentración de los compuestos a rastrear fue fijada en 20 μM . Se buscaban moléculas que actuaran como una hormona y éstas lo hacen a concentraciones bajas, del orden de μM . La GA_3 revierte el fenotipo inducido por PAC en las condiciones descritas a una concentración de 10 μM , y la GA_4 lo hace a 1 μM . Si el compuesto actúa como una GA debería actuar a una concentración 20 μM .

Desde el punto de vista práctico, la desecación del medio supuso inicialmente un problema, dado el pequeño volumen de medio de cultivo empleado (100 de los 300 μl que caben en cada pocillo). En las condiciones del rastreo, se perdía entre el 50-100% del medio al cabo de 8 días, dependiendo de la distancia del pocillo a los bordes de la placa (mayor desecación a mayor proximidad a los bordes). El sellado de las placas solucionó el problema de la desecación pero también provocó hipoxia que afectaba al crecimiento. La solución fue realizar el rastreo en condiciones de humedad relativa (HR) controlada, fijándose ésta en un 75%.

Las condiciones del rastreo quedaron pues fijadas en 20 μM de compuesto, 0,4 μM PAC, 0,2% DMSO, y 4 días de luz seguidos de 4 de oscuridad y 75% HR. En estas condiciones la altura de las plántulas cultivadas en presencia de PAC + GAs supera a las que no han recibido tratamiento ('mock') (Figura 2.3).

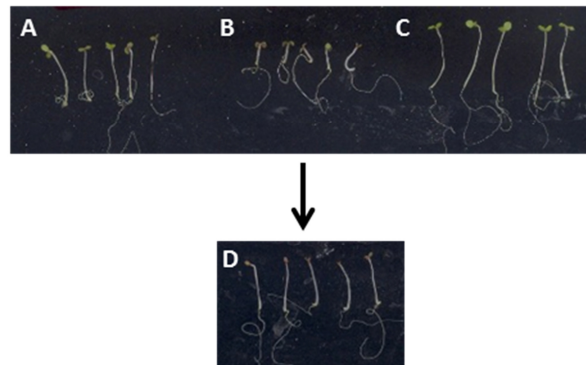


Figura 2.3: Plántulas de *Arabidopsis* de 8 días cultivadas en las condiciones del rastreo. (A) 'mock'; (B) 0,4 μM PAC; (C) 0,4 μM PAC + 10 μM GA_3 . (D) Ejemplo de fenotipo buscado en el rastreo al tratar con 0,4 μM PAC + 20 μM compuesto (fenotipo causado por compuesto #93 durante el rastreo).

1.2. Rastreo 10.000 moléculas de la colección DIVERSet™.

Las 10.000 moléculas de la colección DIVERSet™ fueron rastreadas en las condiciones detalladas. Para evaluar su efecto, se estableció previamente una clasificación de 4 grupos en función de la altura que alcanzaran las plántulas (Figura 2.4). En el grupo IV se recogieron los compuestos que no afectaron a la altura de las plántulas, es decir que era similar al control con PAC. El grupo III englobó los compuestos que causaron un leve incremento de la longitud de hipocotilo o una respuesta heterogénea entre las diferentes plántulas del pocillo. En el grupo II se anotaron los compuestos en cuya presencia las plántulas alcanzaron alturas similares a las plantas sin tratamiento (*'mock'*). Finalmente, el grupo I recogió los compuestos más activos, en los que las plántulas alcanzaron la altura del control tratado con PAC + GAs. Se anotaron 16 compuestos en el grupo I y 240 en el grupo II. Estos 256 compuestos se recomprobaron en la misma plataforma y condiciones del rastreo y se seleccionaron los 60 mejores, lo cuales se recomprobaron nuevamente de forma simultánea por cuadruplicado. Se descartaron 21 por falta de homogeneidad en la respuesta. De los 39 restantes, se seleccionaron los 8 compuestos en cuya presencia al menos el 75% de las plántulas alcanzó la altura del control sin tratamiento (*'mock'*) (Figura 2.5) para posteriores análisis.

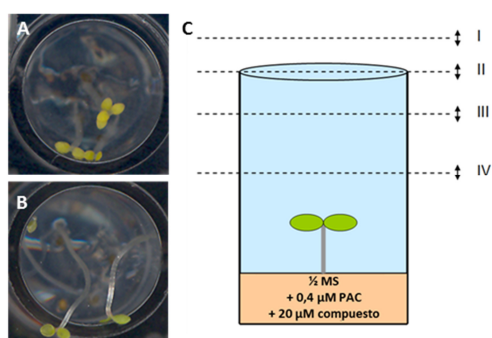


Figura 2.4: Plántulas de *Arabidopsis* ecotipo *Ler* cultivadas en las condiciones descritas para el rastreo durante 8 días con 0,4 µM PAC (A) y 0,4 µM PAC + 10 µM GA₃ (B). Representación de los cuatro grupos en los que se clasificaron los compuesto en función de la altura alcanzada por la planta (C).

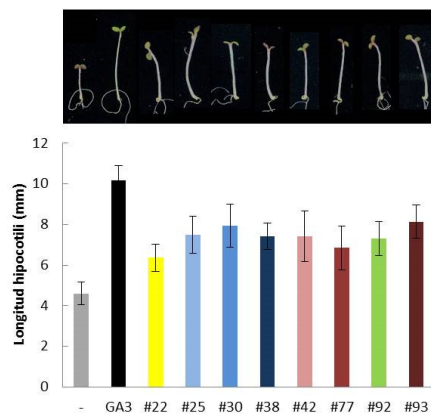


Figura 2.5: Longitud del hipocotilo de plántulas de *Ler* de 8 días cultivadas en las condiciones del rastreo con 0,4 μ M PAC y tratadas con los 8 compuestos seleccionados de rastreo.

1.3. Estudio de homología estructural de las moléculas seleccionadas.

La estructura de las 8 moléculas seleccionadas se analizó *in silico* estudiando la homología entre ellas con el fin de detectar estructuras moleculares compartidas que pudiesen ser las responsables del fenotipo detectado. Como se observa en la figura 2.6, tres de las moléculas poseían una similitud significativa y compartían un grupo de homología.

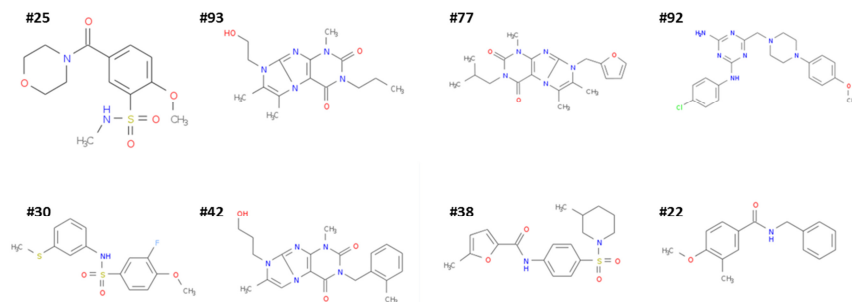
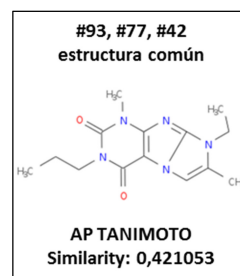


Figura 2.6: Arriba: Estructura de las 8 moléculas seleccionadas tras el rastreo. Derecha: Estructura compartida entre las moléculas #93, #77 y #42 y similitud expresada mediante el coeficiente de Tanimoto (T) (Rogers and Tanimoto, 1960). Similitud significativa si coeficiente de $T \geq 0,4$ (ChemMine Clustering Tools; <http://chemmine.ucr.edu/>).



1.4. Efecto de los compuestos en mutantes de la ruta de GAs.

Se hicieron pruebas de dosis de los 8 compuestos en *Ler* silvestres con medio suplementado con PAC variando las condiciones del rastreo (resultados no mostrados). Se probaron condiciones de día corto, día largo, luz continua y oscuridad. Sin embargo fue en las condiciones del rastreo (4 días de luz + 4 de oscuridad) (Figura 2.7) en las que los compuestos respondieron mejor, por lo que se mantuvieron dichas condiciones en los futuros experimentos con mutantes.

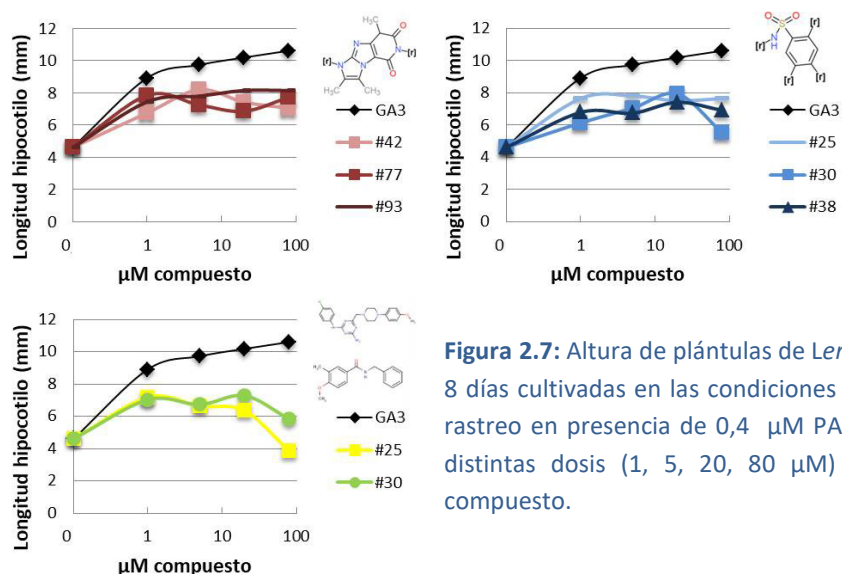


Figura 2.7: Altura de plántulas de *Ler* de 8 días cultivadas en las condiciones del rastreo en presencia de 0,4 μM PAC a distintas dosis (1, 5, 20, 80 μM) de compuesto.

Para tener alguna idea del punto de la ruta de señalización de GAs en el que podrían actuar los compuestos, se examinó su comportamiento en mutantes que generan proteínas DELLA estabilizadas (*rga-Δ17* y *gai-1*), al haber perdido la capacidad de interactuar con el receptor. Los compuestos que aún hicieran crecer el hipocotilo en estos fondos genéticos estarían actuando por debajo de las DELLAs o en paralelo a ellas. También se examinó el efecto en mutantes deficientes en los receptores de GAs. El mutante *gid1a,c* está severamente afectado en la respuesta a las GAs, por lo que los compuestos que no tuvieran efecto en estos mutantes serían probablemente agonistas de GAs y requerirían la presencia de receptores activos para funcionar. Como control se analizó el efecto sobre el mutante *ga1*, el cual tiene bloqueada la ruta de biosíntesis de GAs.



Figura 2.8: Crecimiento de plántulas de 8 días de Ler y los mutantes de la ruta de GAs *rga-Δ17* y *gai-1* (arriba), y *gid1a,c* y *gai-1* (abajo), en presencia de diferentes concentraciones (0.25, 1, 5, 20, 80 μM) de los 8 compuestos seleccionados y GA₃. Abscisas: concentración de compuesto (μM). Ordenadas: altura de hipocotilo (mm).

Tabla 2.1: Representación del efecto causado por los 8 compuestos la elongación del hipocotilo de plántulas de *Arabidopsis Ler* y mutantes de la ruta de GAs. Flechas verdes: incremento; flechas rojas: decremento; flechas en vertical: efecto robusto; flechas en diagonal: efecto leve.

	#22	#25	#30	#38	#42	#77	#92	#93
Ler	↓							
<i>rgaΔ17</i>		↑				↑	↑	↓
<i>gai1</i>		↑			↑	↑		
<i>gid1a,c</i>		↑	↗				↗	↗
<i>ga1</i>		↑		↗	↑			↗

Sorprende que el compuesto #22 redujera la altura de *Ler* y no se observara efecto en ningún mutante. Por el contrario, el compuesto #25 incrementó la altura en todos los mutantes analizados y no afectó a *Ler*. El compuesto #77 únicamente afectó a los mutantes DELLA dominantes. El #93 en cambio causó una reducción de altura de *rga-Δ17*, pero aumentó la de los mutantes insensibles y deficientes en GAs.

1.5. Efecto de los compuestos en la degradación de las proteínas DELLA.

Con el fin de entender mejor los datos fenotípicos arrojados en el apartado anterior y así poder averiguar en qué punto de la ruta de GAs podría estar interfiriendo cada compuesto, analizamos cómo afecta el tratamiento con cada uno de los 8 compuestos a los niveles de la proteína DELLA RGA en la línea transgénica RGA:GFP-RGA. Como se observa en la [figura 2.9](#), GA₃ provocó la degradación de RGA, pero no se observó degradación de RGA al tratar con ninguno de los 8 compuestos, a menos a niveles equiparables con los de GA₃. Por lo tanto los compuestos seleccionados no actúan de manera similar a las GAs en este aspecto.

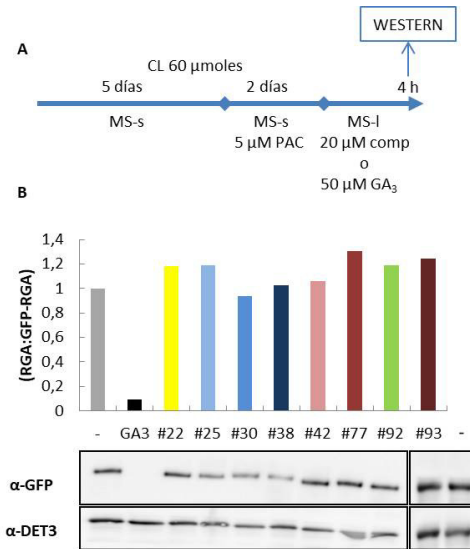


Figura 2.9: (A) Esquema del experimento para analizar los niveles de RGA ante los distintos tratamientos. (B) Niveles de proteína RGA de plántulas de *Arabidopsis* tratadas con los 8 compuestos. Datos relativos referenciados al 'mock'. Revelado del western blot con los anticuerpos α -GFP y α -DET3.

Ninguno de los compuestos pareció provocar la degradación de las proteínas DELLA endógenas. Para confirmarlo, decidimos emplear un sistema alternativo desarrollado por el laboratorio del Dr. Matías Zurbriggen (BIOS Freiburg), en el que la permeabilidad y sensibilidad a los tratamientos hormonales ya ha sido probada con éxito (Schmunk, 2014). Este sensor de GAs es una adaptación realizada a partir del sensor de auxinas de Wend et al. (2013), el cual permite monitorizar la degradación del sensor dependiendo de la hormona. Se basa en el uso de dos luciferasas: la luciferasa renilla, de *Renilla reniformis*, y la luciferasa *firefly*, de *Photinus pyralis*. Consiste en la fusión de un módulo sensor (SM) cuya degradación es dependiente de los niveles de hormona –en este caso una proteína DELLA, dependiente de las GAs–, a la luciferasa *firefly*. La señal lumínica de *firefly* dependerá pues de los niveles de DELLA, y la normalización en función de la luminiscencia *renilla* permite la cuantificación precisa de los efectos, ya que la luciferasa *renilla* y la fusión SM-*firefly* están unidas por el péptido 2A para asegurar coexpresión estequiométrica (de Felipe et al., 2006) (Figura 2.10A).

Las fluctuaciones de la señal lumínica de firefly/renilla (F/R) de los 8 compuestos en los protoplastos transformados con el sensor de RGA y con el plásmido control fueron muy similares (Figura 2.10B y C). En cambio, la adición de GA₄ sí que causó una reducción de RGA en los protoplastos con el sensor de RGA, pero no en los protoplastos con el plásmido control, lo que indica que el sistema funcionaba correctamente.

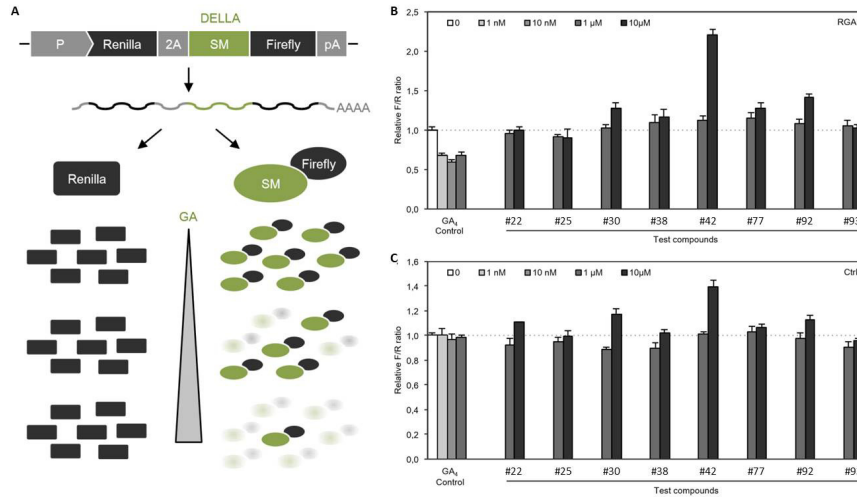


Figura 2.10: (A): Funcionamiento del sensor de GAs: Coexpresión estequiométrica de dos luciferasas (*renilla* y *firefly*) unidas por el péptido 2A. La fusión N-terminal del SM a la secuencia de firefly supone que la degradación de esta luciferasa está inducida por GAs de manera dependiente a la concentración. (B) Ratios relativos F/R de protoplastos transformados con el sensor de RGA. (C) Ratios relativos F/R de protoplastos transformados con plásmido control. (Adaptado de Schmunk, 2014).

Estos resultados indican que los compuestos no provocan la degradación de RGA dependiente de GAs, lo que indicaría que están actuando aguas abajo de las DELLAs o que interfieren en alguna ruta alternativa que también influya en la regulación de la elongación del hipocotilo (Claeys et al., 2014).

2. Identificación de inhibidores selectivos de la interacción de las proteínas DELLA.

2.1. Puesta a punto del rastreo.

Se diseñó un rastreo químico con el objetivo de identificar moléculas que interrumpiesen diferencialmente la interacción de las proteínas DELLA con varias de sus dianas. Se escogieron tres dianas cuya interacción con las proteínas DELLA había sido bien caracterizada y que pertenecían a rutas de señalización distintas: PIF4 (de Lucas et al., 2008), BZR1 (Gallego-Bartolome et al., 2012) y ARR1 (Marín-de la Rosa et al., 2015). Adicionalmente, se utilizó también KANADI1 (KAN1), un represor transcripcional implicado en mecanismos de polaridad de órganos e identidad abaxial (Kerstetter et al., 2001), y en la biosíntesis, transporte y respuesta a auxinas (Huang et al., 2014), cuya interacción con las DELLAs se había identificado previamente en nuestro laboratorio (datos no publicados).

Se planeó realizar el rastreo en levadura utilizando el sistema de doble híbrido (Y2H). Este sistema consiste en la unión de cada una de las proteínas de estudio al dominio de unión (BD) y al dominio de activación (AD) de un factor de transcripción que regula la expresión de un gen reportero. El BD reconoce la secuencia promotora de dicho gen y el AD activa la transcripción del mismo, de modo que la expresión del gen reportero únicamente tendrá lugar cuando las dos proteínas interactúen. La proteína fusionada al BD se conoce como cebo (*bait*), y la fusionada al AD como presa (*prey*) (Vidal and Legrain, 1999).

Como método de selección de las interacciones, se eligió el de la inducción de *HIS3*, que codifica una enzima implicada en la biosíntesis de histidina (H). Este método presenta la ventaja de que su nivel de actividad puede ser titulado por el ácido 3-amino-1,2,4-triazol (3AT) de forma dependiente de dosis. De esta manera, se puede establecer de manera aproximada la fuerza de la interacción dependiendo del umbral de resistencia a 3AT en medio carente de histidina.

Tanto las proteínas DELLA GAI como RGA interactúan con las cuatro dianas seleccionadas. Se escogió GAI para usarla como cebo en su versión M5GAI, carente del dominio DELLA, puesto que la versión completa provoca la activación del gen reportero (de Lucas et al., 2008). Se sabe que las proteínas

Resultados

DELLA interactúan a través de sus motivos LHR (Itoh et al., 2002). Adicionalmente, se hicieron deleciones preservando uno o ambos motivos LHR (Figura 2.11A) para determinar si la presencia de uno o los dos motivos LHR era por sí solos suficiente para interactuar con alguna de las dianas, pero no se observó interacción con ninguna (Figura 2.11B).

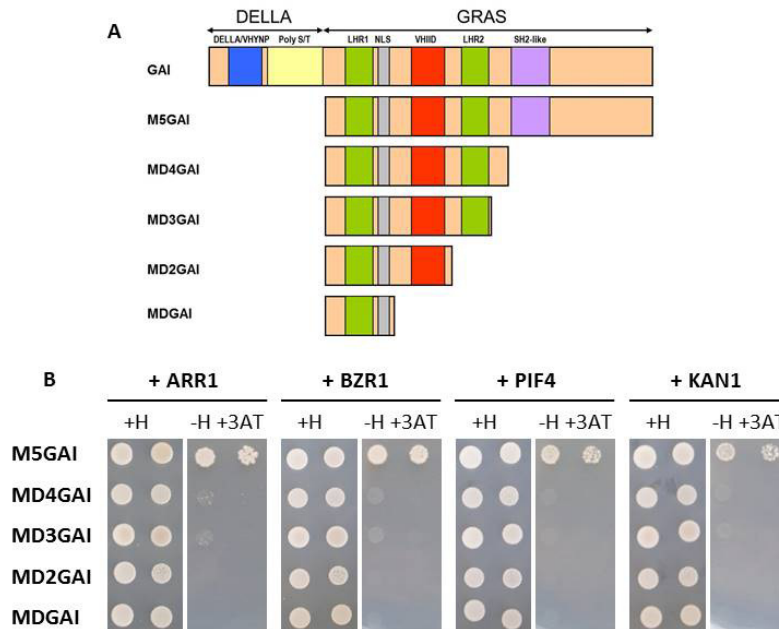


Figura 2.11: (A) Mapa de la proteína GAI y deleciones. (B) Ensayo mediante Y2H de la interacción de las deleciones de GAI con ARR1, BZR1, PIF4 y KAN1.

Con el fin de estandarizar los sucesivos ensayos y principalmente el rastreo, se resolvió trabajar con cultivos de levadura a una $OD_{600} = 1$, una vez finalizada la fase exponencial ($OD_{600} = 0,6-0,8$), provenientes de cultivos saturados establecidos en día anterior y refrescados a una $OD_{600} = 0,4$. También se decidió fijar el 3 μ l el volumen a emplear en los goteos. Con ello se perseguía que el número de células de levadura empleado en cada ensayo fuese aproximadamente el mismo.

El rastreo se iba a llevar a cabo en condiciones límite para el crecimiento del cultivo de levadura en función de la fuerza de la interacción M5GAI-diana y, por consiguiente, del umbral de resistencia a 3AT. Hubo pues que determinar

cuál era la concentración máxima de 3AT admitida por las levaduras transformadas con cada pareja de interactores. Esta concentración establecería el umbral de tolerancia a 3AT en el cual cualquier grado de inhibición por parte de un hipotético compuesto en la interacción GAI-diana supondría la muerte del cultivo de levadura, lo que permitiría su detección. Así pues este umbral fijaría la concentración de 3AT a emplear en el rastreo de cada pareja de interactores GAI-diana.

Se tituló la fuerza de las interacciones entre M5GAI y cada una de las cuatro dianas mediante ensayos de inducción de *HIS3* a diferentes concentraciones de 3AT (Figura 2.12). Las dianas por orden decreciente de fuerza de interacción con M5GAI resultaron ser ARR1, BZR1, PIF4 y KAN1, y la concentración de 3AT establecida para el rastreo en cada una de ellas fue de 50, 35, 30 y 10 mM 3AT respectivamente.

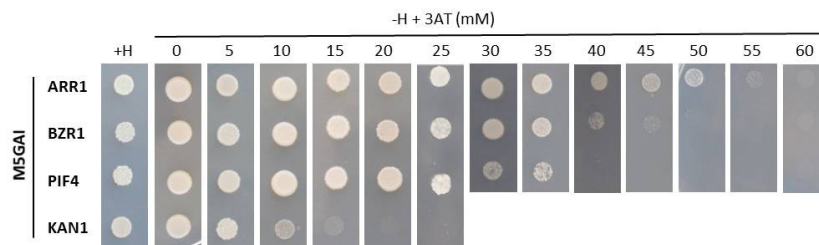


Figura 2.12: Determinación de la dosis mínima de 3AT para la inhibición de la interacción de M5GAI con sus dianas ARR1, BZR1, PIF4 y KAN1. Los umbrales de 3AT se establecieron en 50, 35, 30 y 10 mM 3AT respectivamente, concentraciones máximas a las que se obtuvo una gota completa de cultivo de levadura tras incubación a 28 °C durante 48 h.

Los cultivos crecen principalmente durante las primeras 48 h tras el goteo a 28 °C y oscuridad. Entre las 48 y 96 h no se perciben diferencias significativas en cuanto a expansión de la colonia o nuevo crecimiento en zonas despobladas. Sí que se puede llegar a percibir más densidad en las colonias que se han instaurado previamente. Así pues, las anotaciones del rastreo pueden recogerse a las 48 h del goteo.

En definitiva, las condiciones del rastreo se fijaron en: (i) uso cultivos de levadura a $OD_{600} = 1$; (ii) volumen de gota de 3 μ l; (iii) incubación durante 48 h a 28°C; (iv) concentraciones de 3AT 50, 35, 30 y 10 mM para los cultivos

cotransformados con ARR1, BZR1, PIF4 y KAN1 respectivamente; y (v) concentración de los compuestos de la colección DIVERSet™ a 20 μ M, como en el rastreo con plántulas.

2.2. Rastreo de 10.000 moléculas de la colección DIVERSet™.

Fijadas las condiciones, se procedió al escrutinio de 10.000 moléculas DIVERSet™ en cuatro rastreos en paralelo, uno para cada pareja M5GAI-diana, con la concentración establecida de 3AT para cada caso. Se llevaron como controles cultivos de levadura cotransformados con M5GAI y el vector del AD vacío, y con M5GAI-diana sin tratar con compuestos.

Escrutado en 36,8% de la colección (3680 compuestos) se habían anotado 96 moléculas que interrumpían la interacción de M5GAI con una, dos, tres o las cuatro dianas en distintas combinaciones, por lo que se decidió detener el escrutinio y revisar los compuestos anotados. Tras una primera recomprobación se confirmaron 24 moléculas que interrumpían la interacción de M5GAI con una diana, 7 moléculas que lo hacían con dos, 9 que lo hacían con tres, y 22 moléculas que inhibían la interacción con las cuatro dianas.

Por un lado se recomprobó las 40 moléculas que afectaban a una, dos o tres de las interacciones, por cuadruplicado y en dos experimentos paralelos (Figura 2.13). Por otro lado se recomprobó los 22 compuestos que interrumpían la interacción con las cuatro dianas, aplicando adicionalmente los compuestos a cultivos de levadura sin transformar para descartar que afectasen al crecimiento de las levaduras de forma genérica. De estos 22 compuestos, 7 no afectaron al crecimiento de las levaduras y confirmaron que interrumpían la interacción de M5GAI con las cuatro dianas, y dos de ellos provocaron una reducción del crecimiento, no una ausencia total, por lo que presumiblemente la inhibición causada en la interacción entre proteínas es más leve.

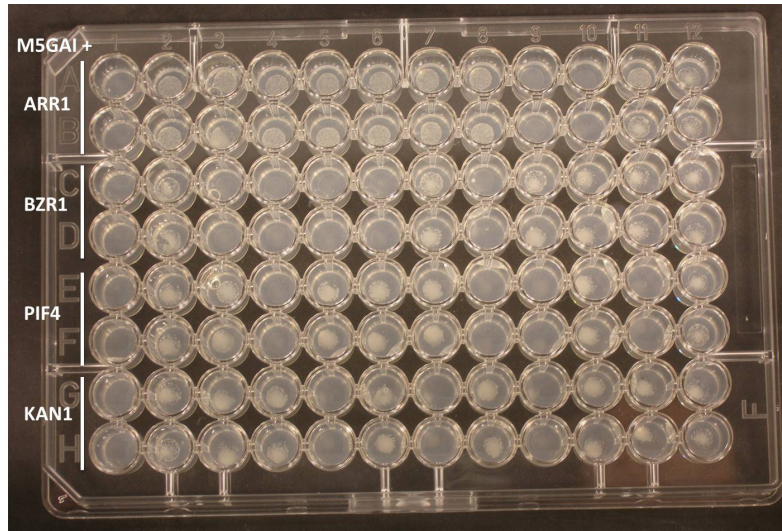


Figura 2.13: Crecimiento de cultivos de levadura de 48 h transformados con BD-M5GAI + AD-diana en presencia de 10 compuestos (columnas 2 a 11). Columna 1: levadura transformada con BD-M5GAI + vector vacío AD. Columna 12: sin tratamiento.

El principal interés radicaba en aquellos compuestos que fuesen capaces de interrumpir la interacción de la proteína DELLA con una sola diana, es decir que tuviesen un comportamiento más selectivo. Tras recomprobar por cuadruplicado los 24 que afectaban a una única diana se confirmaron 9 compuestos, los cuales se emplearían para futuros análisis. También se escogieron dos compuestos que afectaban a las cuatro dianas, uno de manera robusta y otro, presumiblemente, de forma más débil, ya que permitía un crecimiento débil de los cultivos de levadura. Por último, adicionalmente se escogió una última molécula que afectaba a la interacción con tres de las dianas. En total, 12 compuestos fueron seleccionados para posteriores ensayos de cinética de crecimiento (Figura 2.14).

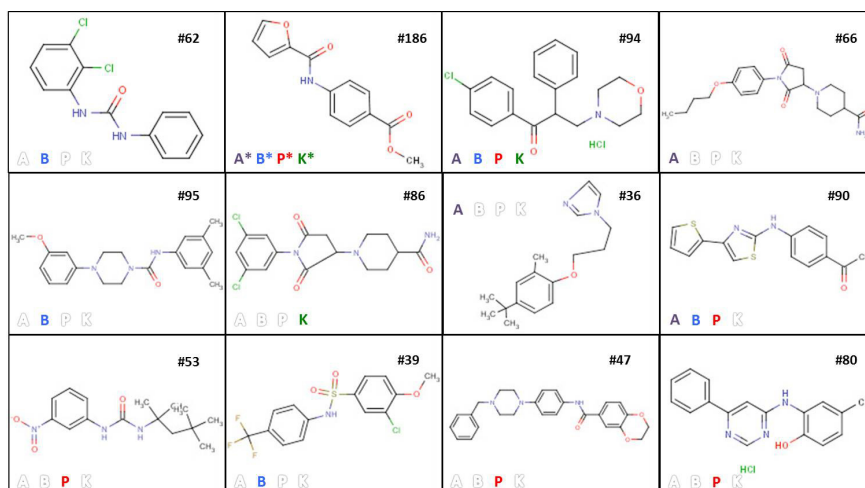


Figura 2.14: 12 compuestos seleccionados del rastreo. Estructura molecular y diana/s de la/s que inhiben la interacción con M5GAI. A: ARR1, B: BZR1, P: PIF4, K: KAN1. *Reducción del crecimiento (inhibidor hipotéticamente más débil).

2.3. Cinética de crecimiento de cultivos de levadura en respuesta al tratamiento con los 12 compuestos seleccionados.

Se estudió la cinética de crecimiento de cultivos de levadura transformados con cada combinación de M5GAI-diana en respuesta a diferentes dosis de los 12 compuestos seleccionados durante 48 h. Los tratamientos se hicieron en medio restrictivo (sin histidina + 3AT) al igual que el rastreo, pero también en medio con histidina para comprobar un posible efecto de los compuestos en cultivos de levadura en un medio no restrictivo.

Las concentraciones de 3AT empleadas en el rastreo para los cultivos cotransformados con M5GAI y ARR1, PIF4 y KAN1 fueron demasiado restrictivas para este experimento, impidiendo que los cultivos, iniciados a $OD_{600} = 0,1$, superasen la fase exponencial de crecimiento antes de 48 h. Hubo que reducir la concentración de 3AT a 40, 8-15 y 3-7 mM en los casos de cultivos con ARR1, PIF4 y KAN1 respectivamente para obtener en todos ellos una curva de crecimiento sigmoidea completa (fase inicial + fase exponencial + fase de saturación) dentro de las 48 h de duración del experimento. En el caso de BZR1

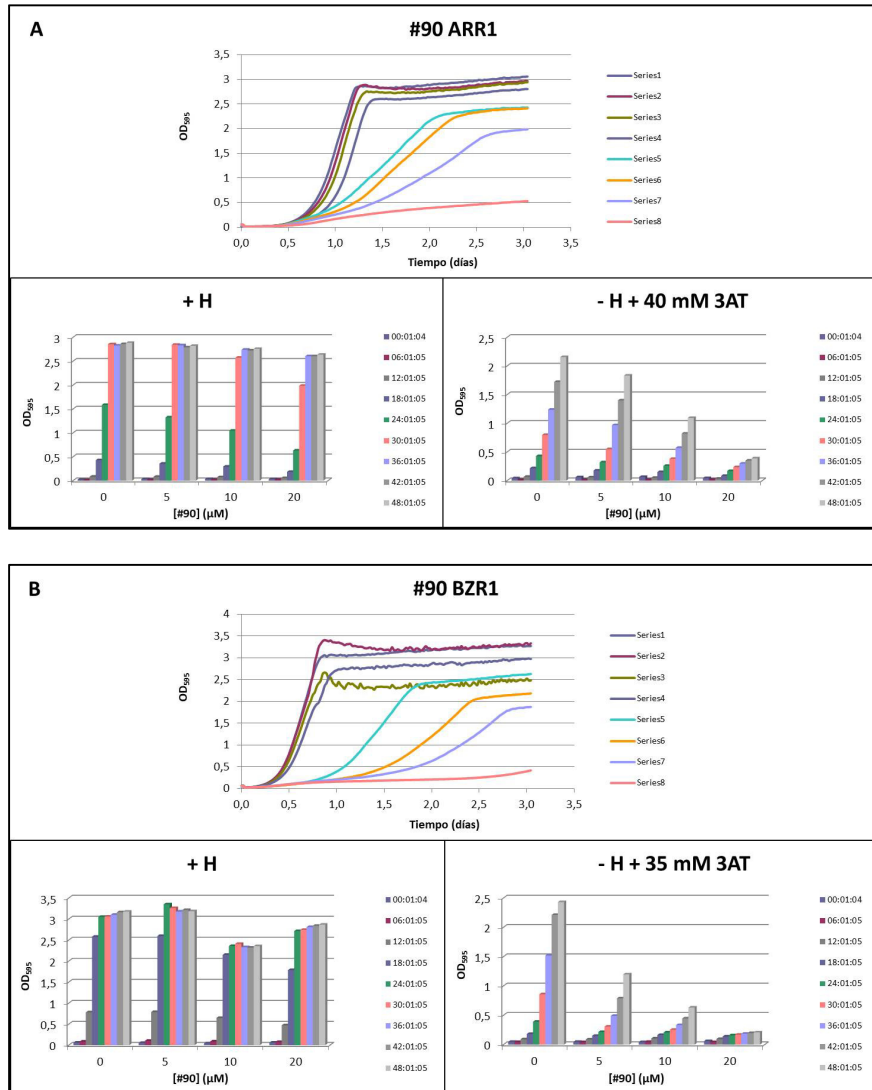
sí se consiguió una curva de crecimiento completa a la concentración de 3AT del rastreo (35 mM).

Con dos de los compuestos se observó reducción de la velocidad de crecimiento en condiciones no restrictivas (+H). Con cuatro no se observó ralentización en condición alguna. Únicamente 6 de los 12 compuestos presentaron reducciones en la velocidad de crecimiento de cultivos de levadura en condiciones restrictivas (-H +3AT) sin afectar al crecimiento en condiciones no restrictivas (+H). Es decir, solo el descenso en la tasa de crecimiento causada por la aplicación de estos 6 compuestos podría ser imputable a una inhibición de la interacción M5GAI-diana.

Estos 6 compuestos presentan reducción en la tasa de crecimiento de cultivos de levadura transformados con M5GAI-diana, pero sus comportamientos no concuerdan con los datos obtenidos en el rastreo y posteriores recomprobaciones. Es decir, ante la aplicación de un compuesto, los cultivos de levadura cuyo crecimiento se ve ralentizado no corresponden con los positivos detectados durante el rastreo. O lo que es lo mismo, que según los resultados del ensayo de cinética de crecimiento, los compuestos afectan a la interacción entre M5GAI y dianas diferentes a las detectadas durante el rastreo. Por ejemplo, el compuesto #62 dio positivo en el rastreo y subsiguientes recomprobaciones como inhibidor únicamente de la interacción M5GAI-BZR1. En cambio, según el experimento de cinética de crecimiento, además de la interacción con BZR1, también inhibe la interacción con ARR1 y KAN1.

La [figura 2.15](#) recoge la reducción de velocidad de crecimiento más significativa para cada diana. Es decir, los casos en los que, previsiblemente, la inhibición de la interacción de M5GAI con cada diana es mayor. Así pues el compuesto #90 sería el que más afecta a la interacción de M5GAI y ARR1 y BZR1, el #95 sería el que más afecta a la interacción con PIF4, y el #62 a la interacción con KAN1. Los datos de cinética y los gráficos relativos a los seis compuestos están disponibles como material suplementario en http://plasticity.ibmcp.csic.es/Home.html/Downloads_files/Grau_PhD_Thesis_Suppl.zip.

Resultados



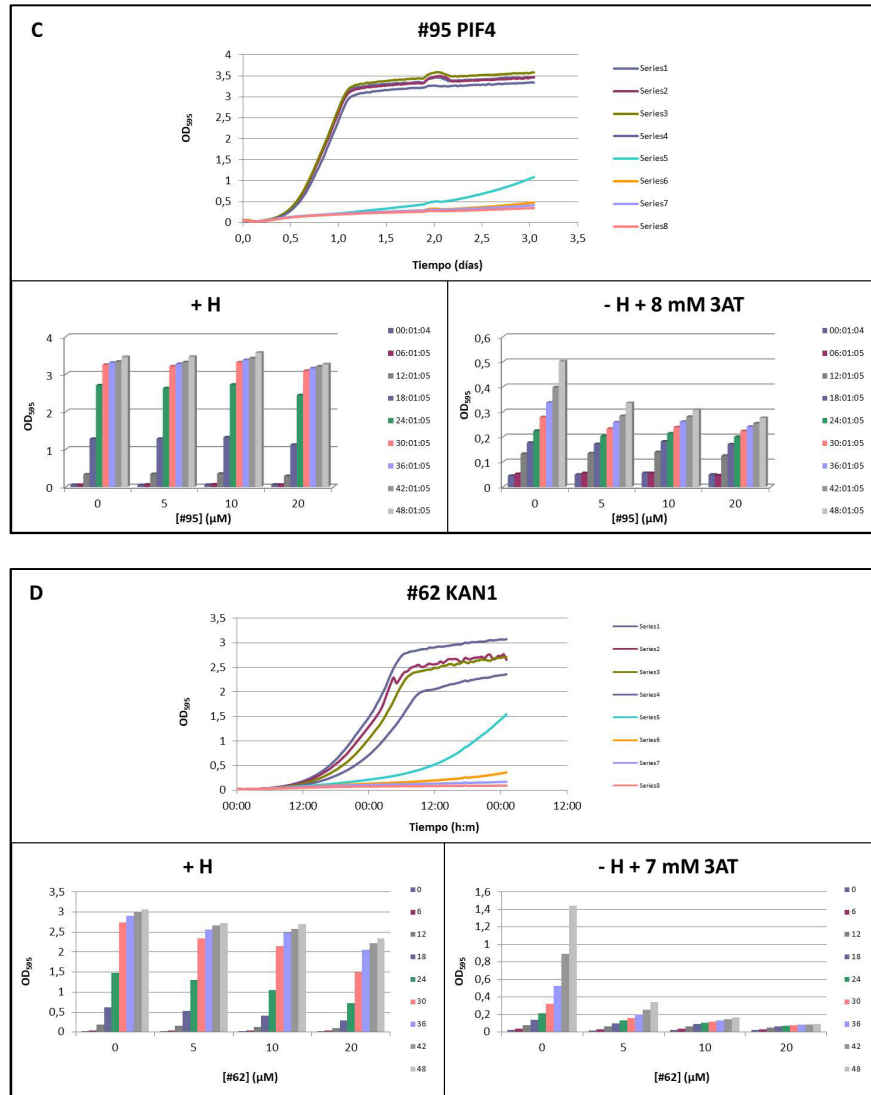


Figura 2.15: Efectos en la velocidad de crecimiento de cultivos de levadura cotransformados con M5GAI + ARR1 (A), BZR1 (B), PIF4 (C) y KAN1 (D) ante el tratamiento con los compuestos #90, #90, #95 y #62 respectivamente. Gráfico superior: Series 1-4: +H; 5-8: -H +3AT; 1,5: 0 μM comp.; 2,6: 5 μM comp.; 3,7: 10 μM comp.; 4,8: 20 μM comp. Gráficos inferiores: las series marcan el tiempo de lectura (h). Medidas de OD₅₉₅.

3. Identificación de moléculas que faciliten la absorción de fosfato.

NOTA: Los resultados de este apartado son confidenciales. Así pues, no se mostrará la estructura química ni la identidad de las moléculas seleccionadas.

3.1. Preparación del rastreo.

En los genes inducidos por ayuno de fosfato (genes PSI), las regiones promotoras están enriquecidas en el motivo P1BS al que se une PHR1 (y PHL1), principal regulador de la respuesta por ayuno de fosfato (Bustos et al., 2010). Estos genes PSI se activan a bajas concentraciones de fosfato. En estas condiciones, una molécula capaz de reprimir la expresión de los mismos podría ser un facilitador de la asimilación de fosfato, objetivo perseguido, o, en todo caso, considerarse un regulador negativo de la respuesta a ayuno de fosfato.

El rastreo se planeó pues para encontrar compuestos que reprimiesen genes PSI en condiciones de estrés por déficit de fosfato. Se utilizó una línea transgénica de *Arabidopsis* transformada con el gen reportero GUS bajo el control del promotor de *IPS1*, que contiene dos cajas P1BS (*IPS1::GUS*) (Bustos et al., 2010) (Figura 2.16).

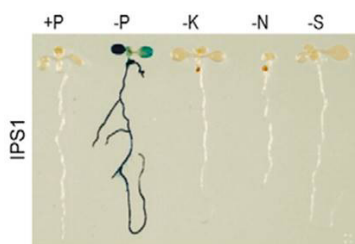


Figura 2.16: Análisis histológico de la actividad GUS en plántulas de *Arabidopsis* sometidas a estrés por carencia de fosfato (P), potasio (K), nitrato (N) y sulfato (S). (Modificado de Bustos et al., 2010).

Para determinar la máxima concentración de fosfato a la que se observaba activación del gen reportero GUS se probaron distintas concentraciones de P_i en el rango 0 – 100 μM . Esta concentración límite, a la que se llamó concentración subóptima de fosfato, resultó ser 70 μM , y fue la que se empleó para realizar el rastreo.

El medio empleado en el rastreo sería $\frac{1}{2}$ MS sin fosfato suplementado con 70 μM KH_2PO_4 . Las condiciones de crecimiento serían de día largo a una temperatura entre 22 y 24 °C. Y el análisis de la actividad GUS se haría a los 7

días después de la germinación. La concentración de compuestos de la colección DIVERSet™ a aplicar durante el escrutinio sería de 40 μ M.

3.2. Rastreo de 10.000 moléculas de la colección DIVERSet™.

Fijadas las condiciones del rastreo, se procedió al escrutinio de 10.000 moléculas DIVERSet™, diferentes a las empleadas en el escrutinio anterior. Una vez finalizado se registraron 52 compuestos que anulaban la actividad GUS en plántulas de Arabidopsis cultivadas durante 7 días a concentración subóptima de fosfato. Estos 52 compuestos se recomprobaron por triplicado en las mismas condiciones del rastreo tras lo cual se confirmaron 37 compuestos.

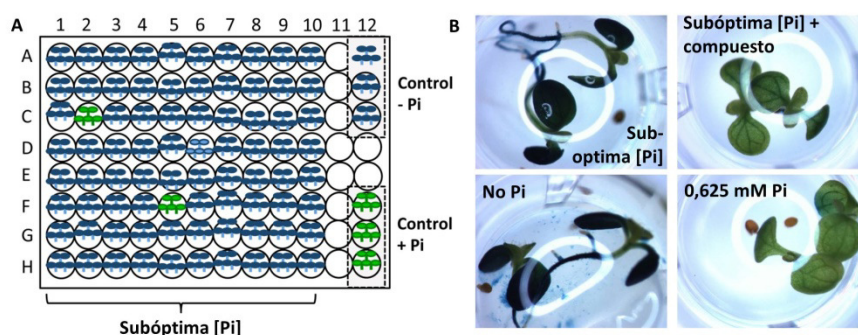


Figura 2.17: (A): Representación de la plataforma de rastreo. Placa de 96 pocillos después de la tinción GUS. Aquellos compuestos en los que no se observe actividad GUS serán escogidos como precandidatos. (B) Comportamiento de los compuestos seleccionados como precandidatos. Plántulas de Arabidopsis cultivadas durante 7 días a subóptima [Pi] sin y con compuesto. Controles sin fosfato (No Pi) y con 0,626 mM Pi.

A continuación se analizó el efecto de estos 37 compuestos en condiciones de ausencia total de fosfato para determinar si su actividad era dependiente o no de la presencia de fosfato. Con esto se pretendía descartar reguladores negativos de la respuesta a ayuno de fosfato; es decir, compuestos que reprimiesen la expresión de los genes PSI en lugar de facilitar la asimilación o señalización de fosfato. Este ensayo permitió descartar 8 compuestos y confirmó los 29 restantes (resultados no mostrados).

3.3. Estudio de homología estructural de las moléculas seleccionadas.

Se analizaron *in silico* las estructuras de las 29 moléculas seleccionadas a partir del rastreo con el fin de identificar similitudes estructurales. Dichos análisis revelaron tres grupos de homología integrados uno de ellos por tres compuestos, y los dos restantes por dos compuestos cada uno (Figura 2.18).

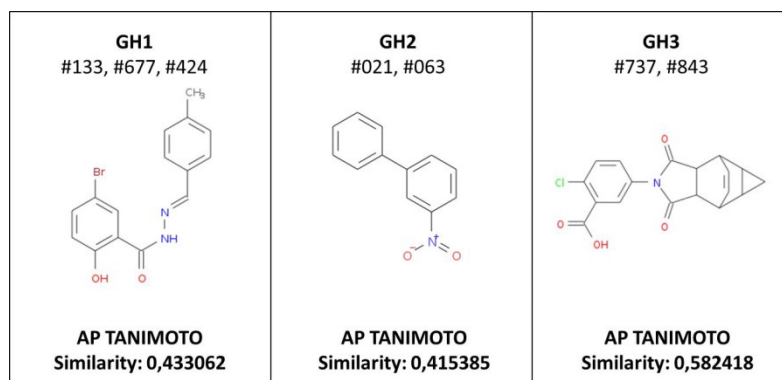


Figura 2.18: Grupos de homología identificados en las 29 moléculas seleccionadas. Similitud expresada mediante el coeficiente de Tanimoto (*T*) (Rogers and Tanimoto, 1960). (ChemMine Clustering Tools; <http://chemmine.ucr.edu/>).

3.4. Caracterización fisiológica de la respuesta a los compuestos.

Hasta el momento todos los ensayos se habían realizado con plántulas de 7 días cultivadas en placas de 96 pocillos, y ya se detectaban variaciones en el tamaño de las plántulas en presencia del compuesto. Un mayor crecimiento podría deberse a que el compuesto alivia el estrés por déficit de fosfato. Por el contrario, un crecimiento reducido podría entenderse como que el compuesto no logra aliviar este estrés. Dado el objetivo práctico perseguido en este trabajo, de encontrar compuestos que favorecieran la asimilación de fosfato, el mayor interés se centraba por tanto en 20 compuestos que, en base a criterios fenotípicos, parecían mejorar el crecimiento de las plántulas en presencia de una concentración limitante de fosfato. Para completar la caracterización, se

evaluó el efecto de estos 20 compuestos en períodos más prolongados de crecimiento.

Para analizar el crecimiento de la roseta se utilizaron placas Petri de 2,5 cm de altura en las que se sembraron de forma dispersa seis semillas en medios idénticos a los del rastreo (70 μM Pi + 40 μM compuesto). A los 16 días se midió el área de roseta y se subdividieron los compuestos en 3 grupos en función de si el área de roseta era superior (grupo I) o inferior (grupo III) en un 50% al control con 70 μM Pi, o estaba dentro de dicho rango (grupo II) (Figura 2.19). Aquellos compuestos en cuya presencia las plántulas alcanzaban un menor crecimiento (grupo III) fueron descartados.

El estrés por déficit de fosfato provoca un menor crecimiento generalizado de la parte aérea de la planta. En el caso de *Arabidopsis* tanto la roseta como la longitud del tallo se reducen considerablemente con respecto a plantas cultivadas en condiciones no limitantes de fosfato. Sin embargo, el fenotipo más característico de la carencia de fosfato se da en la raíz, donde se produce un acortamiento de la raíz primaria mientras se incrementa el número de raíces laterales y pelos radiculares (Péret et al., 2011).

Se estudió el comportamiento de los 12 compuestos restantes en estos dos aspectos, midiendo al respecto de la parte aérea el área de roseta y altura de la planta, y respecto a la raíz la longitud de la misma. Los compuestos se suplementaron a medio con 50 μM Pi, concentración típica de estrés por déficit de fosfato.

Para el estudio de la parte aérea se utilizaron recipientes plásticos asépticos de 6 cm de diámetro inferior y 9 cm de diámetro superior, y 10 cm de altura más 4 cm que otorga la cúpula que actúa de tapa (Figura 2.20A). Las plantas dispondrían así de espacio para desarrollarse también a lo alto.

Se tomó una primera media del área de roseta a los 9 días. Posteriormente, a los 23 días, se midió de nuevo el área de roseta y además la altura de la planta. Transcurrido ese tiempo solo las plantas cultivadas en presencia de 4 compuestos (#268, #281, #405 y #843) iniciaron el tallo. Además el área de roseta de dichas plantas fueron también las únicas que superaron los valores del control con 100 μM Pi (Figura 2.20).

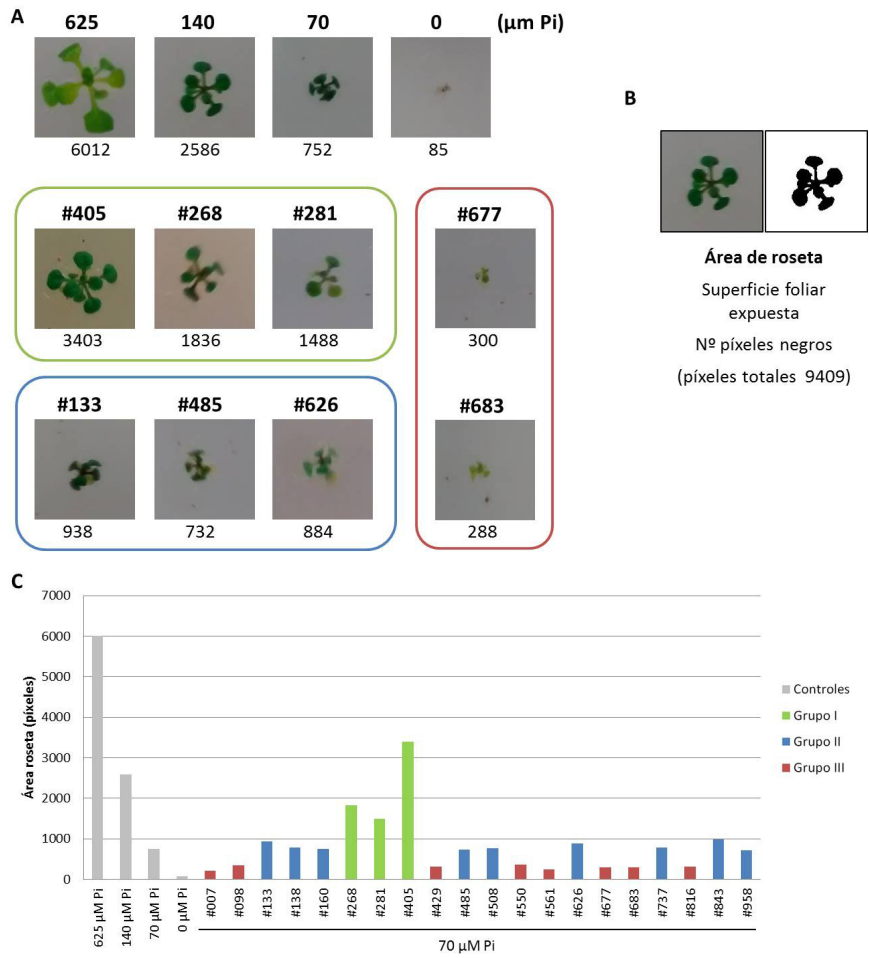


Figura 2.19: (A): Plántulas de Arabidopsis de 16 días cultivadas en condiciones control y a 70 $\mu\text{M Pi}$ + 40 μM compuesto. Condiciones control o código de compuesto figuran sobre las imágenes. Superficie de roseta expresada en número de píxeles bajo las imágenes. (B): Ejemplo de conversión de una fotografía en de imagen binaria (negro sobre blanco) para el cálculo del área de roseta como número de píxeles negros. (C): Área de roseta de los 20 compuestos seleccionados. Grupo I (verde): área roseta > 1,5 área roseta control 70 $\mu\text{M Pi}$. Grupo II (azul): área roseta \pm 1,5 área roseta control 70 $\mu\text{M Pi}$. Grupo III (rojo): área roseta < 1,5 área roseta 70 $\mu\text{M Pi}$.

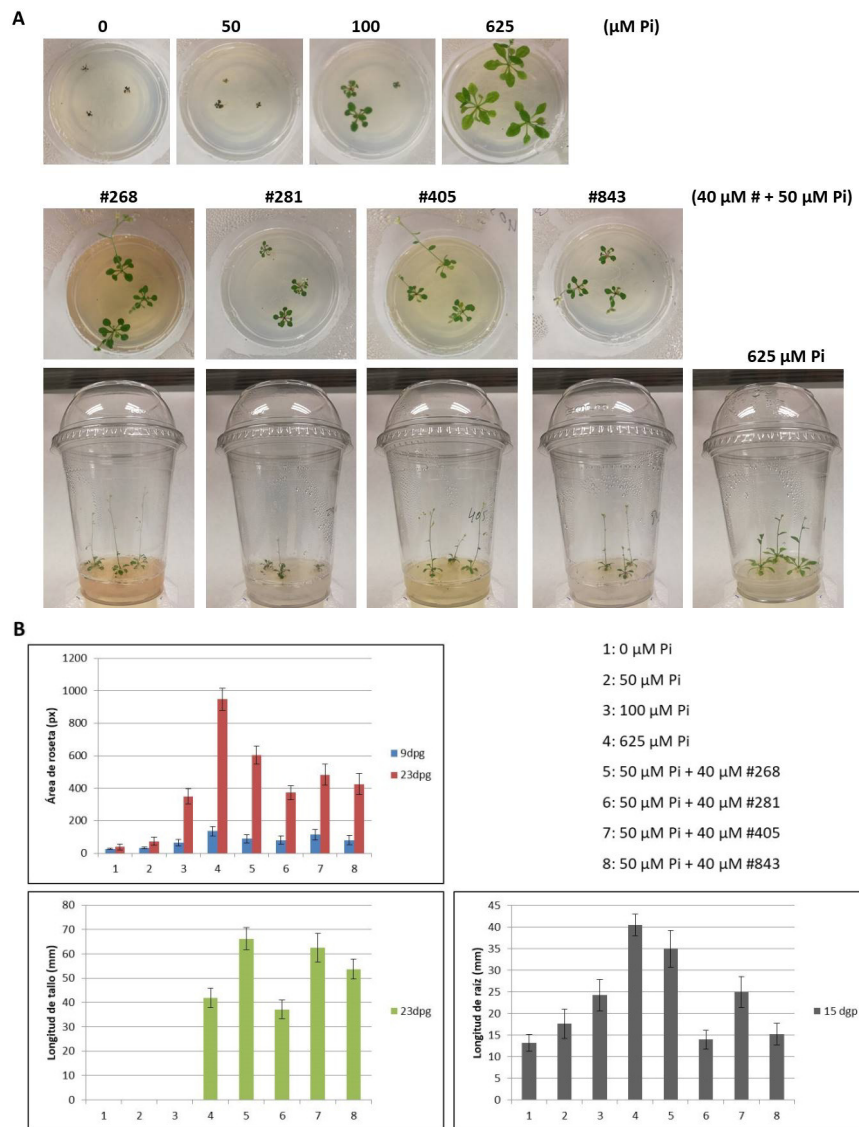


Figura 2.20: (A): Plántulas de Arabidopsis de 16 días cultivadas en condiciones control (0, 50, 100, 625 μM Pi) y a 50 μM Pi + 40 μM compuesto. (B): Medidas de área de roseta, longitud de tallo y longitud de raíz.

El experimento de medición de la longitud de raíz se hizo en placas dispuestas en vertical. A los 15 días se tomaron las medidas. Únicamente las plantas cultivadas en presencia de los compuestos #268 y #405 presentaron una mayor longitud de la raíz que el control con 50 μM Pi (Figura 2.20B). El fenotipo causado por el compuesto #268 es especialmente significativo puesto que la raíz alcanzó casi la longitud de la de las plantas cultivadas a 625 μM Pi y se observa una clara dominancia de la raíz principal con una gran reducción de raíces laterales (Figura 2.21), revirtiendo claramente el fenotipo de raíz de estrés por déficit de fósforo.

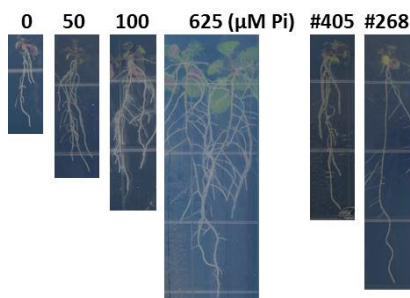


Figura 2.21: Fenotipo de raíz de plántulas de *Arabidopsis* de 15 días cultivadas en condiciones control y 50 μM Pi + 40 μM #268 / #405.

Los dos compuestos que producían un mayor crecimiento de la raíz estaban entre los cuatro que provocaban un mayor desarrollo de la parte aérea. Estos 4 compuestos (#268, #281, #405 y #843) fueron seleccionados para posteriores análisis.

3.5. Análisis de la expresión de genes PSI ante la el tratamiento con los compuestos seleccionados.

Con el fin de complementar el análisis fenotípico con un análisis molecular a baja escala, estudiamos mediante PCR cuantitativa tras transcripción inversa (RT-qPCR) el efecto que los cuatro compuestos seleccionados tienen sobre la expresión de cinco genes estándar de respuesta a ayuno de fósforo (Figura 2.22).

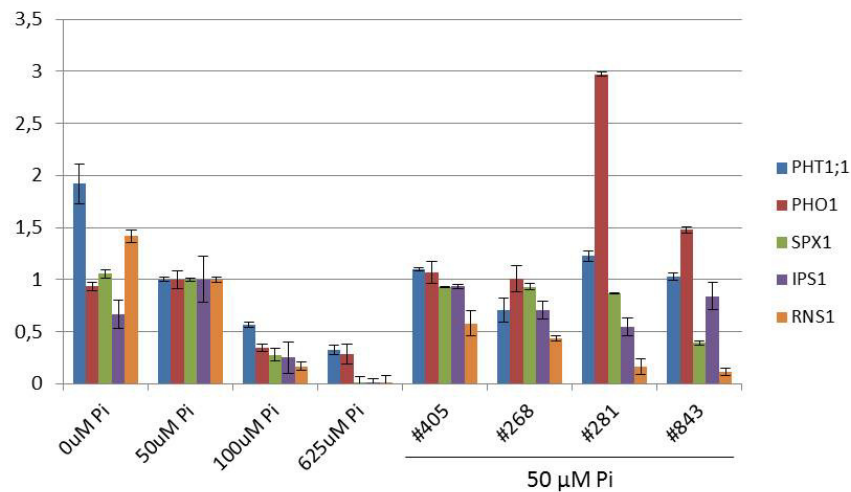


Figura 2.22: Variación en la expresión de cinco genes de respuesta a fosfato en plántulas de *Arabidopsis* de 10 días cultivadas a distintas concentraciones de fosfato y a 50 µM Pi + 40 µM compuesto.

La expresión de *IPS1* se redujo en mayor o menor grado en presencia de todos los compuestos. Era de esperar puesto que estos compuestos anulaban la actividad GUS de las línea delatora *IPS1::GUS*. La reducción más importante se observó en el caso del gen de la ribonucleasa *RNS1*, cuya expresión está descrita que se induce bruscamente ante el ayuno de fosfato (Bariola et al., 1994). La expresión del gen del transportador de fosfato *PHT1;1* únicamente resultó afectada por el compuesto #268. Sí se observa en cambio una reducción generalizada, aunque leve en algunos casos, en la expresión del sensor de fosfato *SPX1*.

El caso de *PHO1*, encargado de la carga del fosfato en la vasculatura desde la raíz para el transporte hacia la parte aérea, merece una mención especial porque es el único en el que se observa un incremento significativo en su expresión ante el tratamiento con dos de los compuestos (en los otros dos no se observa variación). Está ampliamente descrita la inducción de *PHO1* por ayuno de fosfato en tallo, pero hay referencias que puntualizan su inducción transitoria por fosfato y fosfito en raíz. Además, la respuesta de *PHO1* no es específica de fósforo. También responde a numerosos tipos de estrés tanto bióticos como abióticos, por ejemplo herida, infección por patógenos, sequía, salinidad o frío (Ribot et al., 2008; Wang et al., 2008).

3.6. Análisis del metaboloma primario de plántulas de *Arabidopsis* tratadas con los tres compuestos seleccionados.

Con el fin de averiguar si el tratamiento con los compuestos mimetiza el comportamiento de plantas cultivadas en niveles normales de P_i , se realizó un análisis del metaboloma primario en plántulas de *Arabidopsis* cultivadas con los compuestos #268, #281 y #405 en condiciones de carencia de fosfato ($50 \mu\text{M } P_i$). Se midieron niveles de azúcares simples, aminoácidos, ácidos grasos y ácidos orgánicos, y ácido fosfórico (la tabla con los datos relativos a cada metabolito analizado está disponible como material suplementario en http://plasticity.ibmcp.csic.es/Home.html/Downloads_files/Grau_PhD_Thesis_Suppl.zip).

El análisis de componentes principales (PCA) reveló una componente principal que explicaba el 24,6% de la variabilidad entre las muestras, representada en el eje de abscisas de la [figura 2.23](#). Como se observa ([Figura 2.23A](#)), el metaboloma primario de las plántulas tratadas con los compuestos #268, #281 y #405 se sitúa en rango de las plántulas sin estrés por déficit de fosfato ($250 \mu\text{M } P_i$), por lo que el tratamiento con dichos compuestos alivia, al menos a nivel de los metabolitos analizados, los síntomas del ayuno de fosfato. Por ejemplo, las plántulas tratadas con los compuestos presentan mayores niveles de ácido fosfórico, ácidos grasos y ácidos orgánicos, y una menor acumulación de azúcares, asociados éstos al ayuno de fosfato (Franco-Zorrilla et al., 2005; Bustos et al., 2010) ([Figura 2.23B](#)). En este sentido los tres compuestos actúan de manera similar al fosfato.

Una segunda componente responsable del 10,5% de la variabilidad permitió observar diferencias entre la ausencia total de fosfato y condiciones de estrés ($50 \mu\text{M } P_i$), además de leves variaciones entre los compuestos. Las muestras tratadas con los compuestos #268 y #281 presentan una mayor acumulación de ácidos grasos y menores niveles de ácido fosfórico. Por contra, las plántulas tratadas con el compuesto #405 acumulan más ácido fosfórico y menos ácidos grasos, situándose más en sintonía con el perfil de metabolitos que presenta el tratamiento con fosfato.

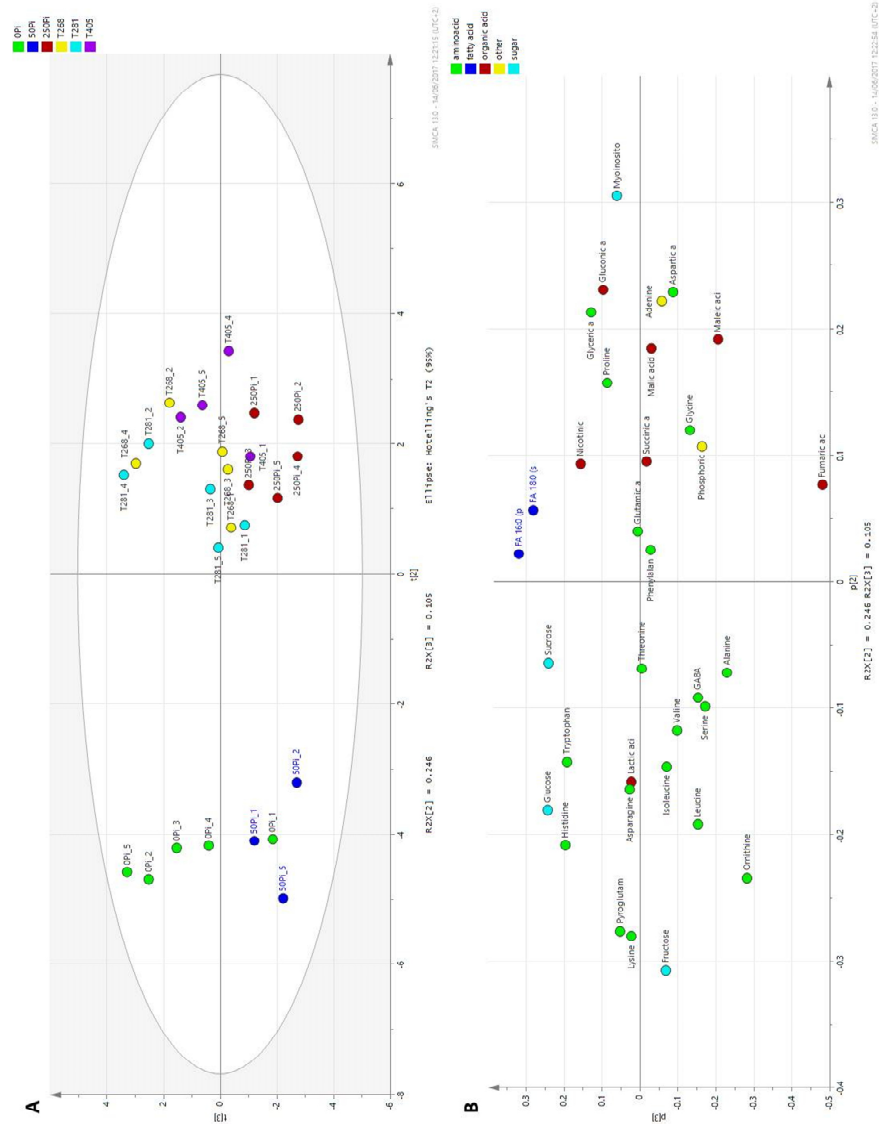


Figura 2.23: Análisis de componentes principales (PCA) del metaboloma primario de plántulas de *Arabidopsis* de 12 días. **A:** Distribución de muestras (OPi, 50Pi, 250Pi = 0, 50, 250 μ M Pi; T268, T281, T405 = 50 μ M Pi + 40 μ M #268, #281, #405). **B:** Distribución de metabolitos. La distribución de muestras (A) y metabolitos (B) colocalizan, de modo que una muestra acumulará mayor cantidad de un metabolito cuanto más próximo se encuentre éste en el gráfico B de la posición homóloga que ocupa dicha muestra en el gráfico A.

3.7. Análisis transcriptómico de plántulas de Arabidopsis tratadas con los tres compuestos seleccionados.

Para saber hasta qué punto los compuestos restauran la asimilación Pi e investigar si los compuestos provocan alteraciones distintas, no relacionadas con el Pi, Se realizó un estudio transcriptómico mediante RNA-Seq en plántulas de Arabidopsis cultivadas en medio con condiciones de ayuno de fósforo (50 μ M Pi) suplementado con cada uno de los compuestos #268, #281 y #405.

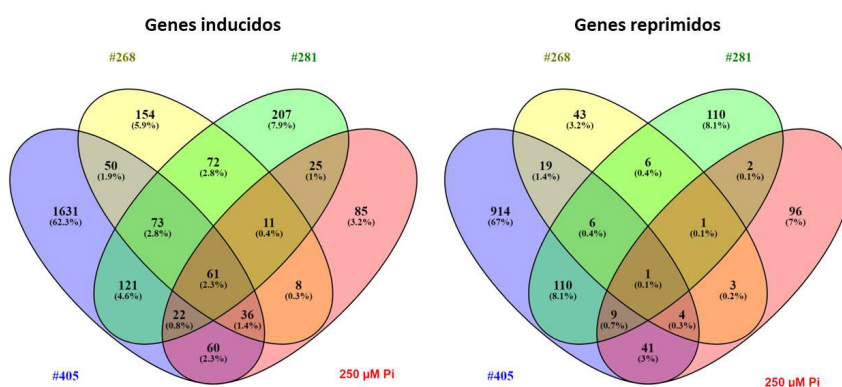


Figura 2.24: Genes inducidos (izquierda) o reprimidos (derecha) al menos un 50% ante el tratamiento con los compuestos #268, #281 y #405 y con 250 μ M Pi con respecto a condiciones de ayuno de fósforo (50 μ M Pi). FC > 1,5; p-value < 0,05.

Tanto el fósforo como los tres compuestos mostraron un mayor efecto inductor que represor, al menos en cuanto al número de genes diferencialmente expresados. La relación de genes inducidos / reprimidos es aproximadamente 2:1 en los casos del fósforo y los compuestos #405 y #281, llegando hasta 11:2 en el del #268. Además, #405 destaca sobre el resto de tratamientos, puesto que afecta a muchos más genes: 3158 genes, frente a 465, 548 y 837 alterados por alto fósforo y los compuestos #268 y #281 respectivamente.

Los análisis de ontología génica (Fig 2.25) revelaron que los tres compuestos inducen procesos biológicos normalmente inducidos por fósforo. Al igual que el fósforo, estas tres moléculas regulan la transcripción y la respuesta defensiva, y lo hacen activando, al menos en parte, el mismo subconjunto de genes que el fósforo.

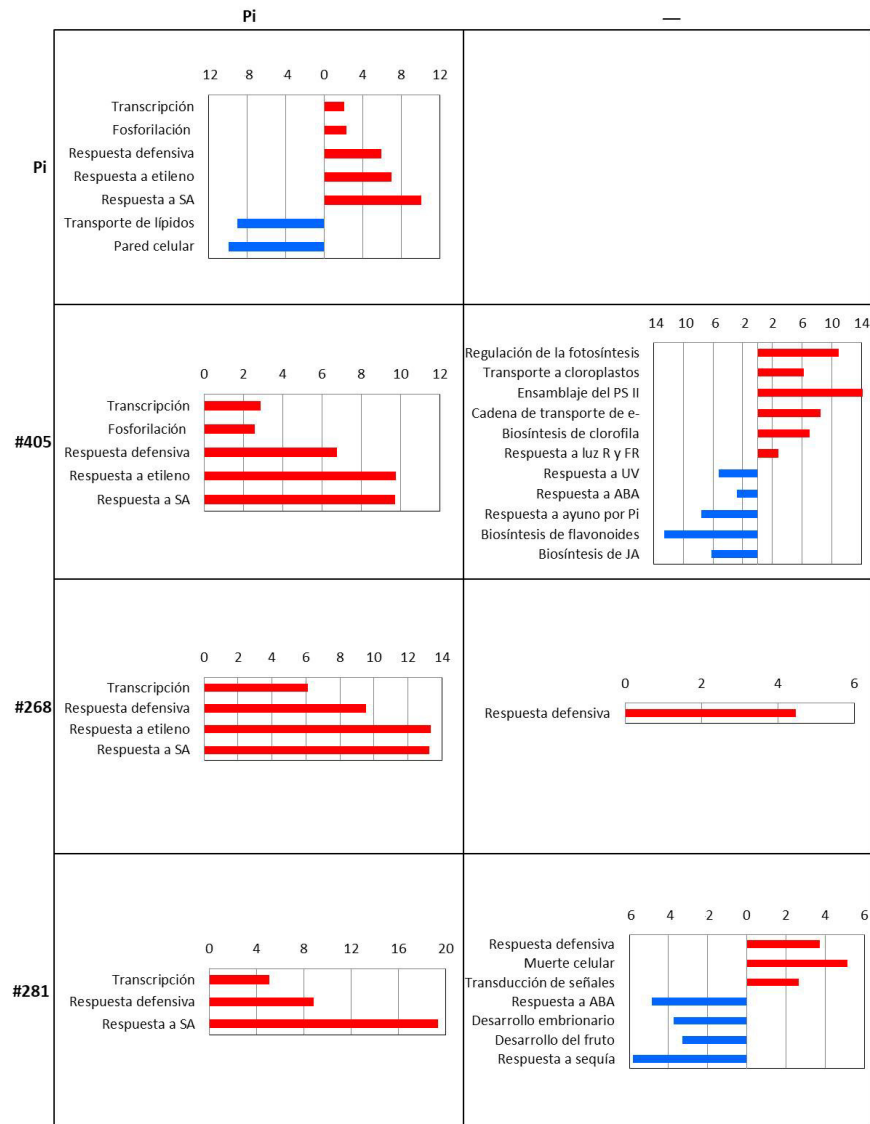


Figura 2.25: Procesos biológicos inducidos (rojo) o reprimidos (azul) por Pi (250 μM) y cada uno de los compuestos #405, #268 y #281 (izquierda), y únicamente por dichos compuestos (derecha), con respecto a condiciones de ayuno de Pi (50 μM Pi). En todos los casos p-value < 0,002.

Pruebas χ^2 con corrección de Yates revelaron que, a nivel transcriptómico, los tratamientos con los tres compuestos presentan similitudes estadísticamente significativas (p -value < 0,0001) con respecto al tratamiento con fosfato (<https://graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm>).

El compuesto #268 es el más similar al fosfato en cuanto a los procesos biológicos que regula. Dicho compuesto activa los mismos procesos, y únicamente incide más en la respuesta defensiva mediante la inducción de otros genes no regulados por fosfato.

El compuesto #281, se comporta de manera similar al caso anterior en cuanto a la respuesta defensiva. Pero además activa procesos de muerte celular (apoptosis) y transducción de señales, y reprime el desarrollo embrionario y del fruto y la respuesta a ABA y privación de agua.

El compuesto #405 es el que muestra un comportamiento a priori más interesante. Activa todos los procesos biológicos que activa el fosfato. Además reduce específicamente la respuesta a ayuno de fosfato y la biosíntesis de flavonoides, entre ellos antocianinas, cuya acumulación es síntoma característico de la carencia de fosfato (Mol et al., 1996; Bustos et al., 2010). Adicionalmente reprime la respuesta a ácido abscísico y la síntesis de jasmónico. Pero lo más interesante es que actúa de manera positiva sobre numerosos procesos fotosintéticos como son la propia regulación de la fotosíntesis, la organización de cloroplastos, el transporte de proteínas a los cloroplastos, ensamblaje del fotosistema II, la cadena de transporte de electrones fotosintética, la biosíntesis de clorofila ya la respuesta a la luz roja y roja lejana. Estos resultados sitúan al compuesto #405 como un represor de la respuesta por ayuno de fosfato, pero también como un activador de la fotosíntesis.

3.8. Derivatización del compuesto #268.

Primando el comportamiento fenotípico y una respuesta transcriptómica más similar a las del fosfato en cuanto a los procesos biológicos que activa, se escogió el compuesto #268 como principal candidato para constituir el principio activo de un formulado que permita disminuir la fertilización fosfatada.

Si bien era el compuesto preferido en base a su comportamiento, también era el compuesto con, previsiblemente, mayor coste de síntesis (Tabla 2.2). Se realizó una búsqueda de compuestos en base a homología estructural con el fin de encontrar análogos. El objetivo era encontrar la molécula con el mejor equilibrio entre eficiencia y coste de producción. Se identificó el que posiblemente sea el centro activo de la molécula y se contrastó éste contra toda la base de datos de ChemBridge. Los resultados obtenidos eran pues moléculas que, preservando el núcleo de la #268, presentaban distintas derivaciones en sus radicales. Se hicieron análisis de similitud estructural de estas moléculas contrastándolas con la #268, descartando aquellas cuyo coeficiente de similitud (AP TANIMOTO) no superaba el 0,5. Finalmente se obtuvieron cinco moléculas análogas (#268a-e) con similitudes entre el 75% y el 91% con respecto a la #268. Interesantemente, la previsión de los costes de síntesis del análogo con mayor similitud (#268c) era de 1/3 respecto a la del #268, lo que hace a esta molécula especialmente interesante (Tabla 2.2).

Tabla 2.2: Análogos de #268 (#268a-e). Similitud de cada análogo con respecto a #268 y precio de síntesis.

	#268	#268a	#268b	#268c	#268d	#268e
Similitud (%)	-	75	89	91	87	75
AP TANIMOTO	-	0.558304	0.833333	0.756972	0.766423	0.657895
Precio de síntesis (\$/mg)	6,75	6,75	6,75	2,25	6,25	2,25

Porcentaje de similitud: Base de datos Hit2Lead (<https://www.hit2lead.com/>). Coeficiente de Tanimoto: ChemMine Clustering Tools (<http://chemmine.ucr.edu/>). Precio de síntesis: Hit2Lead Custom Synthesis (<https://www.hit2lead.com/qrequest.asp>).

3.9. Caracterización fisiológica de la respuesta a los análogos de #268.

Los cinco análogos del compuesto #268 fueron probados en plántulas de *Arabidopsis* cultivadas a baja concentración de fosfato (50 μM Pi) para determinar si eran capaces y en qué grado de aliviar el fenotipo causado por ayuno de fosfato. Se realizaron medidas de área de roseta y de longitud de raíz y tallo (Figuras 2.26 y 2.27). Los experimentos, así como las medidas, se realizaron del mismo modo y en las mismas condiciones que en el apartado 3.4.

Resultados

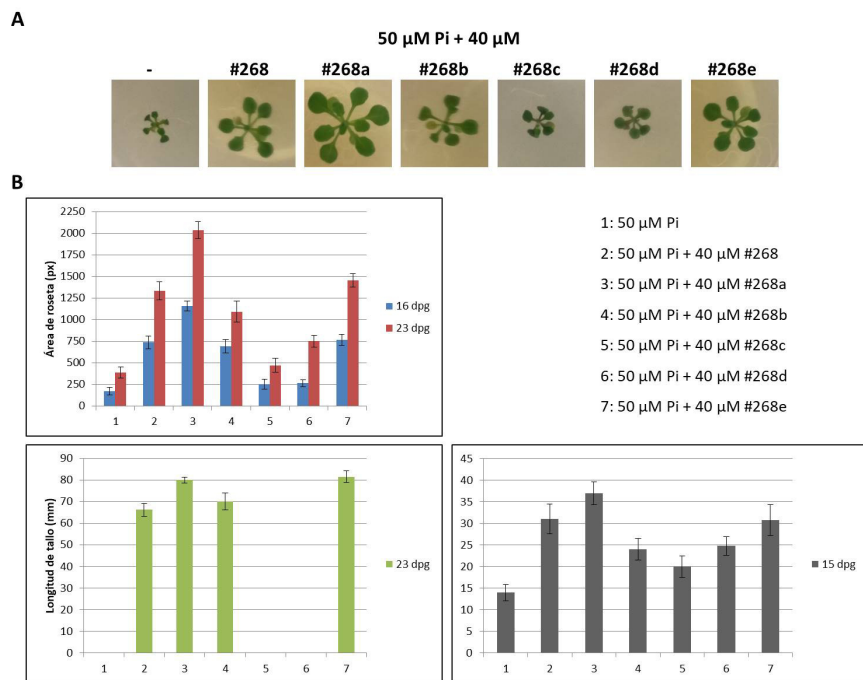


Figura 2.26: (A): Plántulas de Arabidopsis de 16 días cultivadas a 50 μM Pi + 40 μM #268 y análogos (#268a-e). (B): Medidas de área de roseta, longitud de tallo y longitud de raíz de plántulas cultivadas en condiciones de estrés por déficit de fosfato y tratadas con #268 y análogos.

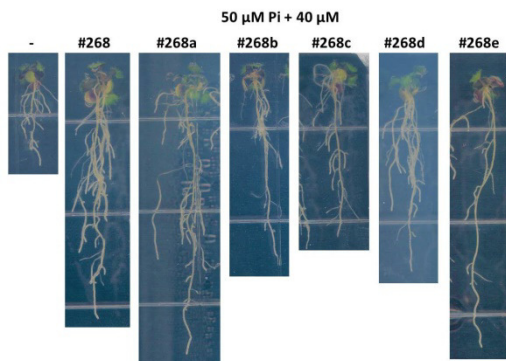


Figura 2.27: Fenotipo de raíz de plántulas de Arabidopsis de 15 días cultivadas en condiciones de estrés por déficit de fosfato y tratadas con #268 y análogos.

Los cinco análogos provocaron una elongación de la raíz mayor que la del control con 50 μ M Pi, revirtiendo así, en mayor o menor grado, el fenotipo de raíz asociado al ayuno de fosfato.

Las moléculas #268a,b,e provocaron un mayor desarrollo de la parte aérea con respecto a las plántulas cultivadas a baja concentración de fosfato. El crecimiento obtenido con el tratamiento de #268a y #268e superó el alcanzado por el #268.

El compuesto #268e se coloca en una posición muy interesante, puesto que la respuesta fenotípica fue ligeramente superior a la del #268 y, además, su coste de síntesis previsto (\$2,25/mg) es un tercio que el del #268 (\$6,75/mg).



IV. DISCUSIÓN

En este trabajo hemos explotado la genética química como herramienta biotecnológica, primeramente en un proyecto enfocado a inferir en la ruta de señalización por GAs, y posteriormente en otro dirigido a identificar moléculas que sirvan como base para el desarrollo de un formulado comercial que permita reducir la fertilización fosfatada.

El hecho de haber empleado con éxito la genética química en dos abordajes tan dispares, uno de ciencia básica y otro de biotecnología aplicada, pone de manifiesto la utilidad de la genética química como herramienta biotecnológica en proyectos de tan diversa índole, lo que indica que su uso no es restrictivo a un solo tipo de abordaje y da idea de su abanico de posibilidades.

La genética química se basa en el desarrollo de moléculas bioactivas que sirvan como droga o herramienta molecular. El mero propósito del proyecto ya determinará de partida si la molécula resultante será una cosa o la otra. En los proyectos de ciencia básica lo habitual es perseguir herramientas moleculares que permitan modular la función génica o rutas de señalización. Los proyectos de biotecnología aplicada perseguirán, por contra, la obtención de drogas, bien sea medicamentos para uso terapéutico en animales o humanos, o agroquímicos (fertilizantes, bioestimulantes, plaguicidas, insecticidas, etc.) para su uso en plantas.

La gran ventaja de las moléculas entendidas como herramientas moleculares es su selectividad. Las rutas metabólicas, sobre todo las hormonales, regulan multitud de respuestas en las plantas. Además, dichas rutas están en muchos casos interrelacionadas formando complejas redes de señalización, lo que hace que sus efectos afecten a procesos más allá de los propios de la ruta. Por ejemplo, la ruta de GAs, cuya señalización se basa en la degradación de las proteínas DELLA, está interrelacionada con las rutas de CK, BR a través de la interacción de las DELLAs con BZR1 y ARR1 respectivamente (Gallego-Bartolome et al., 2012; Marín-de la Rosa et al., 2015).

Mediante abordajes de genética química se pueden identificar agonistas o antagonistas selectivos de las principales hormonas que permitan activar o bloquear un subconjunto de respuestas. La utilidad de este tipo de moléculas es evidente, puesto que permiten inferir en la señalización de una determinada

hormona de forma dirigida afectando únicamente a una fracción concreta de su conjunto de respuestas.

La ruta del ABA cuenta con varios ejemplos exitosos de éste tipo de moléculas. Tal es el caso de la pirabactina, un agonista selectivo de ABA que mimetiza su efecto únicamente en semillas y que posibilitó la identificación de los receptores de esta hormona (Park et al., 2009). En cambio, la quinabactina, otro agonista del ABA, sí que mimetiza la respuesta del ABA en estadio vegetativo activando el cierre de estomas y las respuestas a tolerancia a sequía (Okamoto et al., 2013).

Un objetivo similar persigue este trabajo al respecto de la ruta de GAs: identificar agonistas selectivos que desacoplen las funciones de las GAs.

Las GAs actúan en numerosos procesos fisiológicos de las plantas, y algunos de ellos constituyen parámetros de gran importancia productiva. Por ejemplo, fomentan de la germinación de semillas, aceleran el crecimiento a través de la inducción de división y expansión celular, promueven la floración y formación de frutos, y retrasan la maduración de frutos.

La aplicación de GAs es una práctica agraria habitual, pero dicha aplicación, realizada con un propósito, puede tener efectos no deseados en otros procesos productivos. Por ejemplo, en arroz las GAs se usan como inductores de la germinación, pero afectan de forma negativa a la arquitectura de la planta puesto que provocan un mayor crecimiento y, por tanto, un mayor riesgo de encamado o rotura del tallo. También se emplean cócteles de GAs para sincronizar la floración en cítricos, pero esto conlleva efectos adversos en la maduración de los frutos.

Hemos identificado 8 compuestos que mimetizan, aunque en menor grado que las GAs, el efecto de éstas en la elongación del hipocotilo. No se ha estudiado el efecto de dichos compuestos en otros procesos fisiológicos controlados por GAs. Las moléculas identificadas estarían actuando en la señalización por GAs aguas abajo de las DELLAs, como modificadores postraduccionales de las DELLAs o como activadores de factores de transcripción en paralelo con la señalización de GAs.

La selectividad de las moléculas puede deberse, como en el caso descrito, a la regulación de un subconjunto de respuestas de una determinada

ruta de señalización, pero también a la modulación de una función singular de una proteína multifuncional.

En este sentido se enfocó el escrutinio llevado a cabo en levadura, el cual reveló 6 moléculas que inhiben de forma selectiva la interacción de la versión truncada de la proteína DELLA GAI, M5GAI, con varias de sus dianas (ARR1, BZR1, PIF4 y KAN1). Si bien esta inhibición estuvo pendiente de confirmarse mediante ensayos de *pull-down in vitro*.

El hecho de que las proteínas DELLA fueran capaces de interactuar con tantos y tan diferentes factores de transcripción apuntaba a que no debería hacerlo del mismo modo con todas ellos. El haber identificado inhibidores selectivos de estas interacciones da mayor fuerza a esta hipótesis.

Las DELLAs interactúan con los factores de transcripción a través de los motivos LHR, incluidos en el dominio GRAS. La interacción de las DELLAs con GID1 produce un cambio en la conformación de la parte N-terminal de la proteína (Murase et al., 2008). Sin embargo, el dominio GRAS, localizado en la parte C-terminal, está altamente estructurado (Li et al., 2016), por lo que no es previsible un cambio conformacional de las DELLAs en la interacción con los factores de transcripción. Las diferencias entre las interacciones de las DELLAs con sus distintas dianas se deberían a que los factores de transcripción acoplarían de forma distinta con dicha estructura.

Ninguna de las moléculas seleccionadas en el rastreo en planta en busca de agonistas de GAs se seleccionó en el rastreo de levadura para identificar inhibidores específicos de la interacción DELLA-diana ni viceversa. Podrían haber surgido compuestos comunes en ambos rastreos puesto que una inhibición de la interacción de las DELLAs con PIF4, BZR1 y ARR1 podría tener efecto sobre la elongación del hipocotilo. Pero la elongación del hipocotilo depende de múltiples factores, entre ellos las GAs, BR, CK y luz, y la modificación en sólo uno de ellos a través de la liberación de los citados factores de transcripción (BZR1, ARR1 y PIF4) de la represión de las DELLAs puede no ser lo suficientemente significativa como para poder detectarse en un rastreo en busca de agonistas de GAs.

Además, por lo general se asume que las moléculas empleadas en genética química son lo suficientemente pequeñas como para ser de fácil

acceso a las plantas a través de las raíces. Sin embargo, hay ejemplos como algunos derivados del sirtinol, un activador de la señalización por auxinas, que son efectivos en plántulas en medio líquido pero no en medio sólido, indicando que la biodisponibilidad es mayor a través otros tejidos (Dai et al., 2005). Por lo tanto, la movilidad y capacidad de asimilación por parte de la planta son determinantes. Además, aparte de la captación, la posible conversión de las moléculas en el interior de la planta también debe considerarse.

El segundo proyecto que compone este trabajo posee un enfoque mucho más práctico y lo que se persigue es la obtención de un agroquímico que permita reducir la dosis de fertilización fosfatada.

Las grandes ventajas de las moléculas entendidas como agroquímicos son su temporalidad y dependencia de dosis. El empleo de moléculas permite la activación de respuestas de forma dirigida pero también controlada en el tiempo. Además, dependiendo de la concentración, las moléculas pueden tener efectos distintos. Así, ajustando la dosis y periodo de aplicación dichas moléculas pueden servir para diferentes propósitos.

Si comparamos el desarrollo de moléculas con el desarrollo de nuevas variedades vegetales, las ventajas anteriormente mencionadas adquieren especial relevancia. Las mejoras introducidas en una variedad vegetal con la finalidad de obtener una respuesta deseada pasan a formar parte de su genoma, es decir, que son permanentes y están activas en el mismo grado en el que lo está su expresión génica. En cambio, el efecto causado por los agroquímicos es totalmente regulable en tiempo e intensidad, y además no está sujeto a limitaciones varietales o de especie, aunque su efecto puede variar entre éstas y es necesario ajustar dosis y periodo de aplicación en cada caso.

En este proyecto hemos conseguido identificar 3 moléculas que inhiben la expresión del gen de respuesta a ayuno de fosfato IPS1 a concentraciones subóptimas de fosfato, y esta inhibición es dependiente de la presencia de fosfato. Además el tratamiento con dichas moléculas consigue revertir el fenotipo de reducción del crecimiento de la parte aérea de la planta y, dos de ellas también el fenotipo de reducción de la longitud de la raíz principal.

El hecho de que la inhibición de IPS1 por parte de estos compuestos sea dependiente de la presencia de fosfato, descarta que actúen interrumpiendo la unión de PHR1 a las cajas P1BS de las regiones promotoras de los genes PSI, ya que de ser así, la inhibición de IPS1 se observaría también en ausencia total de fosfato.

La interacción PHR1, regulador clave de la respuesta a ayuno de fosfato, y SPX1 es dependiente de los niveles de fosfato. Una posibilidad es que los compuestos actúen como competidores del fosfato en la interacción de SPX1 con PHR1 de modo que ésta aumente y por consiguiente se reduzca la actividad reguladora de PHR1.

El compuesto #281 provoca un aumento de la expresión de PHO1, relacionado con la carga del fosfato al xilema y su transporte a través de la vasculatura. Además no revierte el fenotipo de carencia de fosfato en raíz, aunque sí en parte aérea. Por ello esta molécula podría estar incentivando el transporte del fosfato desde la raíz a la parte aérea.

De ser ciertas estas hipótesis estaríamos ante tres moléculas que presentan un comportamiento selectivo en la señalización por ayuno de fosfato.

El análisis de componentes principales del metaboloma primario revela que el perfil de metabolitos de las plántulas cultivadas en condiciones de déficit de fosfato y tratadas con los tres compuestos se sitúa en sintonía con el de aquéllas no sometidas a estrés por carencia de fosfato. Por lo tanto, en este sentido las tres moléculas actuarían de manera similar al fosfato.

El análisis de ontología génica realizado a partir de los datos transcriptómicos revela que los tres compuestos inducen, en mayor o menor grado, los mismos procesos biológicos que el fosfato, siendo en #268 el más similar a éste en cuanto a la variedad de procesos que regula. Estos datos arrojan un especial interés sobre el compuesto #405 puesto que, además de como represor de la respuesta por ayuno de fosfato, lo sitúan como un activador de la fotosíntesis.

Los dos proyectos desarrollados en este trabajo son claros ejemplos de la potencia de la genética química en el campo de la biotecnología vegetal, y pone de manifiesto la necesidad de descubrir muchas más moléculas biológicamente activas que sean capaces de modular de forma selectiva la función de los productos génicos.

Abordajes similares permitirían identificar moduladores altamente específicos (y sus correspondientes dianas) de procesos de gran valor productivo como el crecimiento de las plantas, la morfología y la fertilidad, así como la defensa ante factores bióticos y abióticos. La identificación de compuestos que alterasen el reparto de metabolitos podría suponer estrategias químicas para modificar características de calidad de cosecha deseables tales como la composición de la semilla. Además, ayudarían a descubrir genes útiles para la manipulación de rasgos a través de la biotecnología vegetal.

Por otro lado, las moléculas permiten el control rápido, condicional, reversible, selectivo y dependiente de la dosis de las funciones biológicas, actúan como mutaciones condicionales, induciendo o suprimiendo la formación de un fenotipo específico de interés.

Las citadas ventajas unidas al amplio abanico de posibilidades descrito, sitúan a la genética química como una herramienta de enorme valor para la agricultura del S. XXI.

V. CONCLUSIONES

Conclusiones

- 1) Se han identificado 8 compuestos que revierten parcialmente el fenotipo de reducción de la longitud de hipocotilo inducido por PAC. Dado que ninguno de ellos provoca la degradación de las proteínas DELLA, es más probable que no sean análogos de GAs sino que actúen aguas abajo o afecten a otras rutas de control de la expansión celular.
- 2) Se han identificado 4 compuestos que inhiben de forma selectiva la interacción de M5GAI con una de las dianas ARR1, BZR1, PIF4 y KAN1, indicando que es posible separar funciones de GAs y DELLAs mediante tratamientos químicos.
- 3) Se han identificado 3 compuestos que permiten simular en déficit de fosfato el comportamiento de plantas en concentraciones más elevadas de fosfato. Uno de ellos, además, provoca respuestas transcriptómicas adicionales potencialmente beneficiosas, como la activación de la fotosíntesis.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Colección de compuestos químicos.

Se dispone de dos lotes de 10.000 moléculas de la colección DIVERSet™ (ChemBridge, San Diego) cada uno. Uno de ellos se empleó para el rastreo de análogos de GAs y inhibidores de la interacción de las DELLAs con sus dianas. El otro se usó para el rastreo de compuestos que ayuden a la asimilación de fosfato por parte de la planta.

Los compuestos se encuentran diluidos en DMSO y dispuestos en placas de 96 pocillos selladas con papel metálico. Se han de almacenar a una temperatura máxima de -20°C, pudiendo conservarse a -4°C durante breves periodos de trabajo con el fin de minimizar los ciclos de congelado-descongelado.

Antes de manipular los compuestos, éstos se han de descongelar a temperatura ambiente durante 30-40 minutos. A continuación se centrifugan las placas durante 1 minuto a 1200 rpm con el fin de que todo el contenido de los pocillos se dirija al fondo de éstos. Es muy importante que no queden restos de líquido en la cara inferior del sello metálico, puesto que el desprecintar la placa una gota podría caer en cualquier pocillo y contaminar la muestra.

La manipulación de los compuestos se realiza con la ayuda del sistema de pipeteo simultáneo Rainin Liquidator™ 96 (Mettler Toledo).

Una vez finalizado el trabajo se vuelve a termosellar la placa con papel metálico aplicando una temperatura de 175°C durante 3 segundos. Ejercer presión a lo largo de toda la superficie del papel para que no queden burbujas de aire entre pocillos.

Por descontado, todo el procedimiento, desde que se quita el precinto hasta que se vuelve a precintar la placa, ha de tener lugar en cabina de flujo laminar para evitar cualquier contaminación.

2. Material vegetal y esterilización de semilla.

Plantas *wild type* de *Arabidopsis thaliana* ecotipos *Col-0* y *Ler*, y línea *IPS1::GUS* (facilitada por J. Paz-Ares).

- Esterilización de semilla.

Las semillas se esterilizaron sumergiéndolas en una solución de etanol 70% + SDS 0,05% y agitándolas en noria 3-5 min. Una vez removida esta solución se repitió el proceso en etanol 96%. Finalmente se eliminó el etanol y las semillas se sembraron en medio sólido o se conservaron en agua o agarosa 0.05% para su estratificación.

- Estratificación de semilla.

Una vez esterilizadas, las semillas fueron estratificadas en oscuridad a 4°C durante 5 días en medio sólido o en H₂O_{dd} o una solución de agarosa al 0.05%.

3. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento en los rastreos de Arabidopsis.

- Rastreo de análogos de GAs.

Medio ½ MS con vitaminas (Duchefa Biochemie) suplementado con 0,4 μM PAC y 20 μM compuesto, con una concentración final de 0,2% DMSO, 1% sacarosa y 0,8% agar bacteriológico (Pronadisa).

Condiciones de crecimiento: 4 días en luz blanca continua (2 días a 120 nmoles m⁻¹ s⁻¹ + 2 días a 50 nmoles m⁻¹ s⁻¹) seguidos de 4 días en oscuridad. Temperatura fijada a 22 °C y HR 75%.

- Rastreo de compuestos que ayuden a la asimilación de fosfato.

Medio ½ MS sin vitaminas y sin fosfato (Caisson Labs) suplementado con 0,7 μM KH₂PO₄ y 40 μM compuesto, 1% sacarosa y 1% agar Bacto Agar (Difco).

Condiciones de crecimiento de día largo a temperatura de 22-24 °C.

Ambos rastreos se realizaron en placas de 96 pocillos, y se utilizó un volumen de 100 μl de medio sólido y se sembraron 3-4 semillas por pocillo.

- Experimentos con los compuestos seleccionados del rastreo de análogos de GAs.

Medio ½ MS con vitaminas (Duchefa Biochemie), 1% sacarosa y 0,8% agar bacteriológico (Pronadisa). Suplementado con PAC en los casos de prueba de dosis en plantas silvestres a las concentraciones detalladas en los correspondientes apartados. Mismas condiciones de crecimiento que las empleadas en el rastreo. Realizados en placas Petri de 2,5 cm de altura.

- Experimentos con los compuestos seleccionados del rastreo de moléculas que ayuden a la asimilación de fosfato.

Medio ½ MS sin vitaminas y sin fosfato (Caisson Labs), 1% sacarosa y 1% agar Bacto Agar (Difco). Se utilizó KH_2PO_4 como fuente de fosfato a las concentraciones que se indican en los correspondientes apartados. Condiciones de crecimiento de día largo a temperatura de 22-24 °C. Se utilizaron placas Petri de 2,5 cm de altura, salvo en experimentos a más de 12 días para observar longitud de tallo en los que se utilizaron recipientes plásticos asépticos de 6 cm de diámetro inferior y 9 cm de diámetro superior, y 10 cm de altura con 4 cm extra que otorga la cúpula que actúa de tapa. Los experimentos para medir longitud de raíz se realizaron en placas cuadradas de 13 cm de lado dispuestas en posición vertical.

4. Material bacteriano: protocolo de transformación y condiciones de crecimiento.

Células de *E. coli* DH5 α competentes para la transformación por electroporación.

- Protocolo de transformación.

Se emplearon aproximadamente 150 ng de DNA por transformación. En el caso de tratarse de una co-transformación se usaron ~150 ng de cada tipo de DNA.

El DNA se introdujo en una alícuota de 60 μl de células electrocompetentes. Tras agitar levemente, la mezcla se dejó reposar unos 5

minutos en hielo. Para la electroporación las células se transfirieron a cubetas de 0,2 cm de electrodo preenfriadas y se sometieron a un pulso eléctrico de 1500 V. Una vez recuperadas las células de la cubeta, se les añadió 300 µl de LB y se emplazaron a 37°C en un agitador (300 rpm) durante 45 minutos. Finalmente los cultivos fueron plaqueados en los correspondientes medios de selección.

- Condiciones de crecimiento.

Las células de *E. coli* fueron cultivadas a 37°C en medio LB (sólido o líquido) suplementado con los antibióticos correspondientes para la selección de transformantes.

Antibióticos y concentraciones empleados: Amp (50 µg/ml), Cm (34 µg/ml), Gm (30 µg/ml) y Sp (50 µg/ml).

5. Levadura: protocolo de transformación y condiciones de crecimiento.

Células de *S. cerevisiae* MaV203 (Invitrogen), auxótrofa para Leu, Trp, His, Ura y Ade.

- Protocolo de transformación.

1. Se parte de un preinóculo SD saturado ($OD_{600}=2$ aproximadamente) crecido O/N a 28°C en agitación. A partir de éste preparar un inóculo SD a $DO_{600}=0.2$ y dejar incubar 4 horas hasta una $OD_{600}=0.5$. Preparar 25 ml de inóculo por transformación.
2. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos a T ambiente y lavar el precipitado con 1/5 volúmenes de H₂O.
3. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos a T ambiente y lavar el precipitado con 1/10 volúmenes de TELiAc.
4. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos a T ambiente y resuspender el precipitado en 1/100 volúmenes de TELiAc.

Llegado a este punto las células han adquirido competencia para su transformación, la cual sigue el siguiente esquema:

5. Por cada transformación, añadir a 10 µl de DNA carrier previamente hervido y enfriado, 150 ng de DNA (en caso de co-transformación 150 ng de cada DNA), 100 µl de células competentes y 600 µl de PEGLiAc.
6. Agitar bien e incubar en agitación durante 30 minutos a 28°C.
7. Añadir 70 µl de DMSO e incubar 15 minutos a 42°C.
8. Centrifugar 5 segundos a 13.000 rpm, resuspender el pellet en 200 µl de SD y sembrar en el correspondiente medio selectivo.

- Condiciones de crecimiento.

Las células de levadura se cultivaron a 28°C en medio nutritivo (YPD) o selectivo (SD) complementado con los correspondientes aminoácidos y nutrientes para la selección de transformantes.

Aminoácidos, nutrientes y sus concentraciones empleados para la selección: Leu (100 mg/l), Trp (20 mg/l), His (20 mg/l) y Ura (20 mg/l).

Para el test de inducción de *HIS3* se emplearon concentraciones crecientes de 3-AT de 0 a 60 mM 3AT a intervalos de 5 mM.

Los goteos se realizaron diluyendo una muestra de colonia en 200 µl de SD (1:1). A partir de ésta se hicieron diluciones 1:10, 1:100, 1:1.000 y 1:10.000.

- Medio y condiciones de crecimiento en el rastreo de levadura.

Medio SD sólido suplementado con Leu, Trp y Ura en las concentraciones antes descritas, y con 10, 30, 35 y 50 mM 3AT para los cultivos de levadura cotransformados con KAN1, PIF4, BZR1 Y ARR1 respectivamente. Condiciones de crecimiento a 28 °C durante 48 h.

- Medio y condiciones de crecimiento en el ensayo de cinética de crecimiento de levadura.

Medio SD líquido suplementado con Leu, Trp y Ura en las concentraciones descritas en el apartado 3.5, y con 3-7, 8-15, 35 y 40 mM 3AT

para los cultivos de levadura cotransformados con KAN1, PIF4, BZR1 Y ARR1 respectivamente. Condiciones de crecimiento a 28 °C durante 48 ó 72 h en agitación.

6. Purificación de DNA plasmídico.

El DNA plasmídico se purificó siguiendo el protocolo por centrifugación del kit de purificación de plásmidos E.Z.N.A.® (OMEGA bio-teck).

7. Reacciones de clonaje Gateway™ BP y LR.

Las reacciones BP se hicieron usando 50-100 ng de producto de PCR y 50 ng de pDONR221. Las reacciones de recombinación se hicieron en un volumen total de 10 µl conteniendo 2 µl de BP-Clonase™ (Invitrogen) y se incubaron a 25°C durante la noche. Las reacciones se inactivaron añadiendo 1 µl de Proteasa K y 5 µl de cada una fue utilizado para transformar células competentes *E. coli*.

Alternativamente, para la obtención de 'entry clones', se utilizó el protocolo de pCR8®/GW/TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen) para introducir productos de PCR en el vector de entrada pCR8.

Para las reacciones LR se usaron 100 ng de vector de destino, junto con 35-50 ng de cada clon de entrada y 2 µl de LR-Clonase II™ (Invitrogen). El volumen total se ajustó a 10 µl. La mezcla se incubó a 25°C durante la noche. 1 µl de Proteasa K se añadió para inactivar la reacción. En todos los casos se hizo un control negativo reemplazando la LR-Clonase II™ por la misma cantidad de agua.

8. Protocolos de PCR y electroforesis.

Para la amplificación de DNA plasmídico, la mezcla de reacción PCR contenía 0,5 µM de cada (5' y 3') cebador, 25 ng de DNA, 200 µM de cada dNTP, 1 unidad de Taq-polymerase (Biotools), 1X buffer de reacción PCR (con MgCl₂ 2

mM). Para realizar las deleciones de GAI se empleó una polimerasa de alta eficiencia: Platinum[®] HIFI DNA polymerase (Invitrogen).

Tabla 3.1: Oligonucleótidos utilizados para hacer las deleciones de GAI MDGAI (m5GAI-F, m5GAI-del1-R) y MD2GAI (m5GAI-F, m5GAI-del2-R).

Cebador	Secuencia
m5GAI-F	5'-AAC GGC GTC GTG GAA ACC-3'
m5GAI-del1-R	5'-GCC TAA ATC CGC CGC GCG AGA GC-3'
m5GAI-del2-R	5'-TCA CGC AAG AGC CTG CAT AAG C-3'

Las condiciones de PCR fueron: 1 minuto de desnaturalización inicial a 94°C, 30 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de 'annealing' a 58°C y 45 segundos de elongación a 72°C, y finalmente 2 minutos de terminación a 72°C.

Las PCR, una vez añadido el tampón de carga, se corrieron en geles de agarosa al 1%.

Para la amplificación de DNA directamente desde colonias de *E. coli* (colony-PCR), se diluyó una porción de colonia en 30 µl de H₂O, utilizando 5 µl de esta dilución como templado para la mezcla de PCR.

En este caso las condiciones de PCR se alteraron levemente. Se aumentó a 5 minutos el tiempo inicial a 94°C para favorecer la desnaturalización y lisis celular. El número de ciclos ascendió a 35 y el tiempo de cada una de sus fases (94, 58 y 72°C) se ajustó a 1 minuto cada una. El tiempo de extensión final también fue prolongado hasta los 5 minutos.

9. Extracción de DNA a partir de geles.

La purificación de DNA a partir de geles de agarosa se realizó conforme al protocolo por centrifugación descrito en el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen).

10. Extracción de RNA total.

La extracción de RNA se realizó a partir de 100 mg de tejido vegetal congelado en nitrógeno líquido empleando el sistema NucleoSpin® RNA Plant (Macherey-Nagel) y siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, el RNA se cuantificó usando un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000.

11. Síntesis de cDNA.

La síntesis de cDNA se efectuó a partir de la retrotranscripción de 1 µM RNA total, utilizando el sistema PrimeScript First Strand cDNA Synthesis Kit (Takara) según las instrucciones del fabricante.

12. Análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR.

Se tomaron 3 réplicas de plántulas de 10 días cultivadas en ½ MS y en condiciones de día largo a concentraciones de 0, 50, 100 y 625 µM Pi, y 50 µM Pi + 40 µM compuesto (#268, #281, #405 y #843). Las muestras fueron recogidas en nitrógeno líquido y molidas. Se emplearon 100 mg de cada réplica para extraer RNA total del modo que se indica en el apartado 10 de esta sección.

La expresión relativa de los diferentes genes fue analizada a partir de la transcripción reversa (RT) de 1 µg de RNA como se indica en el apartado 11, y posterior amplificación cuantitativa (qPCR) usando el sistema de detección 7500 Fast Real-time PCR System (7500 Software v2.0) y el reactivo SYBR® Green como agente de detección durante un ciclo estándar (~2 horas). El análisis de la expresión relativa se basó en el método de comparativa de ciclos de amplificación (-ΔΔCt) respecto al control (50 µM Pi). Los oligonucleótidos diseñados utilizando el programa Primer Express v.2.0 (Applied Biosystems™) a partir de las regiones específicas para cada gen de estudio se muestran en la [tabla 3.2](#). El gen de referencia utilizado para el análisis de datos fue *Ef1A*.

Tabla 3.2: Oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión de genes PSI mediante RT-qPCR.

	Fwd	Rev
SPX1	CCTTGCGGGTTTTGAAGGA	CGGCAATGAAAACACACTAACAG
PHO1	CAAAACAAAAGGAGGCAAACCA	GCCACAGCGTCGGGAAT
IPS1	TGCGAGTTTTGTTTATCTCCCTCTA	CCGAAGCTTGCCAAAGGA
RNS1	CTTGCCCAAGCGGTTTCAG	GTACCATGCTTCTCCCATTCG
PHT1;1	GGAAATGGCCGAACAACAAC	GCGTCTTCGCAACATCGA

Composición mezcla qPCR: 10 µl de SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara), 1 µl de cDNA y 0,8 µl de cada oligonucleótido a una concentración 10 µM en un volumen total de 20 µl.

13. Análisis de la actividad GUS.

Plántulas recién recolectadas fueron inmersas en 3 ml de solución de tinción (50 mM NaPO₄ pH 7, 0,1% Triton X-100, 1 mM X-Gluc) dispuestos en placas de 12 pocillos e incubadas durante la noche a 37 °C.

14. Extracción de proteínas y western blot.

Extractos crudos de proteínas fueron preparados a partir de material congelado homogeneizado mezclado a razón 1:2 (p/v) con un tampón de extracción que mantiene las proteínas en condiciones nativas compuesto por Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), glicerol 10% y Nonidet P-40 0,1%, y suplementado con un cóctel de inhibidores proteasas (Roche®). Tras centrifugaron a 4°C y 13000 g durante 15 minutos se recogió el sobrenadante. La concentración de proteínas fue medida usando el reactivo Bradford. A 30 µg de proteína se añadió el tampón de extracción de proteína desnaturizante Laemli (1x) [Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, glicerol 10%] y se calentó a 95 °C durante 5 minutos para desnaturizar, tras lo cual se enfrió en hielo para cargar posteriormente en el gel o se almacenó a -80 °C.

Las muestras se cargaron en geles de separación SDS-PAGE 8,5% (Pierce). Después de la separación de proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Bio-Rad), teñida con rojo Ponceau para comprobar que el nivel de proteína en las diferentes muestras de entrada era comparable, tras lo cual se destiñó con H_2O_d . A continuación, las membranas se saturaron con tampón de bloqueo [TBS 0,1%, Tween-20 (0,1%), reactivo de bloqueo 20% (Roche®)] y se incubaron con el anticuerpo primario α -GFP (JL-8, Clontech®) diluido 1:5000 en reactivo de bloqueo durante la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron tres etapas de lavado de 5, 10 y 5 minutos con tampón de lavado [TBS 0,1%, Tween-20 (0,1%)]. Posteriormente se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente con anticuerpo secundario α -mouse diluido 1:10000 en reactivo de bloqueo y se hicieron otros tres lavados. Para el revelado se usó SuperSignal West Femto Chemiluminiscent Substrate (ThermoFisher) y la señal se detectó con un sistema LAS-3000 Imaging System (Fuji).

15. Análisis del metaboloma primario.

Se tomaron 5 réplicas de plántulas de 12 días cultivadas en $\frac{1}{2}$ MS y en condiciones de día largo a concentraciones de 0, 50 y 250 μ M Pi, y 50 μ M Pi + 40 μ M compuesto (#268, #281 y #405). Las muestras fueron recogidas en nitrógeno líquido (N_2 -l) y molidas. Se emplearon 125 ± 5 mg de cada réplica para medir metabolitos.

Se midieron un total de 35 metabolitos de las siguientes clases: azúcares simples, aminoácidos, ácidos grasos y ácidos orgánicos. Para realizar el análisis estadístico, los niveles volátiles relativos a la referencia interna (50 μ M Pi) fueron transformados primero en \log_2 (ver tabla en material suplementario, http://plasticity.ibmcp.csic.es/Home.html/Downloads_files/Grau_PhD_Thesis_Suppl.zip). El análisis de componentes principales (PCA) se realizó utilizando el software Simca-P (Umetrics, Umeå, Suecia).

16. Análisis de RNA-Seq.

Se tomaron 3 réplicas de plántulas de 12 días cultivadas en $\frac{1}{2}$ MS y en condiciones de día largo a concentraciones de 0, 50 y 250 μ M Pi, y 50 μ M Pi +

40 μ M compuesto (#268, #281 y #405). Las muestras fueron recogidas en nitrógeno líquido y molidas. Se emplearon 100 mg de cada réplica para extraer RNA total como se describe en el apartado 10. La concentración e integridad del RNA se determinó respectivamente mediante el empleo de un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 y un Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer. Todas las muestras presentaron un número de integridad de RNA (RIN) superior a 8.

1 μ g de RNA de cada muestra se envió al Servicio de Genómica de la Universidad de Valencia donde primeramente prepararon las genotecas de cDNA que posteriormente secuenciaron en un secuenciador NextSeq 500 de Illumina a una profundidad de 10M en lecturas únicas de 75 nt.

Los datos de secuenciación basados en RNA-Seq se analizaron de la siguiente manera:

1. Análisis de calidad de las lecturas brutas, con el programa FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).
2. Preprocesado de las lecturas: se eliminaron las primeras 15 bases y las últimas 2 bases de cada lectura por no mostrar la distribución aleatoria esperable en la fragmentación al azar del cDNA para secuenciar. También se eliminaron adaptadores y extremos de baja calidad de las lecturas, así como las lecturas que tras limpiar quedaban con menos de 30 bases. Dicha limpieza se realizó con el programa 'cutadapt' (<http://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/guide.html>).
3. Análisis de calidad de los clean reads (tras eliminar lo indicado en el apartado anterior), con el programa FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).
4. Mapeo de las lecturas limpias contra el genoma/transcriptoma de Arabidopsis usando el programa tophat (<https://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml>), resultando entre un 98.0% y un 98.8% de lecturas mapeadas.
5. Contaje normalizado de lecturas que mapean en cada uno de los genes de Arabidopsis, realizado usando htseq-count (<http://www-huber.embl.de/HTSeq/doc/count.html>).

6. Obtención de genes diferencialmente expresados entre las muestras, realizado con edgeR (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html>) y obteniendo genes con FOLD CHANGE > 4, genes con FOLD CHANGE > 2 y genes con FOLD CHANGE > 1.5, todos ellos con un p-value < 0.001 como valor de corte.
7. Obtención de términos GO diferencialmente representados en los genes diferencialmente expresados, usando la herramienta goseq (<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/goseq.html>).

Las tablas con los datos de la expresión diferencial de cada una de los tratamientos con respecto a la referencia (50 μ M Pi) se están disponibles en http://plasticity.ibmcp.csic.es/Home.html/Downloads_files/Grau_PhD_Thesis_Suppl.zip como material suplementario.

Los diagramas de Venn se realizaron empleando el software Venny2.1 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

17. Análisis estadístico para determinar similitud a nivel transcriptómico entre en tratamiento con los diferentes compuestos y el fosfato.

La prueba estadística para determinar si existían similitudes nivel transcriptómico estadísticamente significativas a entre los tratamientos con los compuestos #268, #281 y #405 y con fosfato se hizo empleando el software GraphPad mediante una prueba χ^2 con corrección de Yates en una tabla de contingencia de dos variables, donde una variable era el fosfato y la otra cada uno de los compuestos (<https://graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm>).

18. Análisis de ontología génica.

Los análisis de ontología génica efectuados a partir de los datos de RNA-Seq con el fin de identificar los procesos biológicos que se veían diferencialmente afectados por los distintos tratamientos, se realizaron empleando la herramienta de análisis de AgriGO Singular Enrichment Analysis

(SEA) (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/analysis.php>). Los procesos biológicos anotados tuvieron un p-value < 0,02.

19. Derivatización y pruebas de analogía y similitud de moléculas.

Los análisis de similitud entre moléculas se realizaron con el software Similarity WorkBench (ChemMine Tools, <http://chemmine.ucr.edu/>) utilizando como indicador de similitud el coeficiente de Tanimoto (T) (Rogers and Tanimoto, 1960). Se adoptaron las condiciones por defecto del software, según las cuales existen similitudes significativas si $T \geq 0,4$.

La búsqueda de análogos del compuesto #268 se comenzó contrastando dicha molécula en la base de datos de ChemBridge a través de las herramientas *2D Analogs* y *3D Analogs* (<https://www.hit2lead.com/>), las cuales ofrecen análogos 2D y 3D respectivamente a una molécula dada. Cada molécula viene acompañada por el porcentaje de similitud estructural entre ésta y la #268.

Dichas moléculas, utilizando el paquete de herramientas Cluster Tools de ChemMine (<http://chemmine.ucr.edu/>), se subdividieron en función de sus analogías internas tomando como umbral de similitud $T = 0,4$, formando grupos según la parte molecular compartida o con mayor similitud. Dicha subdivisión reveló un subgrupo de moléculas que guardaban entre ellas gran similitud. Se obtuvo la estructura común de este subgrupo (ChemMine Cluster Tools, <http://chemmine.ucr.edu/>) y se cotejó con la base de datos de ChemBridge, obteniendo todas las moléculas de la colección DIVERSet™ que poseían dicho grupo estructural.

Se analizó la similitud de estas moléculas con respecto a la #268 tal y como se describe en el primer párrafo de este apartado. Se escogieron como análogos de #268 aquellas en las que T había resultado $\geq 0,5$.

VII. REFERENCIAS

- Achard, P., Baghour, M., Chapple, A., Hedden, P., Van Der Straeten, D., Genschik, P., Moritz, T., and Harberd, N.P. (2007a).** The plant stress hormone ethylene controls floral transition via DELLA-dependent regulation of floral meristem-identity genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 6484-6489.
- Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van Der Straeten, D., Peng, J., and Harberd, N.P. (2006).** Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* *311*, 91-94.
- Achard, P., Liao, L., Jiang, C., Desnos, T., Bartlett, J., Fu, X., and Harberd, N.P. (2007b).** DELLAs contribute to plant photomorphogenesis. *Plant Physiol* *143*, 1163-1172.
- Alabadi, D., and Blazquez, M.A. (2008).** Integration of light and hormone signals. *Plant Signal Behav* *3*, 448-449.
- Alabadi, D., and Blazquez, M.A. (2009).** Molecular interactions between light and hormone signaling to control plant growth. *Plant Mol Biol* *69*, 409-417.
- Alabadi, D., Gallego-Bartolome, J., Orlando, L., Garcia-Carcel, L., Rubio, V., Martinez, C., Frigerio, M., Iglesias-Pedraz, J.M., Espinosa, A., Deng, X.W., et al. (2008).** Gibberellins modulate light signaling pathways to prevent Arabidopsis seedling de-etiolation in darkness. *Plant J* *53*, 324-335.
- An, F., Zhang, X., Zhu, Z., Ji, Y., He, W., Jiang, Z., Li, M., and Guo, H. (2012).** Coordinated regulation of apical hook development by gibberellins and ethylene in etiolated Arabidopsis seedlings. *Cell Res* *22*, 915-927.
- Appleford, N.E., Evans, D.J., Lenton, J.R., Gaskin, P., Croker, S.J., Devos, K.M., Phillips, A.L., and Hedden, P. (2006).** Function and transcript analysis of gibberellin-biosynthetic enzymes in wheat. *Planta* *223*, 568-582.
- Ariizumi, T., Murase, K., Sun, T.P., and Steber, C.M. (2008).** Proteolysis-independent downregulation of DELLA repression in Arabidopsis by the gibberellin receptor GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1. *Plant Cell* *20*, 2447-2459.
- Armstrong, J.I., Yuan, S., Dale, J.M., Tanner, V.N., and Theologis, A. (2004).** Identification of inhibitors of auxin transcriptional activation by means of chemical genetics in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 14978-14983.
- Arnaud, C., Clement, M., Thibaud, M.C., Javot, H., Chiarenza, S., Delannoy, E., Revol, J., Soreau, P., Balzergue, S., Block, M.A., et al. (2014).** Identification of

phosphatin, a drug alleviating phosphate starvation responses in Arabidopsis. *Plant Physiol* 166, 1479-1491.

Bari, R., Datt Pant, B., Stitt, M., and Scheible, W.R. (2006). PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiol* 141, 988-999.

Bariola, P.A., Howard, C.J., Taylor, C.B., Verburg, M.T., Jaglan, V.D., and Green, P.J. (1994). The Arabidopsis ribonuclease gene RNS1 is tightly controlled in response to phosphate limitation. *Plant J* 6, 673-685.

Blackwell, H.E., and Zhao, Y. (2003). Chemical genetic approaches to plant biology. *Plant Physiol* 133, 448-455.

Bolle, C. (2004). The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* 218, 683-692.

Bonnot, C., Pinson, B., Clement, M., Bernillon, S., Chiarenza, S., Kanno, S., Kobayashi, N., Delannoy, E., Nakanishi, T.M., Nussaume, L., et al. (2016). A chemical genetic strategy identify the PHOSTIN, a synthetic molecule that triggers phosphate starvation responses in Arabidopsis thaliana. *New Phytol* 209, 161-176.

Bouquin, T., Meier, C., Foster, R., Nielsen, M.E., and Mundy, J. (2001). Control of specific gene expression by gibberellin and brassinosteroid. *Plant Physiol* 127, 450-458.

Bustos, R., Castrillo, G., Linhares, F., Puga, M.I., Rubio, V., Perez-Perez, J., Solano, R., Leyva, A., and Paz-Ares, J. (2010). A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in Arabidopsis. *PLoS Genet* 6, e1001102.

Cao, D., Cheng, H., Wu, W., Soo, H.M., and Peng, J. (2006). Gibberellin mobilizes distinct DELLA-dependent transcriptomes to regulate seed germination and floral development in Arabidopsis. *Plant Physiol* 142, 509-525.

Carland, F., Defries, A., Cutler, S., and Nelson, T. (2016). Novel Vein Patterns in Arabidopsis Induced by Small Molecules. *Plant Physiol* 170, 338-353.

Claeys, H., De Bodt, S., and Inze, D. (2014). Gibberellins and DELLAs: central nodes in growth regulatory networks. *Trends Plant Sci* 19, 231-239.

Cordell, D., Drangert, J., and White, S. (2009). The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Global Environmental Change*, 292-305.

Chen, J., Wang, Y., Wang, F., Yang, J., Gao, M., Li, C., Liu, Y., Liu, Y., Yamaji, N., Ma, J.F., et al. (2015). The rice CK2 kinase regulates trafficking of phosphate transporters in response to phosphate levels. *Plant Cell* 27, 711-723.

Chini, A. (2014). Application of yeast-two hybrid assay to chemical genomic screens: a high-throughput system to identify novel molecules modulating plant hormone receptor complexes. *Methods Mol Biol* 1056, 35-43.

Chiou, T.J., and Lin, S.I. (2011). Signaling network in sensing phosphate availability in plants. *Annu Rev Plant Biol* 62, 185-206.

Dai, X., Hayashi, K., Nozaki, H., Cheng, Y., and Zhao, Y. (2005). Genetic and chemical analyses of the action mechanisms of sirtinol in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3129-3134.

Daviere, J.M., and Achard, P. (2013). Gibberellin signaling in plants. *Development* 140, 1147-1151.

Daviere, J.M., Wild, M., Regnault, T., Baumberger, N., Eisler, H., Genschik, P., and Achard, P. (2014). Class I TCP-DELLA interactions in inflorescence shoot apex determine plant height. *Curr Biol* 24, 1923-1928.

de Felipe, P., Luke, G.A., Hughes, L.E., Gani, D., Halpin, C., and Ryan, M.D. (2006). E unum pluribus: multiple proteins from a self-processing polyprotein. *Trends Biotechnol* 24, 68-75.

de Lucas, M., Daviere, J.M., Rodriguez-Falcon, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J.M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blazquez, M.A., Titarenko, E., and Prat, S. (2008). A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* 451, 480-484.

De Rybel, B., Audenaert, D., Vert, G., Rozhon, W., Mayerhofer, J., Peelman, F., Coutuer, S., Denayer, T., Jansen, L., Nguyen, L., et al. (2009). Chemical inhibition of a subset of Arabidopsis thaliana GSK3-like kinases activates brassinosteroid signaling. *Chem Biol* 16, 594-604.

Dejonghe, W., Kuenen, S., Mylle, E., Vasileva, M., Keech, O., Viotti, C., Swerts, J., Fendrych, M., Ortiz-Morea, F.A., Mishev, K., et al. (2016). Mitochondrial uncouplers inhibit clathrin-mediated endocytosis largely through cytoplasmic acidification. *Nat Commun* 7, 11710.

Dejonghe, W., and Russinova, E. (2017). Plant Chemical Genetics: From Phenotype-based Screens to Synthetic Biology. *Plant Physiol*.

- Del Pozo, J.C., and Paz-Ares, J. (2016).** Plantas que producen más con menos. *SEBBM*, 17-20.
- Dill, A., and Sun, T. (2001).** Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 159, 777-785.
- Dill, A., Thomas, S.G., Hu, J., Steber, C.M., and Sun, T.P. (2004).** The *Arabidopsis* F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell* 16, 1392-1405.
- Duan, K., Yi, K., Dang, L., Huang, H., Wu, W., and Wu, P. (2008).** Characterization of a sub-family of *Arabidopsis* genes with the SPX domain reveals their diverse functions in plant tolerance to phosphorus starvation. *Plant J* 54, 965-975.
- Feng, S., Martinez, C., Gusmaroli, G., Wang, Y., Zhou, J., Wang, F., Chen, L., Yu, L., Iglesias-Pedraz, J.M., Kircher, S., et al. (2008).** Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* 451, 475-479.
- Fonseca, S., Rosado, A., Vaughan-Hirsch, J., Bishopp, A., and Chini, A. (2014).** Molecular locks and keys: the role of small molecules in phytohormone research. *Front Plant Sci* 5, 709.
- Franco-Zorrilla, J.M., Martin, A.C., Leyva, A., and Paz-Ares, J. (2005).** Interaction between phosphate-starvation, sugar, and cytokinin signaling in *Arabidopsis* and the roles of cytokinin receptors CRE1/AHK4 and AHK3. *Plant Physiol* 138, 847-857.
- Franco-Zorrilla, J.M., Martin, A.C., Solano, R., Rubio, V., Leyva, A., and Paz-Ares, J. (2002).** Mutations at CRE1 impair cytokinin-induced repression of phosphate starvation responses in *Arabidopsis*. *Plant J* 32, 353-360.
- Franco-Zorrilla, J.M., Valli, A., Todesco, M., Mateos, I., Puga, M.I., Rubio-Somoza, I., Leyva, A., Weigel, D., Garcia, J.A., and Paz-Ares, J. (2007).** Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat Genet* 39, 1033-1037.
- Frigerio, M., Alabadi, D., Perez-Gomez, J., Garcia-Carcel, L., Phillips, A.L., Hedden, P., and Blazquez, M.A. (2006).** Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 142, 553-563.
- Fu, H., ed. (2012).** *Chemical Genomics* (Cambridge University Press).

Gallego-Bartolome, J., Minguet, E.G., Marin, J.A., Prat, S., Blazquez, M.A., and Alabadi, D. (2010). Transcriptional diversification and functional conservation between DELLA proteins in Arabidopsis. *Mol Biol Evol* 27, 1247-1256.

Gallego-Bartolome, J., Kami, C., Fankhauser, C., Alabadi, D., and Blazquez, M.A. (2011). A hormonal regulatory module that provides flexibility to tropic responses. *Plant Physiol* 156, 1819-1825.

Gallego-Bartolome, J., Minguet, E.G., Grau-Enguix, F., Abbas, M., Locascio, A., Thomas, S.G., Alabadi, D., and Blazquez, M.A. (2012). Molecular mechanism for the interaction between gibberellin and brassinosteroid signaling pathways in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 13446-13451.

Gendron, J.M., Haque, A., Gendron, N., Chang, T., Asami, T., and Wang, Z.Y. (2008). Chemical genetic dissection of brassinosteroid-ethylene interaction. *Mol Plant* 1, 368-379.

Ghose, A.K., Viswanadhan, V.N., and Wendoloski, J.J. (1999). A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *J Comb Chem* 1, 55-68.

Gilbert, N. (2009). Environment: The disappearing nutrient. *Nature* 461, 716-718.

Gonzalez, E., Solano, R., Rubio, V., Leyva, A., and Paz-Ares, J. (2005). PHOSPHATE TRANSPORTER TRAFFIC FACILITATOR1 is a plant-specific SEC12-related protein that enables the endoplasmic reticulum exit of a high-affinity phosphate transporter in Arabidopsis. *Plant Cell* 17, 3500-3512.

Gund, P. (1977). *Prog Mol Subcell Biol* 5, 117-143.

Harberd, N.P., Belfield, E., and Yasumura, Y. (2009). The angiosperm gibberellin-GID1-DELLA growth regulatory mechanism: how an "inhibitor of an inhibitor" enables flexible response to fluctuating environments. *Plant Cell* 21, 1328-1339.

He, W., Brumos, J., Li, H., Ji, Y., Ke, M., Gong, X., Zeng, Q., Li, W., Zhang, X., An, F., et al. (2011). A small-molecule screen identifies L-kynurenine as a competitive inhibitor of TAA1/TAR activity in ethylene-directed auxin biosynthesis and root growth in Arabidopsis. *Plant Cell* 23, 3944-3960.

Hedden, P., and Phillips, A.L. (2000). Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci* 5, 523-530.

- Hedden, P., and Sponsel, V. (2015).** A Century of Gibberellin Research. *J Plant Growth Regul* 34, 740-760.
- Holbrook-Smith, D., Toh, S., Tsuchiya, Y., and McCourt, P. (2016).** Small-molecule antagonists of germination of the parasitic plant *Striga hermonthica*. *Nat Chem Biol* 12, 724-729.
- Hou, X., Lee, L.Y., Xia, K., Yan, Y., and Yu, H. (2010).** DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Dev Cell* 19, 884-894.
- Hu, Z., Vanderhaeghen, R., Cools, T., Wang, Y., De Clercq, I., Leroux, O., Nguyen, L., Belt, K., Millar, A.H., Audenaert, D., et al. (2016).** Mitochondrial Defects Confer Tolerance against Cellulose Deficiency. *Plant Cell*.
- Huang, J., Zhu, H., Haggarty, S.J., Spring, D.R., Hwang, H., Jin, F., Snyder, M., and Schreiber, S.L. (2004).** Finding new components of the target of rapamycin (TOR) signaling network through chemical genetics and proteome chips. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16594-16599.
- Huang, T., Harrar, Y., Lin, C., Reinhart, B., Newell, N.R., Talavera-Rauh, F., Hokin, S.A., Barton, M.K., and Kerstetter, R.A. (2014).** Arabidopsis KANADI1 acts as a transcriptional repressor by interacting with a specific cis-element and regulates auxin biosynthesis, transport, and signaling in opposition to HD-ZIPIII factors. *Plant Cell* 26, 246-262.
- Hussain, A., and Peng, J. (2003).** DELLA Proteins and GA Signalling in Arabidopsis. *Plant Growth Regul* 22, 134-140.
- Itoh, H., Ueguchi-Tanaka, M., Sato, Y., Ashikari, M., and Matsuoka, M. (2002).** The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei. *Plant Cell* 14, 57-70.
- Jaillais, Y., and Chory, J. (2010).** Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. *Nat Struct Mol Biol* 17, 642-645.
- Jain, A., Nagarajan, V.K., and Raghothama, K.G. (2012).** Transcriptional regulation of phosphate acquisition by higher plants. *Cell Mol Life Sci* 69, 3207-3224.
- Jeong, S., Kim, J.Y., Choi, H., Kim, H., Lee, I., Soh, M.S., Nam, H.G., Chang, Y.T., Lim, P.O., and Woo, H.R. (2015).** Rootin, a compound that inhibits root development through modulating PIN-mediated auxin distribution. *Plant Sci* 233, 116-126.

Karssen, C., Zagorski, S., Kepczynski, J., and Groot, S. (1989). Key Role for Endogenous Gibberellins in the Control of Seed Germination. *Annals of Botany* 63, 71-80.

Kerstetter, R.A., Bollman, K., Taylor, R.A., Bomblies, K., and Poethig, R.S. (2001). KANADI regulates organ polarity in Arabidopsis. *Nature* 411, 706-709.

Kim, T.H., Hauser, F., Ha, T., Xue, S., Bohmer, M., Nishimura, N., Munemasa, S., Hubbard, K., Peine, N., Lee, B.H., et al. (2011). Chemical genetics reveals negative regulation of abscisic acid signaling by a plant immune response pathway. *Curr Biol* 21, 990-997.

Lin, L.C., Hsu, J.H., and Wang, L.C. (2010a). Identification of novel inhibitors of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by chemical screening in Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem* 285, 33445-33456.

Lin, S.I., Santi, C., Jobet, E., Lacut, E., El Kholi, N., Karlowski, W.M., Verdeil, J.L., Breitler, J.C., Perin, C., Ko, S.S., et al. (2010b). Complex regulation of two target genes encoding SPX-MFS proteins by rice miR827 in response to phosphate starvation. *Plant Cell Physiol* 51, 2119-2131.

Lin, W.Y., Huang, T.K., and Chiou, T.J. (2013). Nitrogen limitation adaptation, a target of microRNA827, mediates degradation of plasma membrane-localized phosphate transporters to maintain phosphate homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell* 25, 4061-4074.

Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., and Feeney, P.J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 23, 3-25.

Locascio, A., Blazquez, M.A., and Alabadi, D. (2013a). Dynamic regulation of cortical microtubule organization through prefoldin-DELLA interaction. *Curr Biol* 23, 804-809.

Locascio, A., Blazquez, M.A., and Alabadi, D. (2013b). Genomic analysis of DELLA protein activity. *Plant Cell Physiol* 54, 1229-1237.

Lopez-Bucio, J., Hernandez-Abreu, E., Sanchez-Calderon, L., Nieto-Jacobo, M.F., Simpson, J., and Herrera-Estrella, L. (2002). Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the Arabidopsis root system. *Plant Physiol* 129, 244-256.

- Ma, Z., Baskin, T.I., Brown, K.M., and Lynch, J.P. (2003).** Regulation of root elongation under phosphorus stress involves changes in ethylene responsiveness. *Plant Physiol* *131*, 1381-1390.
- Marín-de la Rosa, N. (2014).** DELLA proteins as hubs in signaling networks in plants. In Departamento de Biotecnología (Universitat Politècnica de València).
- Marin-de la Rosa, N., Sotillo, B., Miskolczi, P., Gibbs, D.J., Vicente, J., Carbonero, P., Onate-Sanchez, L., Holdsworth, M.J., Bhalerao, R., Alabadi, D., et al. (2014).** Large-scale identification of gibberellin-related transcription factors defines group VII ETHYLENE RESPONSE FACTORS as functional DELLA partners. *Plant Physiol* *166*, 1022-1032.
- Marin-de la Rosa, N., Pfeiffer, A., Hill, K., Locascio, A., Bhalerao, R.P., Miskolczi, P., Gronlund, A.L., Wanchoo-Kohli, A., Thomas, S.G., Bennett, M.J., et al. (2015).** Genome Wide Binding Site Analysis Reveals Transcriptional Coactivation of Cytokinin-Responsive Genes by DELLA Proteins. *PLoS Genet* *11*, e1005337.
- Martin, A.C., del Pozo, J.C., Iglesias, J., Rubio, V., Solano, R., de La Pena, A., Leyva, A., and Paz-Ares, J. (2000).** Influence of cytokinins on the expression of phosphate starvation responsive genes in Arabidopsis. *Plant J* *24*, 559-567.
- McCourt, P., and Desveaux, D. (2010).** Plant chemical genetics. *New Phytol* *185*, 15-26.
- Meesters, C., Monig, T., Oeljeklaus, J., Krahn, D., Westfall, C.S., Hause, B., Jez, J.M., Kaiser, M., and Kombrink, E. (2014).** A chemical inhibitor of jasmonate signaling targets JAR1 in Arabidopsis thaliana. *Nat Chem Biol* *10*, 830-836.
- Misson, J., Raghothama, K.G., Jain, A., Jouhet, J., Block, M.A., Bligny, R., Ortet, P., Creff, A., Somerville, S., Rolland, N., et al. (2005).** A genome-wide transcriptional analysis using Arabidopsis thaliana Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 11934-11939.
- Mol, J., Jenkins, G., Schäfer, E., and Weiss, D. (1996).** Signal perception, transduction, and gene expression involved in anthocyanin. *Crit Rev Plant Sci*, 525-557.
- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W.H., Liu, Y.X., Hwang, I., Jones, T., and Sheen, J. (2003).** Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* *300*, 332-336.

- Murase, K., Hirano, Y., Sun, T.P., and Hakoshima, T. (2008).** Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* 456, 459-463.
- Nishimura, T., Hayashi, K., Suzuki, H., Gyohda, A., Takaoka, C., Sakaguchi, Y., Matsumoto, S., Kasahara, H., Sakai, T., Kato, J., et al. (2014).** Yucasin is a potent inhibitor of YUCCA, a key enzyme in auxin biosynthesis. *Plant J* 77, 352-366.
- Niu, Y.F., Chai, R.S., Jin, G.L., Wang, H., Tang, C.X., and Zhang, Y.S. (2013).** Responses of root architecture development to low phosphorus availability: a review. *Ann Bot* 112, 391-408.
- Noutoshi, Y., Okazaki, M., Kida, T., Nishina, Y., Morishita, Y., Ogawa, T., Suzuki, H., Shibata, D., Jikumaru, Y., Hanada, A., et al. (2012).** Novel plant immune-priming compounds identified via high-throughput chemical screening target salicylic acid glucosyltransferases in Arabidopsis. *Plant Cell* 24, 3795-3804.
- Oh, E., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Bae, G., Chung, W.I., and Choi, G. (2006).** Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in Arabidopsis. *Plant J* 47, 124-139.
- Okamoto, M., Peterson, F.C., Defries, A., Park, S.Y., Endo, A., Nambara, E., Volkman, B.F., and Cutler, S.R. (2013).** Activation of dimeric ABA receptors elicits guard cell closure, ABA-regulated gene expression, and drought tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 12132-12137.
- Park, S.Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D.R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T.F., et al. (2009).** Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324, 1068-1071.
- Peng, J., Carol, P., Richards, D.E., King, K.E., Cowling, R.J., Murphy, G.P., and Harberd, N.P. (1997).** The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev* 11, 3194-3205.
- Peng, J., and Harberd, N.P. (1997).** Gibberellin deficiency and response mutations suppress the stem elongation phenotype of phytochrome-deficient mutants of Arabidopsis. *Plant Physiol* 113, 1051-1058.
- Peng, J., Richards, D.E., Hartley, N.M., Murphy, G.P., Devos, K.M., Flintham, J.E., Beales, J., Fish, L.J., Worland, A.J., Pelica, F., et al. (1999).** 'Green

revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* *400*, 256-261.

Peret, B., Clement, M., Nussaume, L., and Desnos, T. (2011). Root developmental adaptation to phosphate starvation: better safe than sorry. *Trends Plant Sci* *16*, 442-450.

Phillips, A.L., Ward, D.A., Uknes, S., Appleford, N.E., Lange, T., Huttly, A.K., Gaskin, P., Graebe, J.E., and Hedden, P. (1995). Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* *108*, 1049-1057.

Phinney, B.O., West, C.A., Ritzel, M., and Neely, P.M. (1957). Evidence for "Gibberellin-Like" Substances from Flowering Plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* *43*, 398-404.

Poretska, O., Yang, S., Pitorre, D., Rozhon, W., Zwerger, K., Uribe, M.C., May, S., McCourt, P., Poppenberger, B., and Sieberer, T. (2016). The Small Molecule Hyperphyllin Enhances Leaf Formation Rate and Mimics Shoot Meristem Integrity Defects Associated with AMP1 Deficiency. *Plant Physiol* *171*, 1277-1290.

Puga, M.I., Mateos, I., Charukesi, R., Wang, Z., Franco-Zorrilla, J.M., de Lorenzo, L., Irigoyen, M.L., Masiero, S., Bustos, R., Rodriguez, J., et al. (2014). SPX1 is a phosphate-dependent inhibitor of Phosphate Starvation Response 1 in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, 14947-14952.

Radley, M. (1956). Occurrence of substances similar to gibberellic acid in higher plants. *Nature* *178*, 1070-1071.

Resentini, F., Felipo-Benavent, A., Colombo, L., Blazquez, M.A., Alabadi, D., and Masiero, S. (2015). TCP14 and TCP15 mediate the promotion of seed germination by gibberellins in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* *8*, 482-485.

Ribot, C., Zimmerli, C., Farmer, E.E., Reymond, P., and Poirier, Y. (2008). Induction of the *Arabidopsis* PHO1;H10 gene by 12-oxo-phytodienoic acid but not jasmonic acid via a CORONATINE INSENSITIVE1-dependent pathway. *Plant Physiol* *147*, 696-706.

Robert, S., Chary, S.N., Drakakaki, G., Li, S., Yang, Z., Raikhel, N.V., and Hicks, G.R. (2008). Endosidin1 defines a compartment involved in endocytosis of the brassinosteroid receptor BRI1 and the auxin transporters PIN2 and AUX1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 8464-8469.

Rogers, D.J., and Tanimoto, T.T. (1960). A Computer Program for Classifying Plants. *Science* *132*, 1115-1118.

Rojas-Pierce, M., Titapiwatanakun, B., Sohn, E.J., Fang, F., Larive, C.K., Blakeslee, J., Cheng, Y., Cutler, S.R., Peer, W.A., Murphy, A.S., et al. (2007). Arabidopsis P-glycoprotein19 participates in the inhibition of gravitropism by gravacin. *Chem Biol* *14*, 1366-1376.

Rouached, H., Arpat, A.B., and Poirier, Y. (2010). Regulation of phosphate starvation responses in plants: signaling players and cross-talks. *Mol Plant* *3*, 288-299.

Rubio, V., Bustos, R., Irigoyen, M.L., Cardona-Lopez, X., Rojas-Triana, M., and Paz-Ares, J. (2009). Plant hormones and nutrient signaling. *Plant Mol Biol* *69*, 361-373.

Rubio, V., Linhares, F., Solano, R., Martin, A.C., Iglesias, J., Leyva, A., and Paz-Ares, J. (2001). A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev* *15*, 2122-2133.

Sakai, Y., Sugano, S., Kawase, T., Shirakawa, M., Imai, Y., Kawamoto, Y., Sugiyama, H., Nakagawa, T., Hara-Nishimura, I., and Shimada, T. (2017). Inhibition of cell polarity establishment in stomatal asymmetric cell division using the chemical compound bubblin. *Development* *145*, 458.

Savaldi-Goldstein, S., Baiga, T.J., Pojer, F., Dabi, T., Butterfield, C., Parry, G., Santner, A., Dharmasiri, N., Tao, Y., Estelle, M., et al. (2008). New auxin analogs with growth-promoting effects in intact plants reveal a chemical strategy to improve hormone delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 15190-15195.

Schmitz, R.Y., and Skoog, F. (1970). The use of dimethylsulfoxide as a solvent in the tobacco bioassay for cytokinins. *Plant Physiol* *45*, 537-538.

Schmunk, L.J. (2014). Interrogation of gibberellin signalling with DELLA-based synthetic biology tools. In Faculty of Biology / Centre for Biological Signalling Studies BIOSS (Albert Ludwigs University of Freiburg).

Schomburg, F.M., Bizzell, C.M., Lee, D.J., Zeevaart, J.A., and Amasino, R.M. (2003). Overexpression of a novel class of gibberellin 2-oxidases decreases gibberellin levels and creates dwarf plants. *Plant Cell* *15*, 151-163.

- Serrano, M., Kombrink, E., and Meesters, C. (2015).** Considerations for designing chemical screening strategies in plant biology. *Front Plant Sci* 6, 131.
- Serrano, M., Robatzek, S., Torres, M., Kombrink, E., Somssich, I.E., Robinson, M., and Schulze-Lefert, P. (2007).** Chemical interference of pathogen-associated molecular pattern-triggered immune responses in Arabidopsis reveals a potential role for fatty-acid synthase type II complex-derived lipid signals. *J Biol Chem* 282, 6803-6811.
- Silverstone, A.L., Ciampaglio, C.N., and Sun, T. (1998).** The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* 10, 155-169.
- Silverstone, A.L., Jung, H.S., Dill, A., Kawaide, H., Kamiya, Y., and Sun, T.P. (2001).** Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in Arabidopsis. *Plant Cell* 13, 1555-1566.
- Song, L., and Liu, D. (2015).** Ethylene and plant responses to phosphate deficiency. *Front Plant Sci* 6, 796.
- Sponsel, V. (2006).** Gibberellin Biosynthesis. In *Plant Physiology*, L. Taiz, and E. Zeiger, eds.
- Stavang, J.A., Gallego-Bartolome, J., Gomez, M.D., Yoshida, S., Asami, T., Olsen, J.E., Garcia-Martinez, J.L., Alabadi, D., and Blazquez, M.A. (2009).** Hormonal regulation of temperature-induced growth in Arabidopsis. *Plant J* 60, 589-601.
- Steen, I. (1998).** Phosphorus availability in the 21st century: Management of a nonrenewable resource. *Phosphorus & Potassium*, 25-31.
- Sun, T.P., and Gubler, F. (2004).** Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* 55, 197-223.
- Surpin, M., Rojas-Pierce, M., Carter, C., Hicks, G.R., Vasquez, J., and Raikhel, N.V. (2005).** The power of chemical genomics to study the link between endomembrane system components and the gravitropic response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4902-4907.
- Thomas, S.G., Phillips, A.L., and Hedden, P. (1999).** Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2- oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4698-4703.

Tice, C.M. (2001). Selecting the right compounds for screening: does Lipinski's Rule of 5 for pharmaceuticals apply to agrochemicals? *Pest Manag Sci* 57, 3-16.

Toth, R., and van der Hoorn, R.A. (2010). Emerging principles in plant chemical genetics. *Trends Plant Sci* 15, 81-88.

Tsuchiya, Y., Vidaurre, D., Toh, S., Hanada, A., Nambara, E., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., and McCourt, P. (2010). A small-molecule screen identifies new functions for the plant hormone strigolactone. *Nat Chem Biol* 6, 741-749.

Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T.Y., Hsing, Y.I., Kitano, H., Yamaguchi, I., et al. (2005). GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* 437, 693-698.

Vidal, M., and Legrain, P. (1999). Yeast forward and reverse 'n'-hybrid systems. *Nucleic Acids Res* 27, 919-929.

Wang, Y., Secco, D., and Poirier, Y. (2008). Characterization of the PHO1 gene family and the responses to phosphate deficiency of *Physcomitrella patens*. *Plant Physiol* 146, 646-656.

Wend, S., Dal Bosco, C., Kampf, M.M., Ren, F., Palme, K., Weber, W., Dovzhenko, A., and Zurbriggen, M.D. (2013). A quantitative ratiometric sensor for time-resolved analysis of auxin dynamics. *Sci Rep* 3, 2052.

Xu, Y.L., Li, L., Gage, D.A., and Zeevaart, J.A. (1999). Feedback regulation of GA5 expression and metabolic engineering of gibberellin levels in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11, 927-936.

Yamagami, A., Nakazawa, M., Matsui, M., Tujimoto, M., Sakuta, M., Asami, T., and Nakano, T. (2009). Chemical genetics reveal the novel transmembrane protein BIL4, which mediates plant cell elongation in brassinosteroid signaling. *Biosci Biotechnol Biochem* 73, 415-421.

Yamaguchi, S. (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol* 59, 225-251.

Yamaguchi, S., Smith, M.W., Brown, R.G., Kamiya, Y., and Sun, T. (1998). Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3beta-hydroxylase genes in germinating *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell* 10, 2115-2126.

Yamauchi, Y., Ogawa, M., Kuwahara, A., Hanada, A., Kamiya, Y., and Yamaguchi, S. (2004). Activation of gibberellin biosynthesis and response

pathways by low temperature during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell* 16, 367-378.

Yamauchi, Y., Takeda-Kamiya, N., Hanada, A., Ogawa, M., Kuwahara, A., Seo, M., Kamiya, Y., and Yamaguchi, S. (2007). Contribution of gibberellin deactivation by AtGA2ox2 to the suppression of germination of dark-imbibed *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell Physiol* 48, 555-561.

Ye, Y., Gong, Z., Lu, X., Miao, D., Shi, J., Lu, J., and Zhao, Y. (2016). Germostatin resistance locus 1 encodes a PHD finger protein involved in auxin-mediated seed dormancy and germination. *Plant J* 85, 3-15.

Ye, Y.J., Zhou, L., Liu, X., Liu, H., Li, D., Cao, M., Chen, H., Xu, L., Zhu, J., and Zhao, Y. (2017). A novel chemical inhibitor of ABA signaling targets all ABA receptors. *Plant Physiol*.

Zhang, C., Brown, M.Q., van de Ven, W., Zhang, Z.M., Wu, B., Young, M.C., Synek, L., Borchardt, D., Harrison, R., Pan, S., et al. (2016). Endosidin2 targets conserved exocyst complex subunit EXO70 to inhibit exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E41-50.

Zhang, Z., Liao, H., and Lucas, W.J. (2014). Molecular mechanisms underlying phosphate sensing, signaling, and adaptation in plants. *J Integr Plant Biol* 56, 192-220.

Zhao, Y., Chow, T.F., Puckrin, R.S., Alfred, S.E., Korir, A.K., Larive, C.K., and Cutler, S.R. (2007). Chemical genetic interrogation of natural variation uncovers a molecule that is glycoactivated. *Nat Chem Biol* 3, 716-721.

Zhao, Y., Dai, X., Blackwell, H.E., Schreiber, S.L., and Chory, J. (2003). SIR1, an upstream component in auxin signaling identified by chemical genetics. *Science* 301, 1107-1110.

Zheng, W., Zhai, Q., Sun, J., Li, C.B., Zhang, L., Li, H., Zhang, X., Li, S., Xu, Y., Jiang, H., et al. (2006). Bestatin, an inhibitor of aminopeptidases, provides a chemical genetics approach to dissect jasmonate signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 141, 1400-1413.