



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Caracterización de compuestos químicos agonistas
de los receptores de ABA, en las plantas modelo
Arabidopsis thaliana y *Setaria viridis*

Trabajo Fin de Máster en

Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

Realizado por

Daniel Franco Aragón

Dirigido por

Dr. Jorge Lozano Juste

Dr. Pedro L. Rodríguez Egea

Valencia, Enero de 2020

ABREVIATURAS

ABA: Ácido abscísico

CO₂: Dióxido de carbono

PYR1: Pyrabactin resistance1

PYL: PYR1-LIKE

RCAR: Regulatory components of ABA receptors

PP2C: Protein phosphatase 2C

TaPYL: *Triticum aestivum* PYL

OsPYL: *Oryza sativa* PYL

BdPYL: *Brachypodium distachyon* PYL

Kd: Constante de disociación

μM: micromolar

nM: nanomolar

ABI1-ABI2: Hypersensitive to ABA1-2

HAI1-3: Highly induced by ABA

AHG1: ABA Hipersensitive in Germination

SnRK2: Sucrose non- fermenting 1- related protein kinases family 2

Ser: serina

SLAC: Malate slow-type anion channel

QB: quinabactina

Col-0: Columbia 0

Zb: Zeabactina

Zb-o: Zeabactina-o

Zb-m: Zeabactina-m

Cb: Cyanabactina

dNHAB1: Hypersensitive to ABA

DMSO: Dimetilsulfóxido

MES: ácido 2-etanosulfónico

μmol m⁻² s⁻¹: micromoles por metro cuadrado por segundo

112458: Séxtuple mutante en los receptores de Arabidopsis PYR1, PYL1,PYL2,PYL4,PYL5,PYL8; insensible al ABA

MS: Medio Murashige Skoog

pNPP: *para*-nitrofenil-fosfato

RESUMEN

La sequía es el factor que mayores pérdidas económicas causa en las explotaciones agrícolas. Las plantas, para hacer frente a estas condiciones hostiles, han desarrollado diversos sistemas de resistencia que les permite protegerse de la escasez de agua. El Ácido abscísico (ABA) es una fitohormona que juega un rol esencial en la regulación del cierre estomático. Su aplicación, reduce la transpiración de las plantas, evitando la pérdida de agua. El alto coste de síntesis y la fotolabilidad del ABA dificultan su aplicación en campo en forma de aerosol por lo que durante los últimos años han surgido nuevas estrategias basadas en el desarrollo de agroquímicos que permiten mimetizar el efecto del ABA y reducir los daños causados por la sequía. El presente TFM pretende caracterizar compuestos agonistas de los receptores de ABA y comparar su efecto en dos plantas modelo *Arabidopsis thaliana* y *Setaria viridis*. Nuestros resultados demuestran que cada compuesto tiene cierta preferencia por la activación de un conjunto determinado de receptores PYR/PYL/RCAR en las diferencias especies estudiadas. Sin embargo, esta activación no siempre se correlaciona con una mejora en la resistencia a la sequía. Mientras que en *Arabidopsis thaliana* los compuestos quinabactina, AMF4 y zeabactina-m consiguen reducir significativamente la transpiración y aumentar la resistencia a la sequía, en *Setaria viridis* ninguno de los compuestos estudiados consiguen provocar una resistencia mayor a la sequía, a excepción del ABA. Sin embargo, los compuestos agonistas son capaces de activar los receptores de ABA de *Setaria viridis in vitro*. Estos datos nos sugieren la existencia de un mecanismo que regula e inhibe la respuesta causada por estos agroquímicos. Nuestro trabajo demuestra que la efectividad de los compuestos agonistas diseñados para mejorar la resistencia a la sequía, es variable en función de la especie estudiada. Y pone de manifiesto una diferencia importante de la actividad de estos ligandos sintéticos entre plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas.

ABSTRACT

Drought is the factor that causes the biggest economic losses in agriculture. To deal with these hostile conditions, plants have developed some resistance mechanisms that protect themselves from water shortage. Abscisic acid (ABA) is a phytohormone that plays an essential role in the regulation of stomatal closure. Its application reduces the transpiration of plants, preventing water loss. The high cost of synthesis and the photolability of ABA make it difficult to be applied in the field. New strategies have emerged based on the development of agrochemicals that mimic the effect of ABA, thus reducing the damage caused by drought. The objective of this work is to characterize synthetic agonist of ABA receptors and compare their effect on two model plants *Arabidopsis thaliana* and *Setaria viridis*. Our results show that each agonist has a certain preference for the activation of a specific set of PYR / PYL / RCAR receptors in the different species studied. However, this activation does not always correlate with an improvement in drought resistance. While in *Arabidopsis thaliana* the compounds quinabactin, AMF4 and zeabactin-m reduce transpiration and increase drought resistance, in *Setaria viridis* none of these compounds can improve drought resistance, with the exception of ABA. However, these agonist compounds can activate *Setaria viridis* ABA receptors *in vitro*. These data suggest the existence of a mechanism that regulates and inhibits the response caused by these agrochemicals. Our work demonstrates that the effectiveness of agonist compounds designed to improve drought resistance is plant specie specific. And it shows an important difference between the activity of these synthetic ligands in eudicots and monocots.

Palabras clave

Agroquímicos, sequía, ácido abscísico, receptor, agonista, termoimagen, transpiración, *Arabidopsis thaliana*, *Setaria viridis*.

INDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	5
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	11
OBJETIVOS	17
RESULTADOS	19
Ensayos de germinación.....	19
Ensayos de inhibición de actividad de la fosfatasa	22
Ensayos de crecimiento de raíz.....	25
Termo-imagen.....	28
Puesta a punto del método	28
Efecto de los diferentes agonistas de ABA en la transpiración	30
Ensayos de sequía	33
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	45
MATERIAL Y MÉTODOS	47
Análisis de termo-imagen.	47
Ensayos de crecimiento de raíz.....	48
Ensayos de germinación.....	49
Ensayos de actividad fosfatasa PP2C <i>in vitro</i>	49
Ensayos de sequía	50
BIBLIOGRAFÍA	51
ANEXO	44

INTRODUCCIÓN

La sequía es un factor que limita la producción de los cultivos y ocasiona las mayores pérdidas económicas en el sector hortofrutícola (Daryanto et al., 2016). El aumento de las temperaturas y el reparto desigual de las precipitaciones ocasionado por el cambio climático, causan grandes pérdidas en la producción de alimentos esenciales como el maíz o el trigo (Nuccio et al., 2018). Para hacer frente a la demanda de alimento mundial, se calcula que para el año 2050 se necesitará un incremento del 60%-110% de la producción en la agricultura global (Ray et al., 2013).

Las plantas son organismos que, debido a su naturaleza sésil, necesitan adaptarse al medio para sobrevivir. Sin embargo, el entorno en donde crecen no presenta en algunos casos, las condiciones idóneas para que puedan desarrollarse y producir frutos con un rendimiento óptimo. Debido a esta limitación de movimiento, las plantas han desarrollado diversos mecanismos que les permiten sobrevivir en ambientes donde el agua y la temperatura no son las adecuadas. (Forestan et al., 2020) El ácido abscísico (ABA) es un sesquiterpenoide quiral derivado del β -caroteno descubierto en 1960, clasificado como fitohormona reguladora del crecimiento y principal inductor de las respuestas fisiológicas ante episodios de estrés abiótico. Esta hormona vegetal, que juega un rol esencial en la fisiología de las plantas, regula aspectos como el desarrollo del embrión, la elongación de las raíces, otorga resistencia a la deshidratación e induce un estadio de dormancia en las semillas, entre otros. En las hojas, está implicada en el cierre de los estomas en condiciones de sequía, salinidad o estrés osmótico o cuando la planta no requiere fijar CO₂ (Cutler et al., 2010).

La señalización por ABA esta orquestada por 3 elementos esenciales. Los receptores canónicos del ABA son los denominados PYRABACTIN RESISTANCE1 (PYR1) / PYR1-LIKE (PYL) / REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTORS (RCAR) y su mayor rol en las plantas es la inhibición de un grupo de proteínas fosfatasa 2C (PP2Cs) (Ma et al., 2009; Park et al., 2009). Esta familia de proteínas solubles, en *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) consta de 14 miembros divididos en tres grupos o clados dependiendo si son

monoméricos o diméricos. Los receptores monoméricos (PYL4-6 pertenecientes al clado II y PYL7-PYL10 al clado I) son el grupo con mayor afinidad por el ABA. Esta propiedad intrínseca del receptor permite su aprovechamiento con fines biotecnológicos, ya que se ha reportado en algunos trabajos que la sobreexpresión de los receptores PYL5 y PYL4 de forma individual produce una mejor tolerancia a la sequía. En *Arabidopsis*, la sobreexpresión del receptor monomérico PYL5 genera plantas más resistentes a la sequía (Santiago et al., 2009) pero conlleva una penalización en el crecimiento. Sin embargo, la sobreexpresión del receptor de trigo TaPYL4 produce plantas más resistentes a la sequía sin un efecto negativo en el crecimiento o en la producción de las plantas, siendo una herramienta biotecnológica desarrollada recientemente (Mega et al., 2019). Por otro lado, los receptores diméricos pertenecen a la subfamilia del clado III, son menos afines al ABA ya que antes de unirse deben escindir el dímero y posteriormente interaccionar con las PP2Cs y además tienen una Kd de más de 50 μ M de ABA. Aunque esta afinidad se refuerza mucho, pasando a una Kd nM cuando las PP2C están presentes. Actualmente no se ha conseguido llevar a cabo una estrategia que permita mejorar el uso de agua mediante la sobreexpresión de receptores diméricos.

No todas las plantas poseen 14 receptores PYL/PYR/RCAR, sino que el número es variable según la especie estudiada. En *Oryza sativa*, por ejemplo, el número de receptores es de 12 miembros divididos también en 3 clados (OsPYL1-OsPYL10) *Brachypodium distachyon* consta de 9 receptores (BdPYL1-BdPYL9) (He et al., 2014; Pri-Tal et al., 2017), y *Setaria viridis* presenta 8 miembros (SvPYL1-SvPYL8). Además del papel que tienen los receptores en el cierre de estomas, en los últimos años se ha descrito la implicación de algunos receptores en determinados procesos. Por ejemplo, el receptor PYL8 es importante en el crecimiento de la raíz (Antoni et al., 2012), en concreto en el hidrotropismo, donde la señalización en el cortex juega un papel esencial (Dietrich et al., 2017). Además, este receptor tiene una regulación singular ya que se acumula tras unir ABA y es capaz de moverse entre las capas de la raíz para regular su crecimiento (Belda-Palazon et al., 2018). Por otro lado, el receptor PYL9 parece que está relacionado con el

proceso de senescencia de las hojas en condiciones de poca luz ya que plantas que sobreexpresan este receptor tienen una senescencia acelerada (Seo and Marion-Poll, 2019).

Otro elemento esencial en la ruta de señalización del ABA son las proteínas fosfatasa PP2C, del clado A, presentes tanto en animales como en plantas. La fosforilación y desfosforilación es un mecanismo de señalización que permite a las fosfatasas la comunicación de los estímulos procedentes del medio exterior hasta el interior celular e instrumentar una respuesta concreta. El clado A PP2C está compuesto por las proteínas ABA INSENSITIVE 1 y 2 (ABI1 y ABI2), HYPERSENSITIVE TO ABA 1 y 2 (HAB1 y HAB2), HIGHLY INDUCED BY ABA (HAI1-3), ABA HIPERSENSITIVE IN GERMINATION (AHG1) y la PROTEIN PHOSPHATASE 2CA/ABA-HYPERSENSITIVE GERMINATION 3 (PP2CA/AHG3). Estas son proteínas cuya función es la inhibición de una subclase de proteínas quinasas (SnRK2) pertenecientes a la subclase III. Estas quinasas son las activadoras en último término de los factores de transcripción de respuesta a ABA y de los canales que controlan el turgor de las células guarda. La inhibición de estas quinasas ocurre por la interacción con las fosfatasas, bloqueando físicamente el sitio activo y desfosforilando un residuo específico de Ser del "activation loop" (Rodríguez et al., 2019).

La percepción intracelular del ABA es un mecanismo conocido. En ausencia de ABA las fosfatasas PP2Cs se encuentran regulando negativamente las SnRK2 y por lo tanto no puede llevarse a cabo la activación de los factores de transcripción ABRE y la regulación de los canales de transporte de K^+ , Cl^- y el canal de malato slow-type anion channel (SLAC1) que permite regular la turgencia de las células guarda (Min et al., 2019). Por el contrario, cuando el ABA se encuentra unido a los receptores PYR/PYL/RCAR se forma el complejo receptor, ABA y PP2C, liberando a las SnRK2 del bloqueo que las PP2C ejercen, autofosforilándose y activando los factores de transcripción de tipo ABFs y los canales iónicos, activando la respuesta a ABA (Cutler et al., 2010).

Los poros estomáticos son estructuras localizadas en la epidermis de las plantas. Su función es el intercambio gaseoso y el control de la pérdida de agua durante la fotosíntesis a través de la expansión o encogimiento osmótico

de las células guarda que rodean estos poros. Estas células pueden actuar por la presencia de señales exógenas como la sequía o endógenas como es la síntesis de ABA. Durante periodos prolongados de sequía las plantas sintetizan ABA que en las células guarda permite cerrar los estomas a través de la movilización de potasio, aniones y de la eliminación de osmolitos orgánicos evitando así la deshidratación (Mustilli et al., 2002).

A lo largo de la evolución las plantas terrestres han modificado la vía en la que realizan la fotosíntesis dando lugar a la clasificación actual. Las plantas C3 pertenecen al sistema más conservado y primitivo del cual divergen las plantas C4 y CAM (Kelly, 2019). Las plantas C3 son las más abundantes y por lo tanto la mayor parte de los estudios relacionados con la fotosíntesis se ha llevado a cabo en estas plantas, dejando de lado las plantas C4 y CAM, menos estudiadas. La mayoría de plantas C4 realizan la fotosíntesis en dos tipos celulares diferentes. Mientras que las reacciones dependientes de luz se realizan en las células del mesófilo, las reacciones no dependientes como el Ciclo de Calvin se realiza en las células del haz vascular. Las plantas C4 primero deben captar una molécula de CO₂ en las células del mesófilo que mediante la enzima PEP carboxilasa se transforma en oxalacetato y posteriormente en malato. A continuación, este producto se desplaza hasta las células del haz vascular donde el malato libera una molécula de CO₂ y a través del ciclo de Calvin mediante la RUBISCO da lugar a los azúcares que la planta utiliza para su desarrollo (Kelly, 2019).

Las plantas C4, por lo tanto, se caracterizan por la fijación de una molécula de 4 carbonos mientras que las plantas C3 usan una molécula de 3 carbonos. Las plantas C4 pueden asimilar una mayor cantidad de CO₂ que la de plantas C3 y para ello, requieren de una mayor eficiencia en el uso del agua y nitrógeno. Para maximizar el uso del agua, las plantas C4 evolucionaron cambiando su morfología para adaptarse a un ambiente rico en CO₂ y a climas secos con temperaturas cálidas (Rudall et al., 2017).

Setaria viridis es una planta C4 monocotiledónea que pertenece a la familia *Panicoidea*. Tiene un ciclo de vida rápido que permite realizar estudios genéticos en un tiempo relativamente corto. Durante la fotosíntesis fija 4 carbonos a través de un subtipo de enzima NADP-málico, lo que convierte a

esta planta en un modelo de estudio para monocotiledóneas con metabolismo C4 como el maíz, la caña de azúcar o el sorgo (Brutnell et al., 2010). La morfología y distribución de los estomas de las plantas monocotiledóneas son diferentes a los de las plantas dicotiledóneas. Los estomas de las plantas monocotiledóneas están rodeados de un par de células guarda en forma de mancuerna y un número variable de células subsidiarias que limitan con las guarda. Su distribución es lineal-paralela y su posición es tanto en el haz como en el envés de la hoja. Por el contrario, los estomas de las plantas dicotiledóneas no poseen células subsidiarias y su distribución es aleatoria sobre el haz y el envés de la hoja (Rudall et al., 2017). Esta distribución de los estomas de plantas monocotiledóneas y la fijación de una molécula de cuatro carbonos, repercute en una mayor frecuencia de transpiración, una mayor fijación de CO₂ y en consecuencia un crecimiento más rápido y eficiente que conlleva un requerimiento de agua. Para abordar este problema, ya que muchos de los cultivos de interés agronómico son plantas C4, se ha desarrollado una estrategia basada en el uso de compuestos químicos que puedan unirse a los receptores PYR/PYL/RCAR del ABA y conferir resistencia al estrés por sequía al reducir la tasa de transpiración. La aplicación directa del ABA sobre las plantas en forma de aerosol tiene limitaciones debido a la complejidad en sintetizar la molécula, su rápido catabolismo y fotolabilidad (Helander et al., 2016). Es por eso que surge la necesidad de diseñar compuestos agonistas del ABA que permitan solventar los inconvenientes que tiene la aplicación exógena de ABA. El primer agonista de los receptores de ABA, llamado pyrabactina fue identificado tras *screening* de una librería de pequeñas moléculas, demostrando que esta molécula posee efecto en la inhibición de la germinación. Posteriormente, otro compuesto llamado quinabactina fue aislado en ensayos de doble híbrido usando una librería de pequeñas moléculas. Quinabactina activa los receptores PYR1, PYL1, PYL2, PYL3, y PYL5 *in vitro* en ensayos de actividad de la fosfatasa HAB1. También tiene efecto *in vivo* sobre la germinación y el cierre de estomas (Okamoto et al., 2013). Ambos compuestos tienen anillos bencénicos a los extremos conectados por un linker que presenta una sulfonamida.. Posteriormente y con la finalidad de encontrar compuestos con mayor afinidad y potencia surge el diseño racional de agonistas como AMF4 que parte del esqueleto de

quinabactina pero en el anillo 4-methylbenzyl posee 4 átomos de flúor que le permite unirse a los receptores mediante puentes de hidrogeno y otras interacciones con los residuos de los receptores PYR1, PYL1, PYL2, PYL3, PYL5 y PYL7 (Cao et al., 2017). Aplicando esta estrategia y con la ayuda de químicos orgánicos, surge también cyanabactina cuyo diseño racional proporcionó una interacción con los receptores de la subfamilia IIIA en una concentración inferior (Vaidya et al., 2017) a la de los agonistas descritos anteriormente Sin embargo, todos los estudios realizados hasta la fecha con estos agonistas se ha llevado a cabo sobre plantas dicotiledóneas.

El presente TFM tiene como objetivo caracterizar moléculas sintéticas agonistas del ABA descritas, y otras nuevas moléculas denominadas zeabactina, zeabactina-o y zeabactina-m ,obtenidas a través de un “screening” con los receptores de *Zea mays*, realizado por el director de este trabajo, a través de ensayos moleculares, fisiológicos y bioquímicos, en una especie dicotiledónea (*Arabidopsis thaliana*) y una monocotiledónea (*Setaria viridis*) con el objetivo de caracterizar el efecto de estas moléculas y describir si existe alguna diferencia entre el comportamiento de las mismas entre plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas.

OBJETIVOS

La finalidad de este TFM es caracterizar la actividad *in vitro* e *in vivo* de compuestos agonistas del ABA en dos plantas modelo, una dicotiledónea (*Arabidopsis thaliana*) y una monocotiledónea (*Setaria viridis*) de tal forma que los objetivos planteados para este trabajo son:

- Establecer las condiciones experimentales para poder analizar el efecto del ABA en el crecimiento de las raíces de *Setaria viridis* y utilizar este método para caracterizar la actividad de compuestos agonistas del ABA *in vivo*.
- Identificar el rango de actividad de los agonistas sobre los receptores de ABA de *Setaria viridis*.
- Poner a punto las condiciones para estudiar la transpiración de *Setaria viridis* usando una cámara de infrarojos. Analizar la respuesta a ABA y a los diferentes agonistas en *Arabidopsis thaliana* y en *Setaria viridis* usando esta aproximación.
- Averiguar si *Arabidopsis thaliana* y *Setaria viridis* pueden ser protegidas de la sequia con estos agonistas de los receptores de ABA.

RESULTADOS

Ensayos de germinación

Debido a que los compuestos usados en este trabajo han sido sintetizados *de novo* por colaboradores de la Universidad de Santiago de Compostela, el primer paso es comprobar que su síntesis es correcta para así descartar los compuestos que no fueran bioactivos o estuvieran mal sintetizados. Para ello, realizamos ensayos de germinación, llevados a cabo tanto con semillas silvestres de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) como del mutante *112458* insensible a ABA (Gonzalez-Guzman et al., 2012). Así pudimos determinar si los compuestos agonistas (**Figura 1**) reprimen la germinación por la vía de señalización del ABA. En estos experimentos encontramos que a una concentración de $1\mu\text{M}$ (**Figura 2**) se inhibe parcialmente la germinación con los compuestos quinabactina, AMF4 y zeabactina-m de manera similar al efecto que tiene el ABA y tal como estaba descrito anteriormente (Cao et al., 2017; Okamoto et al., 2013).

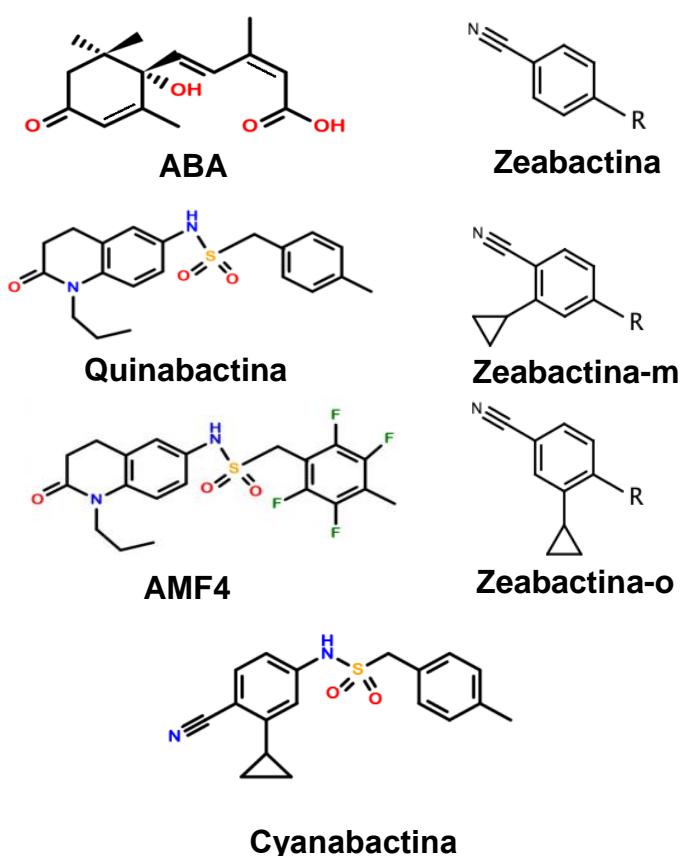
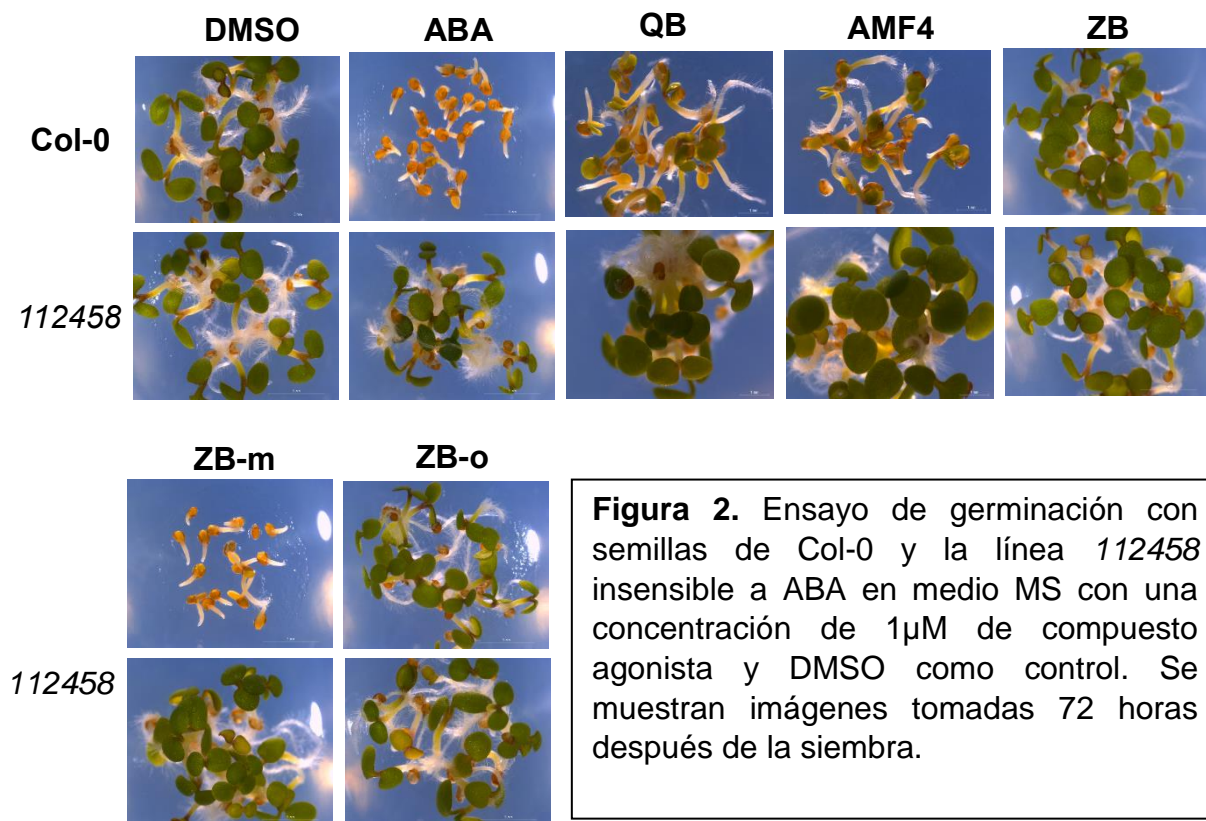


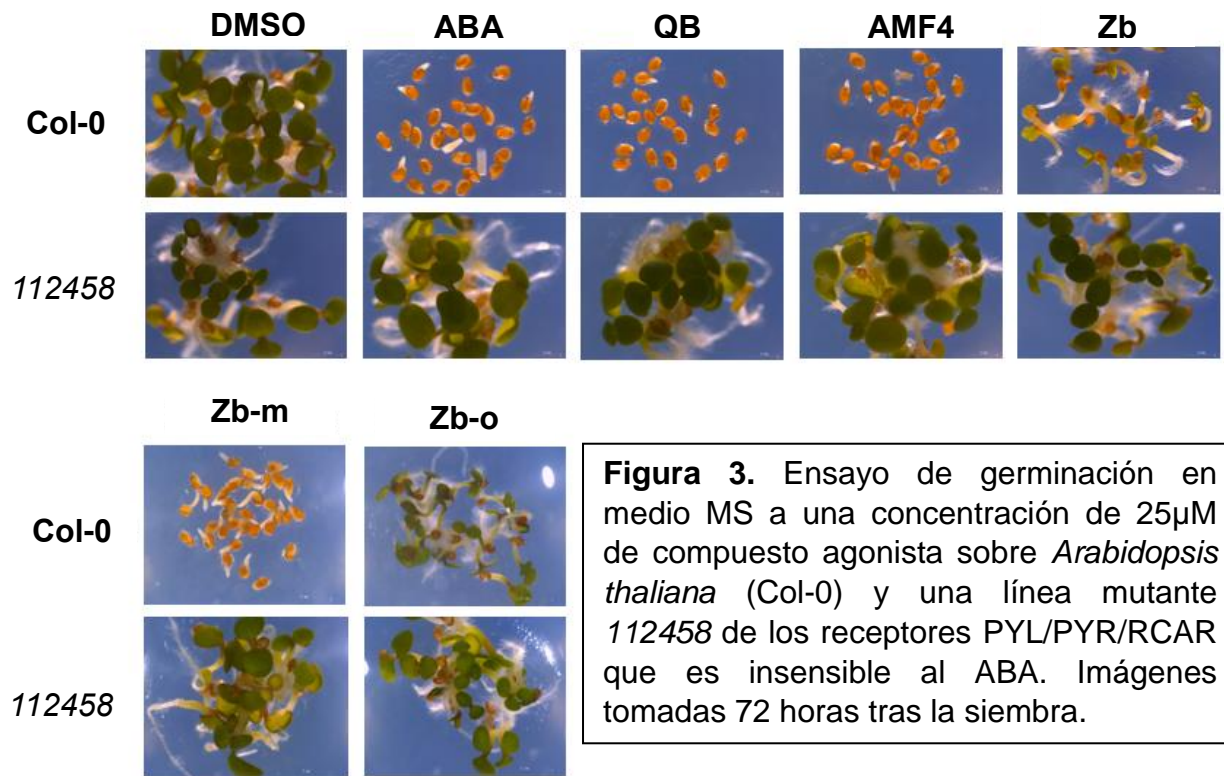
Figura 1. Estructuras químicas en dos dimensiones de los compuestos agonistas del ABA estudiados en este TFM. Quinabactina (QB), AMF4, Zeabactina (ZB), ZB-m, ZB-o y Cyanabactina (CB). R indica la misma estructura química que se ha omitido en la estructura por motivos de propiedad intelectual.

A la misma concentración, en el séxtuple mutante *112458 (pyr1-1, pyl1-1, pyl2-1, pyl4-1, pyl5-1, pyl8-1)* insensible al ABA, la germinación no se ve alterada, lo que sugiere que estos compuestos están activando los receptores PYL/PYR/RCAR e impiden que las semillas puedan germinar. El resto de compuestos parece no tener una interacción lo suficientemente fuerte para inhibir la germinación a esa concentración. Con la finalidad de encontrar la concentración que permita la inhibición la germinación de los compuestos que en 1µM no presentaron el fenotipo esperado, se aumentó la concentración progresivamente hasta 25µM (**Figura 3**) en donde el compuesto zeabactina presenta un fenotipo similar al ABA a 1µM pero no zeabactina-o, que no tiene efecto alguno sobre la germinación. Los compuestos que a 1µM ya presentaban un efecto sobre la germinación, en

25µM el efecto se ve ligeramente acentuado, inhibiendo completamente el establecimiento de la semilla.



Por lo tanto los compuestos agonistas sintetizados pueden inhibir la germinación de las semillas de Col-0 por la ruta de señalización del ABA a diferentes concentraciones, siendo quinabactina, AMF4 y zeabactina-m los compuestos que consiguen inhibir la germinación, validando la síntesis de los compuestos unirse a los receptores PYL/PYR/RCAR menores concentraciones e inhibir la germinación de las semillas de Col-0.



Ensayos de inhibición de actividad de la fosfatasa

Como se ha explicado anteriormente, los receptores PYR/PYL, una vez que une el ABA interactúan e inhiben la actividad de las proteínas PP2C. Un compuesto agonista de los receptores de ABA que sea activo, debe ser capaz de disminuir la actividad de las fosfatasas PP2C tras formar el complejo ternario receptor-agonista-fosfatasa. Para conocer si los agonistas, ya caracterizados previamente en *Arabidopsis* (Cao et al., 2017; Cutler et al., 2010; Okamoto et al., 2013), son también activos en los receptores de *Setaria viridis*, realizamos ensayos *in vitro* de actividad fosfatasa. En estos ensayos se utilizaron los 8 receptores de *Setaria viridis*, SvPYL1, SvPYL2, SvPYL3, SvPYL4, SvPYL5, SvPYL6, SvPYL7 y SvPYL8, la fosfatasa dNHAB1 y los compuestos agonistas en dos concentraciones 1 μ M y 10 μ M. En primer lugar, el ABA es capaz de activar todos los receptores de *Setaria viridis* tanto a una concentración de 1 μ M como a una de 10 μ M. A una concentración de 1 μ M, quinabactina en presencia de los receptores SvPYL1, SvPYL2, SvPYL3 y

SvPYL4 produce una fuerte inhibición de dNHAB1, ejerciendo una inhibición más atenuada en el caso del receptor SvPYL5 (**Figura 4 y Anexo 1**). Sin embargo, no parece inhibir la actividad de dNHAB1 en presencia de los receptores SvPYL6, SvPYL7 y SvPYL8 (**Figura 4 y Anexo 1**). Estos resultados indican que quinabactina es capaz de unirse a los receptores SvPYL1-4 y en menor medida a SvPYL5. Sorprendentemente, a una concentración de 10 μ M quinabactina puede activar también, aunque levemente, el receptor SvPYL6 (**Figura 4 y Anexo 1**).

El compuesto AMF4, que parte del mismo esqueleto que quinabactina, activa los receptores SvPYL1, SvPYL2, SvPYL3, SvPYL4 y SvPYL5 a una concentración de 1 μ M. Con el resto de receptores (SvPYL6, SvPYL7 y SvPYL8) no parece tener la interacción suficiente para inhibir la actividad fosfatasa. A pesar de ello, a una concentración de 10 μ M mejora sustancialmente la interacción con SvPYL5 y SvPYL6 produciéndose una fuerte inhibición de la actividad fosfatasa (**Figura 4 y Anexo 1**). Por el contrario, zeabactina no interactúa con los receptores con la misma afinidad ya que su inhibición de la actividad fosfatasa, es muy ligera, en presencia de los receptores SvPYL1, SvPYL2, SvPYL3, SvPYL4 y SvPYL5 a una concentración de 1 μ M. El resto de receptores (SvPYL6, SvPYL7 y SvPYL8) no presentan una afinidad suficiente por zeabactina (**Figura 4 y Anexo 1**). Saturando el receptor hasta 10 μ M mejora la inhibición de la fosfatasa con los receptores SvPYL1-5, y activa levemente SvPYL6 pero no SvPYL7 y SvPYL8 (**Figura 4 y Anexo 1**). Por otra parte, la adición del grupo isopropilo en posición meta de zeabactina-m causa un efecto muy positivo en la activación de los receptores, mejorando los resultados obtenidos con zeabactina. Zeabactina-m es capaz de inhibir fuertemente la actividad fosfatasa cuando se une a los receptores SvPYL1, SvPYL2, SvPYL3, SvPYL4, SvPYL5, en menor medida SvPYL6, y en SvPYL7-SvPYL8 no presenta actividad. Aumentando la concentración a 10 μ M sólo se consigue mejorar la inhibición en el receptor SvPYL6. El otro cambio sobre la estructura en posición orto no parece tener efectos significativamente diferentes a los de zeabactina, por lo tanto la adición de este grupo no confiere al compuesto una ventaja sobre el compuesto original (**Figura 4 y Anexo 1**). Por último, el comportamiento de cyanabactina a una concentración de 1 μ M es

similar al de zeabactina-m, es decir, activa SvPYL1, SvPYL2, SvPYL3, SvPYL4, SvPYL5 y en menor medida SvPYL6. No tiene efectos sobre el resto de receptores y aumentando la concentración a 10µM solo se consigue mejorar la inhibición en presencia de SvPYL6.

1µM	ABA	QB	AMF4	ZEA	ZEA-m	ZEA-o	CB
SvPYL1	++	++	++	+	++	+	++
SvPYL2	++	++	++	+	++	+	++
SvPYL3	++	++	++	+	++	+	++
SvPYL4	++	++	++	+	++	+	++
SvPYL5	++	+	+	+	++	+	++
SvPYL6	++	-	+	-	+	-	+
SvPYL7	+	-	-	-	-	-	-
SvPYL8	+	-	-	-	-	-	-

10µM	ABA	QB	AMF4	ZEA	ZEA-m	ZEA-o	CB
SvPYL1	++	++	++	++	++	++	++
SvPYL2	++	++	++	++	++	++	++
SvPYL3	++	++	++	++	++	++	++
SvPYL4	++	++	++	++	++	++	++
SvPYL5	++	++	++	++	++	++	++
SvPYL6	++	+	++	+	++	+	++
SvPYL7	++	-	-	-	-	-	-
SvPYL8	++	-	-	-	-	-	-

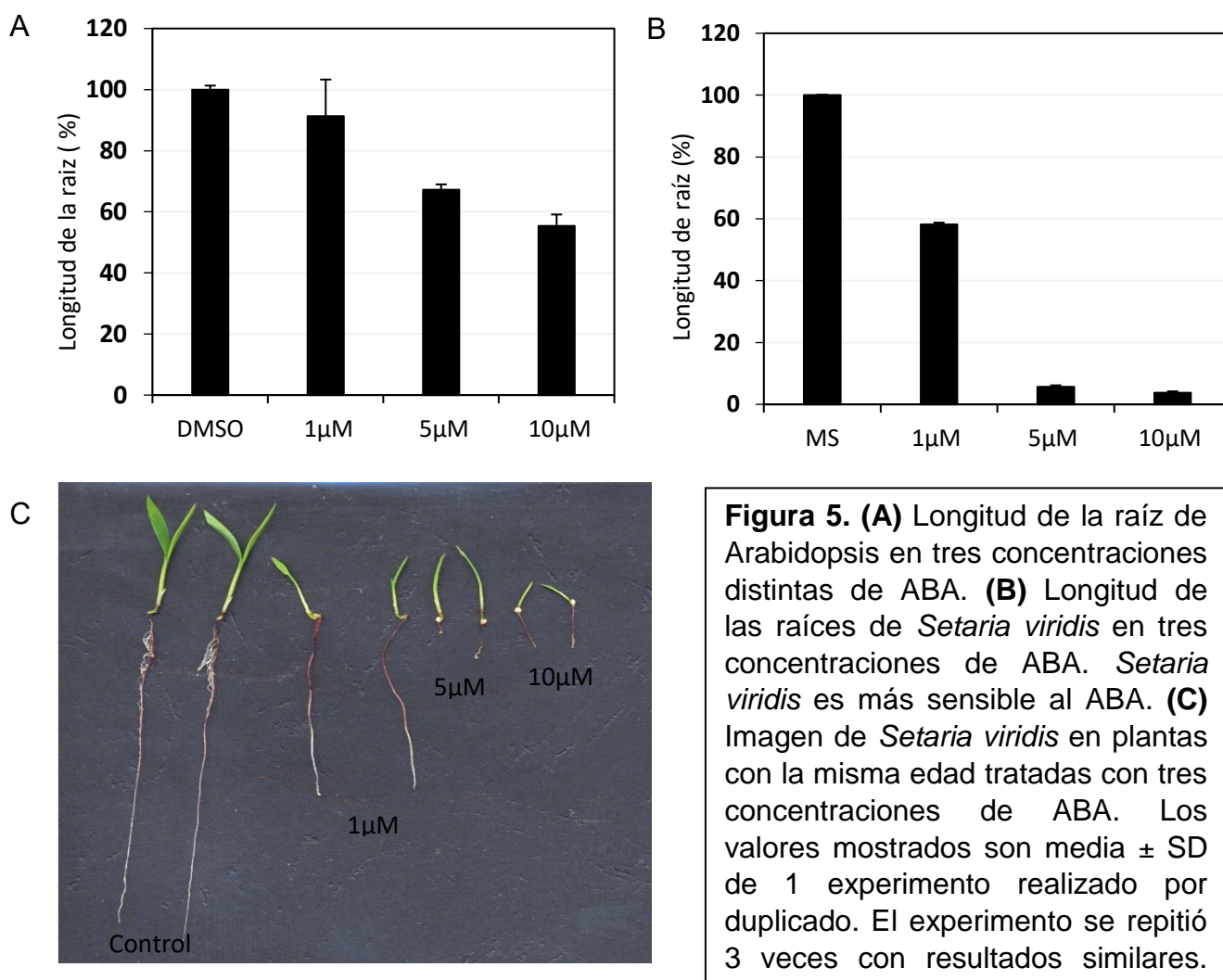
Figura 4. Resumen de los ensayos de inhibición de la actividad fosfatasa dNHAB1. El rango de actividad 100%-70% corresponde el símbolo -, entre 70% a 40% al + y entre el 40% al 10% el ++. (ANEXO 1)

Los compuestos agonistas consiguen activar en mayor o menor medida el clado III de los receptores de ABA, del Clado II sólo SvPYL4, SvPYL5 y

SvPYL6 y ningún compuesto consigue activar los receptores SvPYL7 y SvPYL8 pertenecientes al clado I (Figura 4).

Ensayos de crecimiento de raíz

El ABA inhibe el crecimiento de la raíz, de modo que la aparición de este fenotipo en las raíces de plantas tratadas con los agonistas de los receptores de ABA es indicativo de que los compuestos son activos y actúan a través de la vía de señalización de ABA. Hasta la fecha no se habían realizado este tipo de ensayos en plantas de *Setaria viridis*, de modo que en primer lugar fue necesario determinar la concentración de ABA/agonista que mejor se adecua a este ensayo.



La concentración ideal es aquella con la que se obtiene una inhibición del crecimiento del 50% para así poder determinar si los compuestos tienen más o menos efecto que el ABA. Para examinar el efecto que el ABA produce en las raíces de *Arabidopsis*, se utilizaron cuatro concentraciones obteniéndose que a 10 μ M el crecimiento de la raíz alcanza un 59,5% a los 2 días post-tratamiento en comparación con los controles tratados con DMSO (**Figura 5 A**). Tras 6 días de tratamiento la longitud de la raíz se reduce hasta un 55,3%. Por lo tanto 10 μ M es la dosis que produce el efecto más acentuado del ABA sobre la raíz.

Por otro lado, estas mismas concentraciones fueron utilizadas para determinar el efecto sobre las raíces de *Setaria viridis* y se observó que a una concentración de 1 μ M la raíz alcanzó una longitud del 58,20% en comparación con los controles y a una concentración de 5 μ M el crecimiento de la raíz se vio totalmente bloqueado (**Figura 5 B**). Por lo tanto, 1 μ M será la concentración que se usará en los ensayos de crecimiento de raíz para los compuestos agonistas (**Figura 5 B**).

La inhibición del crecimiento de la raíz que presenta *Setaria* a 1 μ M es equivalente a la que presenta *Arabidopsis* a una concentración 10 veces superior y por lo tanto las raíces de *Setaria viridis* son más sensibles al ABA que las raíces de Col-0 (**Figura 5**). Además, la parte aérea también detiene su crecimiento en presencia de esta hormona (**Figura 5 C**).

Los estudios del crecimiento de la raíz en presencia de los agonistas en *Arabidopsis thaliana* (Col-0), a una concentración de 10 μ M revelaron que quinabactina es el compuesto que consigue una mayor inhibición del crecimiento de la raíz, creciendo un 62.4% en relación a los controles a las 72h post-tratamiento. Llegando casi a los mismo niveles de actividad que el ABA que consigue inhibir el crecimiento de la raíz un 59.2%. Los agonistas cyanabactina, zeabactina-m y AMF4 presentan un comportamiento similar (**Figura 6 A**). Las plantas sometidas a estos tratamientos consiguen un crecimiento de la raíz del ~75%. El resto de compuestos, zeabactina y zeabactina-o no parecen tener un efecto significativo sobre el crecimiento de la raíz. Tras 6 días post-tratamiento los patrones de inhibición de crecimiento de

raíz se mantienen entre los distintos agonistas e incluso los valores de crecimiento son menores que a 3 días (**Figura 6 B**). Estos datos sugieren que los compuestos son estables en un lapso de tiempo de 6 días y la presencia o ausencia de los receptores PYL/PYR/RCAR a los cuales se pueden unir específicamente cada compuesto, determina la inhibición del crecimiento de la raíz. El compuesto agonista quinabactina es el que produce un mayor efecto sobre el crecimiento a pesar de que compuestos como AMF4, zeabactina-m y cyanabactina *in vitro* consiguen una inhibición más acentuada de la actividad fosfatasa por su fuerte interacción con los receptores. Por el contrario zeabactina y zeabactina-o tienen un efecto muy sutil sobre la raíz al igual que los datos obtenidos en los ensayos de germinación y de actividad PP2C.

Estos mismos compuestos fueron caracterizados en *Setaria viridis* a una concentración de 1µM. A las 48h (**Figura 7 A**), el crecimiento de la raíz se redujo en un 40% en las plantas tratadas con ABA en relación a los controles. Sin embargo, las plantas tratadas con los compuestos quinabactina y cyanabactina presentaron un leve incremento en el crecimiento de la raíz. Por otro lado, el resto de compuestos no consiguen inhibir el crecimiento de manera significativa.

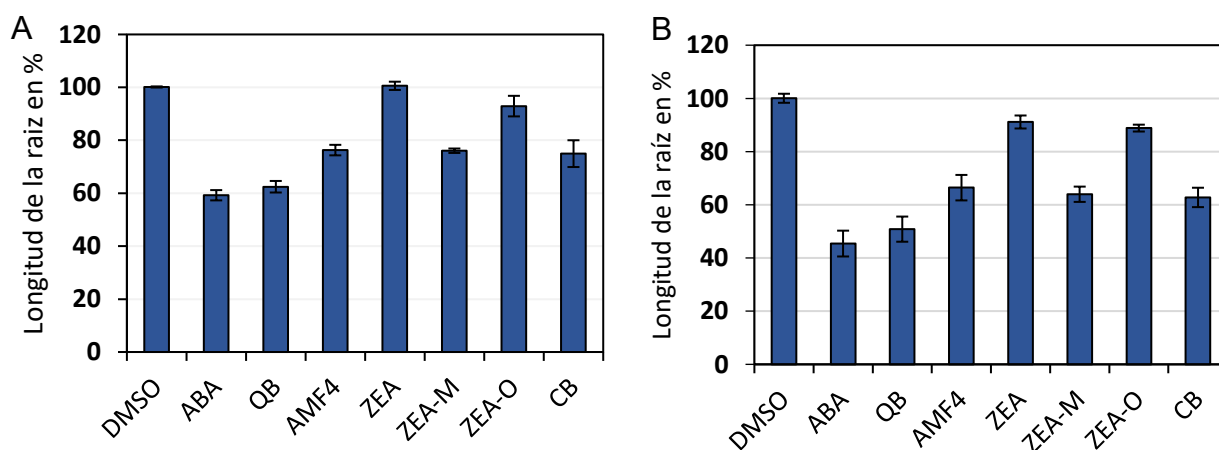


Figura 6. (A) Longitud de las raíces de Arabidopsis tras dos días post-tratamiento con los diferentes agonistas. **(B)** Evolución del ensayo tras 6 días en tratamiento. Los valores mostrados son media ± SD de 1 experimento realizado por duplicado. El experimento se repitió 3 veces con resultados similares

Tras 96h, no hubo cambios significativos sobre el crecimiento. Las plantas tratadas con ABA presentaron una inhibición del 32.5%, y el resto de compuestos no presentan una inhibición significativa (**Figura 7 B**). Aunque

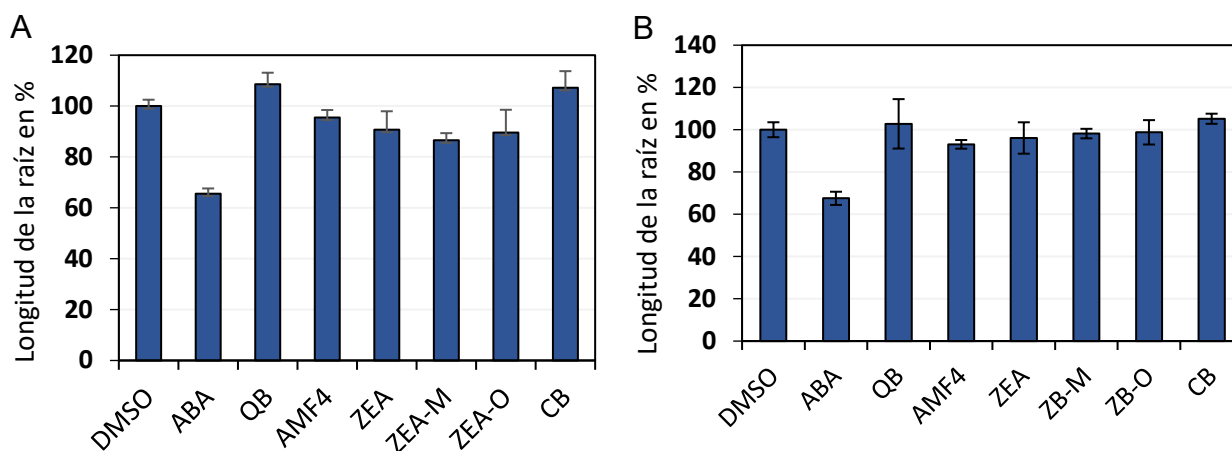


Figura 7. (A) Longitud de las raíces de *Setaria viridis* tras 48h post-tratamiento. QB y CB presentan un ligero crecimiento de la raíz. **(B)** Evolución del mismo ensayo tras 96h post-tratamiento.

Setaria viridis a una concentración de 1µM de ABA presente un fenotipo de reducción de la longitud de la raíz del ~40%, en presencia de los compuestos agonistas a esa concentración parece ser insuficiente para obtener un fenotipo similar en un lapso de tiempo de 96h.

Estos resultados ponen de manifiesto la diferencia en la actividad de los agonistas entre plantas monocotiledoneas y dicotiledoneas.

Termo-imágen

Puesta a punto del método

Las células guarda controlan la salida y entrada de agua y CO₂ de las hojas. El ABA provoca un movimiento de estas células cerrando los estomas lo que provoca la reducción de la transpiración. Este efecto regulado por el ABA provoca un aumento de la temperatura de la hoja debido a la imposibilidad de realizar el intercambio gaseoso con el medio. Este aumento de la temperatura

puede ser registrado en valores numéricos a través del uso de cámaras con detectores de infrarrojos que detectan temperatura (termo-imagen). La aplicación exógena en forma de spray de una solución compuesta de MES, ABA y un agente mojante como el tween20 o silweet puede inducir el cierre de estomas y la reducción de la transpiración, lo que se verá reflejado en un incremento de la temperatura foliar mediante la termo-cámara.

En *Arabidopsis*, el tratamiento con una solución con ABA a una concentración de 50 μ M en condiciones de laboratorio provoca el cierre de estomas y un aumento de temperatura de 0.8 $^{\circ}$ C entre el control y las plantas tratadas. Sin embargo, las condiciones de iluminación del laboratorio son muy bajas, de 50 μ mol m⁻² s⁻¹, por lo que los estomas de las plantas no tratadas no se encontraban abiertos en su totalidad. Cabe recordar que el máximo inductor del cierre estomático no es el ABA sino la oscuridad y los periodos de luz y oscuridad regulan finamente la apertura y el cierre de los estomas. Partiendo de esta idea, se realizó el mismo ensayo pero en condiciones de fitotrón, en donde la temperatura y fotoperiodo son controlados, obteniéndose un aumento de 1.5 $^{\circ}$ C con respecto a los controles a las 24h tras el tratamiento con 50 μ M de ABA (**Figura 8 A**).

A diferencia de *Arabidopsis*, la aplicación de una solución de ABA, incluso a una concentración de 100 μ M, no produjo un aumento en la temperatura en plantas de *Setaria viridis* en condiciones de laboratorio.

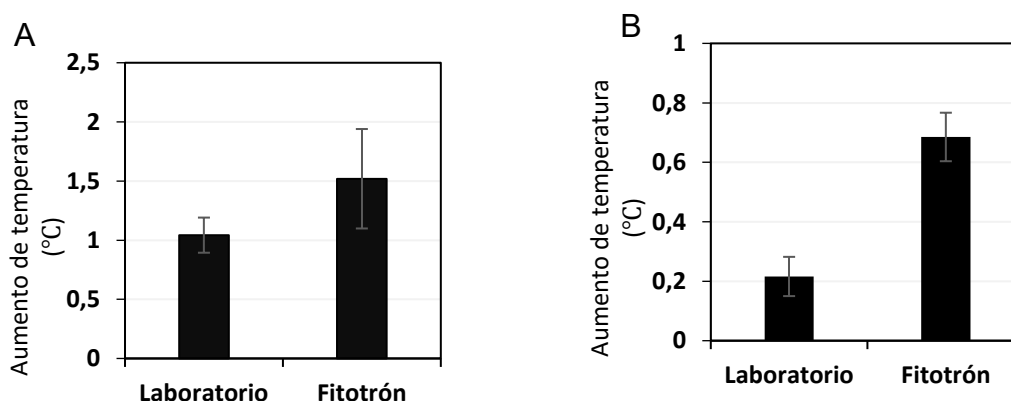


Figura 8. (A) Aumento de temperatura de plantas de *Arabidopsis* tras aplicar 50 μ M de ABA. **(B)** Aumento de temperatura de *Setaria viridis* a las 12h tras aplicar spray a 100 μ M ABA.

Partiendo de la idea que las condiciones de luz podían ser insuficientes se realizó el mismo ensayo pero en condiciones de fitotrón, donde la temperatura es de 27°C día/24°C noche y la intensidad lumínica es aproximadamente de 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Finalmente, se consiguió observar un aumento de la temperatura de 0.69°C con respecto a los controles tras 12h de la aplicación del ABA en spray (**Figura 8 B**).

Efecto de los diferentes agonistas de ABA en la transpiración

Para caracterizar el efecto de los compuestos agonistas sobre Arabidopsis en condiciones de fitotrón, se realizó un spray a 50 μM ABA y tras un lapso de 24h se registró la temperatura de las hojas. El efecto del ABA consigue incrementar la temperatura foliar 1.51°C (Figura 9 A) con respecto a los controles tratados con dimetilsulfóxido (DMSO). Los compuestos AMF4 y quinabactina provocan un incremento de la temperatura de 1.77°C y 1.32°C respectivamente(**Figura9**)

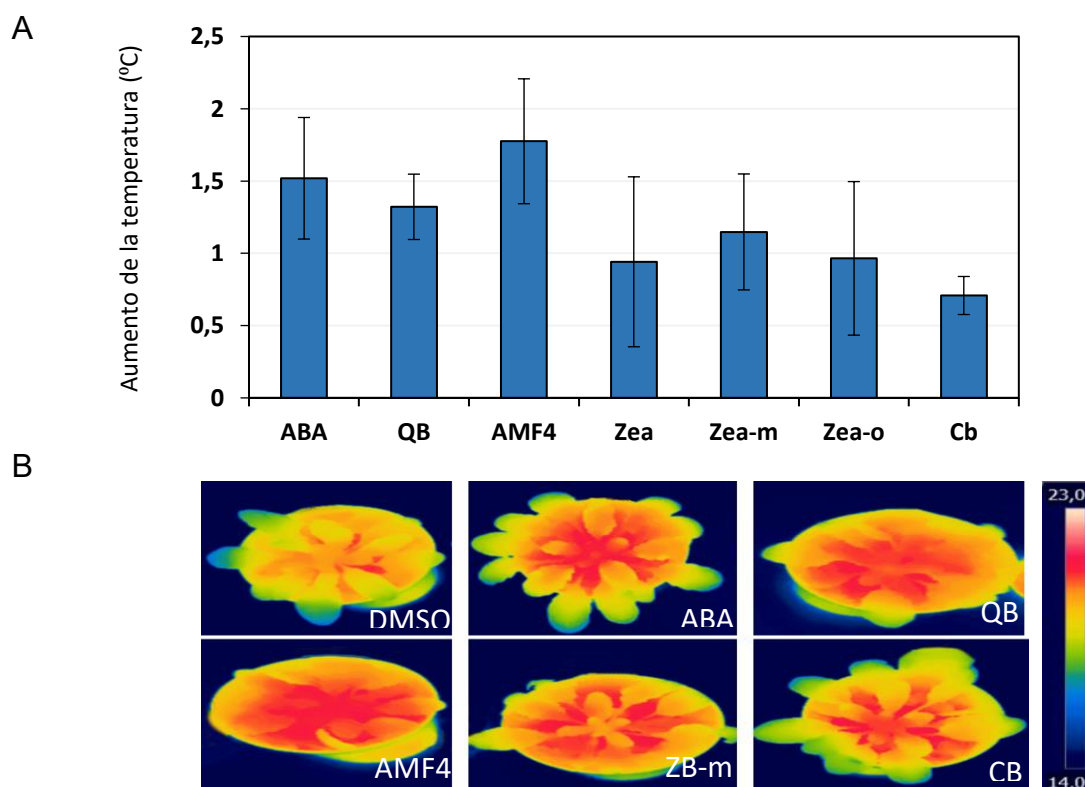


Figura 9.(A) Aumento de la temperatura foliar con respecto al control 24h post-aplicación del spray a 50 μM de compuesto agonista en plantas Col-0. El aumento de temperatura **(B)** se visualiza en rojo mientras que las plantas con menor temperatura se registra en colores azules.

Por otro lado, la serie de compuestos zeabactina, zeabactina-o y zeabactina-m consiguen reducir la transpiración y aumentan la temperatura, sin embargo el efecto de zeabactina-m causa un aumento de temperatura de 1.14°C con respecto a los controles, cifra similar a las obtenidas con quinabactina. Por otro lado, cyanabactina produce un aumento más reducido de temperatura de 0.70°C.

Para caracterizar los agonistas en *Setaria viridis* se utilizó la misma solución descrita anteriormente a 100µM de ABA en condiciones de fitotrón, y la toma de imágenes térmicas a las 12h post-tratamiento (**Figura 10**). Tras realizar un riguroso control en la aplicación y toma de imágenes, las plantas tratadas con ABA aumentaron la temperatura foliar 1.11°C con respecto a los controles tratado con DMSO.

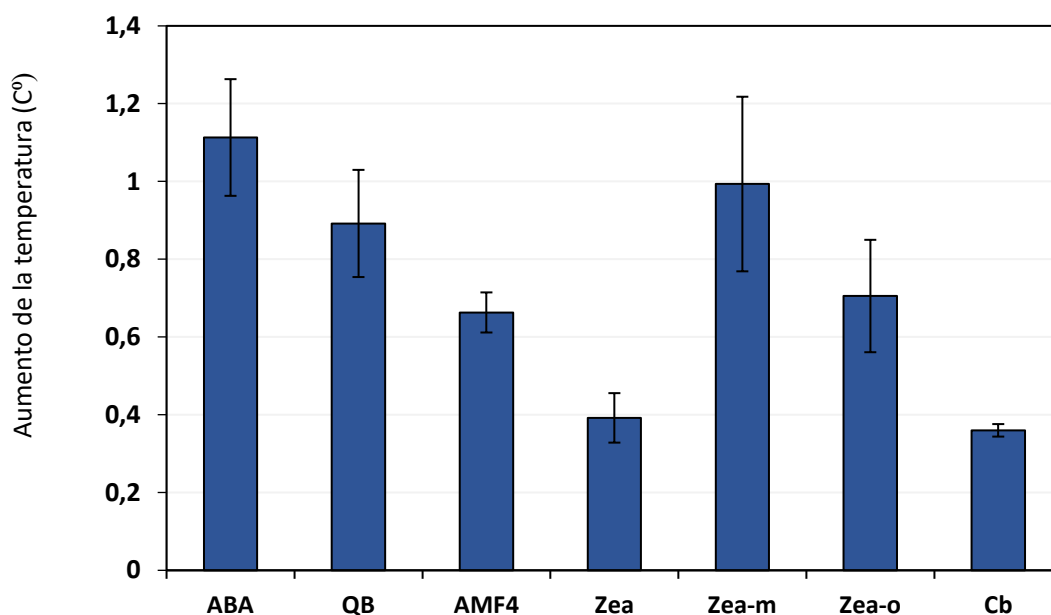


Figura 10. Diferencias de temperatura con respecto a los controles tratados con DMSO tras aplicar un spray con 100µM de compuesto agonista a las 12h en *Setaria viridis*.

Por el contrario los diferentes compuestos no consiguen sobrepasar el umbral de un grado de diferencia, siendo zeabactina-m el agonista no descrito que mejor consigue reducir la transpiración, aumentando en 1°C la temperatura, aunque los datos indican una alta variabilidad de temperatura entre plantas.

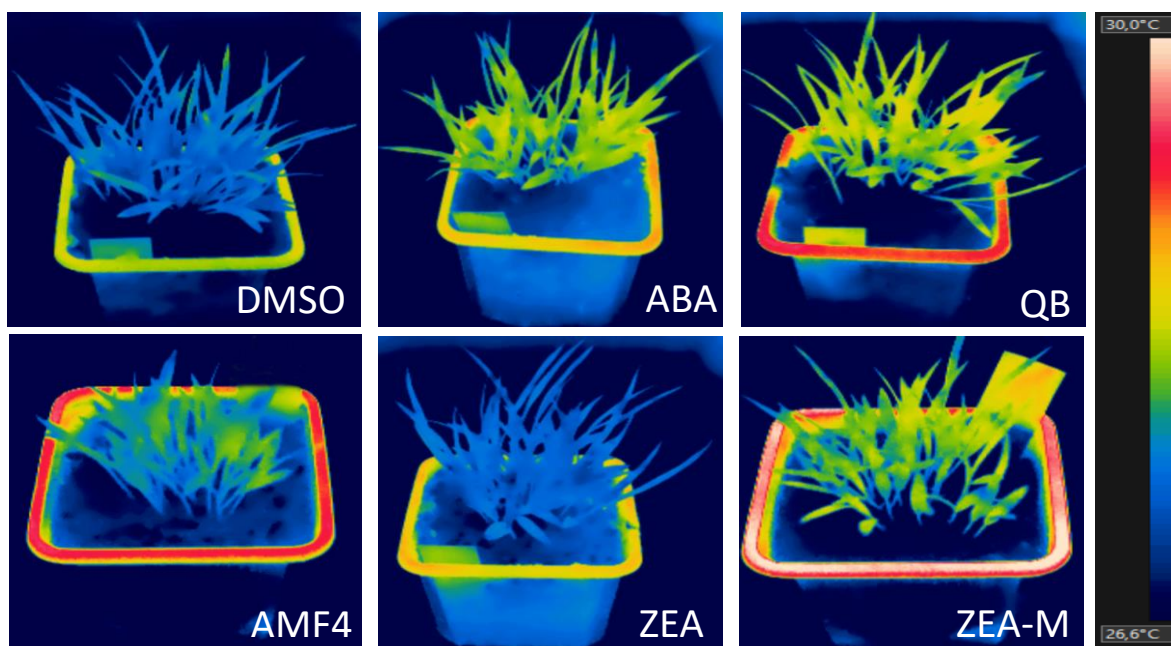


Figura 11. Imágenes infrarrojas de *Setaria viridis* tomadas 12h post-aplicación de compuesto. Las plantas con menos transpiración están reflejadas en tonos amarillos mientras que las que si transpiran presentan colores azulados

El compuesto AMF4 parece tener un menor efecto sobre la transpiración, las plantas tratadas con este compuesto reducen la transpiración e incrementan su temperatura hasta 0.66 °C, en comparación con quinabactina 0.89 °C, zeabactina-o 0.70 °C que consiguen unos datos discretamente mayores. Por otro lado, cyanabactina (0.35 °C) y zeabactina (0.39 °C) resultan ser los compuestos que menos efecto tienen sobre la transpiración en *Setaria viridis*.

El efecto causado por los compuestos agonistas en ambos modelos de dicotiledóneas y monocotiledóneas son diferentes. Por un lado, la planta

dicotiledónea *Arabidopsis* reacciona positivamente a los agonistas, cerrando los estomas y reduciendo la transpiración en mayor medida que la planta monocotiledónea *Setaria viridis*.

Ensayos de sequía

Para comprobar si los compuestos agonistas reúnen las características necesarias para producir una reducción de la transpiración y una mejor eficiencia en el uso del agua, realizamos ensayos de sequía donde plantas cultivadas en condiciones óptimas son tratadas con los diferentes compuestos y privadas de agua durante un periodo determinado de tiempo. Tras aplicar una solución con 50 μ M de cada compuesto o DMSO como control, en forma de spray en los días 1, 6, 13 y detener el riego, las plantas de *Arabidopsis* expuestas al agonista AMF4 consiguen retener un mayor volumen de agua tras 14 días sin

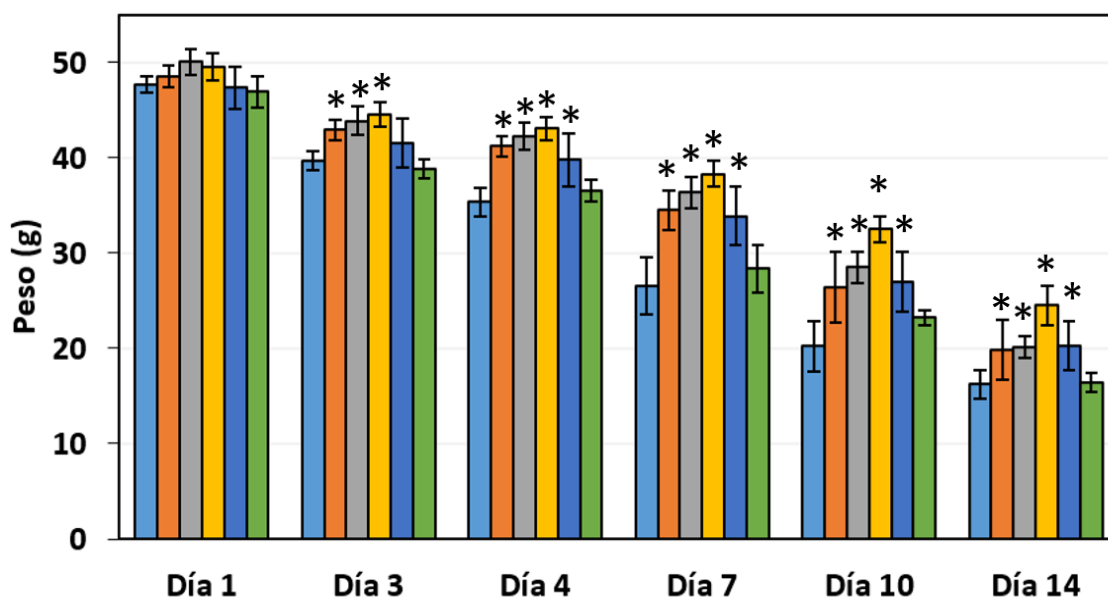


Figura 11. Pérdida de agua en plantas de *Arabidopsis* en un periodo de 14 días. En los días 1, 6 y 13 se aplicó 50 μ M de los compuestos agonistas en forma de spray. * Diferencias significativas p-valor<0.05

riego, permitiendo mantener las hojas turgentes y aumentar las posibilidades de supervivencia. Estos datos corroboran los obtenidos en las imágenes infrarrojas, donde AMF4 es el compuesto que más reduce la transpiración (**Figura 11**). Las plantas de *Arabidopsis* tratadas con quinabactina y con zeabactina-m también consiguen un uso eficiente del agua ya que en los resultados obtenidos en estos experimentos el efecto protector que realiza el ABA se equipara al de estos agonistas.

Sorprendentemente, cyanabactina no parece tener un efecto sobre la resistencia a la sequía ya que las plantas tratadas con este compuesto usan la misma cantidad de agua que plantas tratadas con el tratamiento control.

Para comprobar el efecto que producen los agonistas en plantas monocotiledóneas, tratamos plantas de *Setaria* con 100µM de compuesto (o DMSO como control) y las dejamos de regar. Los datos de pérdida de peso obtenidos en estos experimentos muestran que los compuestos agonistas tienen poco efecto sobre el uso del agua en comparación con los resultados obtenidos en *Arabidopsis* y que solo el ABA produce un efecto antitranspirante a largo plazo haciendo que las plantas retengan más agua en el sustrato.

Tras la aplicación del primer tratamiento con los agonistas, todos los compuestos reducen el uso del agua de las plantas de *Setaria*.

Tras la segunda aplicación, las plantas tratadas con los compuestos cyanabactina, quinabactina y ABA arrojan valores muy similares, otorgando cierta ventaja en la retención de agua frente a los controles. Sin embargo, tras realizar otro spray el día 5 y privar las plantas de agua durante 6 días sólo las plantas tratadas con ABA demuestran tener una mayor retención de agua causado por una reducción de la transpiración. El resto de compuestos no parece brindar a la planta de una clara ventaja en la retención de agua. Aunque esta ventaja aportada por los tratamientos con ABA puede parecer sutil, es suficiente para mantener las plantas turgentes e hidratadas frente a los otros grupos que, con ~2g menos, muestran un marchitamiento de las hojas.

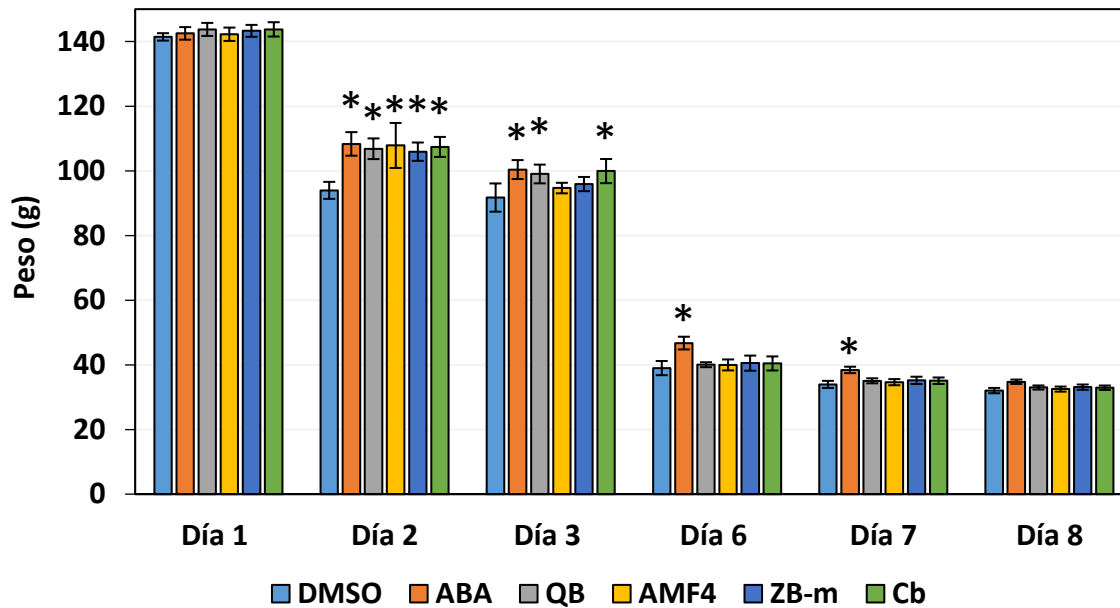


Figura 12. Pérdida de agua en plantas de *Setaria viridis*. En los días 1, 3 y 6 se aplicaron los agonistas a 100 μ M. * Diferencias significativas p-valor<0.05

La eficiencia de los compuestos agonistas es variable en función de la especie de interés. Mientras que en *Arabidopsis thaliana* durante un periodo de suspensión de agua de 14 días, el compuesto AMF4 es el que otorga a la planta de una clara ventaja en la capacidad de retención de agua causada por una menor transpiración, en *Setaria viridis* en un lapso de 8 días, el ABA es el único compuesto que confiere más resistencia frente a la sequía aunque a corto plazo quinabactina y cyanabactina tienen un efecto similar al ABA. Aunque a priori los ensayos PP2C arrojasen como candidato al agonista zeabactina-m como el compuesto que activa más receptores, inhibiendo la actividad fosfatasa, *in vivo* los datos no sostienen que esta interacción confiera resistencia ante la sequía.

	ABA	QB	AMF4	ZB-m	CB
Germinación	++++	++	++	+++	+++ (L)
PP2C-SvPYL	1-8	1-5	1-6	1-6	1-6
Ensayo raíz	A: +++ S: +++++	A: +++++ S: -	A: +++ S: -	A: ++ S: -	A: ++ S: -
Termo-imagen	A: ++ S: +++	A: +++ S: ++	A: +++++ S: ++	A: ++ S: +++++	A: + S: +
Ensayo sequía	A: ++ S: +	A: +++ S: -	A: +++++ S: -	A: ++ S: -	A: ++ S: -

Figura 13. Tabla resumen con los resultados de los ensayos con *Arabidopsis thaliana* (**A**) y *Setaria viridis* (**S**). El un mayor número de + indica una mayor eficacia del agonista durante el ensayo. Algunas raíces crecieron (*) debido a la leve percepción del agonista. En Col-0 el agonista AMF4 es el que permite un uso eficiente del agua, mientras que en *Setaria viridis* es el Ácido Abscísico. **(L)** según la literatura. **(-)** Sin efecto.

DISCUSIÓN

El ABA es una fitohormona que induce la dormancia de las semillas, impidiendo así su establecimiento. Por otro lado, también controla el crecimiento de la raíz; a concentraciones muy pequeñas promueve el crecimiento mientras que a concentraciones altas lo inhibe. El efecto que tiene el ABA sobre el crecimiento de la raíz es muy drástico en el caso de *Setaria*, cuya raíz parece ser extremadamente sensible a la hormona ya que con una concentración de $1\mu\text{M}$ se reduce el crecimiento en un 50% en comparación con las plantas control. Sin embargo, *Arabidopsis* parece ser menos sensible a la aplicación de ABA ya que para obtener el mismo fenotipo que en las raíces de *Setaria* se necesita una concentración de $10\mu\text{M}$ de ABA. Parece entonces que las raíces de *Setaria* son unas 10 veces más sensibles a la aplicación de ABA. Sin embargo, este fenotipo podría deberse también a una mayor acumulación de ABA endógeno en las raíces de *Setaria*.

La caracterización de los compuestos agonistas del ABA provoca en las plantas de *Setaria* y *Arabidopsis* un fenotipo variable. Los agonistas de ABA han sido desarrollados gracias al rastreo de librerías de pequeñas moléculas que promueven la interacción de los receptores PYL/PYR/RCAR con las fosfatasa PP2C (Okamoto et al., 2013) y del diseño racional basado en la estructura de los receptores (Cao et al., 2017; Vaidya et al., 2017). Debido a que la mayoría de los ensayos realizados anteriormente con la finalidad de caracterizar estos compuestos fue llevado a cabo en plantas dicotiledóneas, nos preguntamos cual sería el efecto de esos agonistas en plantas monocotiledóneas.

En plantas dicotiledóneas, quinabactina consigue unirse *in vitro* a los receptores PYR1, PYL1, PYL2, PYL3 y en menor medida a PYL5 (Okamoto et al., 2013). Sin embargo, en los receptores de ABA de la planta modelo de monocotiledóneas *Setaria viridis*, nuestros resultados indican que este compuesto es capaz de unirse y activar los receptores SvPYL1, SvPYL2, SvPYL3 y SvPYL4 y en menor medida a SvPYL5. En otra especie monocotiledónea como es el trigo, quinabactina sólo consigue inhibir la actividad de la TaPP2C en presencia del receptor TaPYL1 (Vaidya et al., 2019)

. Por lo tanto, la actividad de quinabactina parece ser específica de cada especie uniéndose preferencialmente a los receptores diméricos. En los ensayos de crecimiento de raíz el compuesto quinabactina reduce el tamaño de la raíz en *Arabidopsis* a una concentración de 10 μ M, sin embargo en *Setaria* a 1 μ M no hubo inhibición del crecimiento de la raíz sino que esta creció ligeramente. Este es el mismo fenotipo que se observa cuando las raíces son tratadas con concentraciones muy bajas de ABA. Estos datos sugieren que la actividad de quinabactina es muy baja en *Setaria* y no es suficiente para inhibir el crecimiento de la raíz.

Tanto en dicotiledóneas como en monocotiledóneas, quinabactina consigue reducir la transpiración, elevando la temperatura foliar. En el caso de *Arabidopsis* el tratamiento con quinabactina aumenta 1.32 °C la temperatura de las hojas 24h post-aplicación de 50 μ M del compuesto y en *Setaria* aumenta la temperatura en 0.89°C tras 12h post-aplicación de 100 μ M de quinabactina, por lo tanto *Setaria* incrementa menos la temperatura tras la aplicación de quinabactina y la dinámica del cierre estomático en respuesta al compuesto es más rápida. Sin embargo este efecto no es específico de quinabactina, también se ha observado que tras la aplicación de 100 μ M de ABA la dinámica del cierre estomático alcanza su máximo a las 12h post aplicación del spray, mientras que en *Arabidopsis* este efecto ocurre a las 24h post aplicación. Estos datos en el caso de *Arabidopsis* confirman los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* de actividad fosfatasa y los de crecimiento de raíz, es decir, la activación de los receptores y la inhibición del crecimiento de la raíz sugiere que quinabactina produce una respuesta similar al ABA. Por otro lado en *Setaria* no hubo inhibición en el crecimiento de raíz, la elevación de la temperatura causada por la reducción de la transpiración sugiere que consigue unirse a ciertos receptores SvPYL con la suficiente afinidad como para inhibir la actividad PP2C y cerrar los estomas. Estos resultados se complementan con los obtenidos en los ensayos de sequía, donde las plantas de *Arabidopsis* tratadas con quinabactina consiguen retener un mayor volumen de agua debido a la reducción de la transpiración y a un uso más eficiente del agua. Este efecto sobre la transpiración no es tan fuerte en *Setaria* ya que solo durante los días 2 y 3 del ensayo mantienen un mayor volumen de agua. Días

posteriores y tras la aplicación del compuesto agonista en dos ocasiones más, las plantas no consiguen resultados significativos. Por lo tanto, quinabactina es un compuesto que activa los receptores PYR1, PYL1, PYL2, PYL3 y PYL5, impide el establecimiento de la semilla, reduce el crecimiento de la raíz, y reduce la transpiración a las 24h post aplicación en plantas dicotiledóneas, pero en monocotiledóneas la activación de los receptores no es suficiente para reducir el crecimiento de la raíz y reducir la transpiración.

La adición de los cuatro átomos de flúor sobre el esqueleto de quinabactina permite a AMF4 interactuar con los receptores PYL/PYR/RCAR formando un mayor número de puentes de hidrogeno y por lo tanto, según lo descrito anteriormente, el compuesto es más estable y persistente en el tiempo (Cao et al., 2017). En *Arabidopsis*, está descrito que AMF4 se une fuertemente a los receptores PYR1, PYL1, PYL2, PYL3, PYL5 y PYL7 (Cao et al., 2017) sin embargo nuestros ensayos afirman que en los receptores de plantas como *Setaria* el compuesto puede inhibir la actividad de las PP2C en presencia de los receptores SvPYL1, SvPYL2, SvPYL3, SvPYL4 y en menor medida SvPYL5 y SvPYL6. En otros ensayos realizados con los receptores de trigo, AMF4 puede inhibir la actividad de la fosfatasa en presencia del receptor TaPYL1 y en menor medida TaPYL8 (Vaidya et al., 2019). Esto sugiere que las pequeñas variaciones en los aminoácidos que componen los receptores de cada especie son lo suficientemente significativas como para producir, o no, una inhibición de las PP2C en presencia del agonista. Al igual que quinabactina, AMF4 inhibe el crecimiento de las raíces de *Arabidopsis* hasta valores cercanos al 50%. Sorprendentemente, las raíces de *Setaria viridis* expuestas a este compuesto no sufren una reducción en su crecimiento indicando que AMF4 tiene una actividad muy reducida en raíces de plantas monocotiledóneas.

Los ensayos de termoimagen realizados con este compuesto revelan su gran potencial en la reducción de la transpiración en plantas dicotiledóneas como *Arabidopsis*, aumentando la temperatura foliar hasta 1.77 °C más con respecto a los controles, confirmando los datos descritos previamente (Cao et al., 2017). El tratamiento con 100 µM de AMF4 en *Setaria* eleva la temperatura foliar en 0.66 °C con respecto a los controles. Teniendo en cuenta que este compuesto fue diseñado para mejorar la eficiencia de quinabactina (Cao et al., 2017), este

efecto no se aprecia en plantas monocotiledóneas como *Setaria*. Tras obtener los datos de las imágenes térmicas en *Arabidopsis*, el compuesto AMF4 consigue una reducción notoria de la transpiración que se traduce en un incremento notable de la resistencia a la sequía en los ensayos de privación de agua, siendo este compuesto el que consigue preservar un volumen significativamente mayor de agua en las plantas de *Arabidopsis* tras 14 días de ensayo. Por el contrario, este efecto tan acentuado no se aprecia en las plantas de *Setaria*, lo que concuerda con los datos obtenidos en los ensayos de imágenes infrarrojas. Por lo tanto, el diseño del compuesto agonista AMF4 y su alta afinidad por los receptores PYL puede ser útil para combatir el estrés por sequía en plantas dicotiledóneas, sin embargo, en plantas monocotiledóneas sólo durante el día 2 post aplicación se aprecian valores significativos en la retención de agua.

El compuesto zeabactina consigue unirse en mayor medida a SvPYL1, SvPYL2, SvPYL3, SvPYL4 y SvPYL5 y en menor a SvPYL6, lo que permite en un periodo de tiempo de seis días inhibir el crecimiento de la raíz de *Arabidopsis* un ~9% y por lo tanto es un compuesto estable en el tiempo pero su actividad no es tan alta como la que tienen ABA, QB o AMF4. A pesar de ser un compuesto que deriva de un “screening” con los receptores de maíz, en *Setaria* el efecto sobre la raíz es igual de sutil que en *Arabidopsis* con la diferencia de que el fenotipo de la raíz aparece durante los primeros días del ensayo y no al final de éste. En los ensayos de transpiración el compuesto es lo suficientemente activo para reducirla, aumentando la temperatura foliar de las plantas de *Arabidopsis* en 0.94 °C mientras que el efecto que tiene en *Setaria* es muy reducido, promoviendo un aumento de tan solo 0.39 °C. Por lo tanto, estos datos sugieren que el compuesto tiene actividad en hojas de *Arabidopsis* pero no en las de *Setaria*. Debido a esto, éste compuesto fue descartado para los ensayos de sequía.

Partiendo de zeabactina se desarrollaron otras dos moléculas con un grupo ciclopropilo en meta y en orto con respecto al grupo ciano ya que en estudios previos, la incorporación de un grupo ciclopropilo aumentaba considerablemente la actividad de los compuestos (Vaidya et al., 2017, Vaidya et al., 2019). Los nuevos compuestos fueron denominados Zeabactina-o (ZB-

o), cuando el grupo ciclopropilo fue incorporado en la posición orto (respecto al grupo ciano) y Zeabactina-m (ZB-m) cuando el grupo ciclopropilo fue sintetizado en la posición meta (respecto al grupo ciano). De los nuevos compuestos sintetizados, Zeabactina-m parece ser más activa que Zeabactina y Zeabactina-o. Es más, el ciclopropilo en posición orto tiene un impacto negativo en la actividad del compuesto ya que a pesar de que Zeabactina-o, puede unirse a los receptores SvPYL1-5 y en menor medida a SvPYL6, ZB-o no es activo en la inhibición de la germinación de semillas de Arabidopsis. El efecto sobre la raíz es similar al que produce zeabactina y los datos de las imágenes infrarrojas confirman una ligera reducción de la transpiración que sin embargo, ante un estrés por sequía no confiere resistencia a la planta. Por el contrario, el grupo ciclopropilo en meta aumenta considerablemente la actividad del compuesto. ZB-m activa los receptores SvPYL1, SvPYL2, SvPYL3, SvPYL4, SvPYL5 y SvPYL6, en mayor medida que Zeabactina y Zeabactina-o. Esta mayor afinidad se ve reflejada también en los ensayos *in vivo*. En Arabidopsis, ZB-m reduce el crecimiento de la raíz de forma importante, situándose cerca de los valores que produce quinabactina. En Setaria, el compuesto consigue igualmente durante las 48h post-tratamiento inhibir el crecimiento de la raíz, obteniendo un fenotipo similar al producido por quinabactina. Sin embargo a las 96h este efecto desaparece y el crecimiento de la raíz apenas es reprimido un 2%, lo que sugiere que a pesar de que el compuesto si es estable en el tiempo tal y como se vio en los ensayos con Arabidopsis, es probable que Setaria tenga un mecanismo que contrarreste el efecto de zeabactina-m y permita en un periodo de tiempo superior el crecimiento de la raíz. Asimismo los ensayos con imágenes infrarrojas confirman la eficacia que tiene este compuesto en el cierre estomático, reduciendo la transpiración de forma eficaz similar al que produce quinabactina en Arabidopsis y en Setaria al efecto producido por el ABA y quinabactina. Durante el lapso de tiempo que tiene lugar el ensayo de sequía, zeabactina-m consigue que las plantas de Arabidopsis retengan un mayor volumen de agua que las plantas control, incluso en las últimas fases del ensayo el volumen de agua se equipara al de las plantas tratadas con ABA. Sin embargo, en Setaria este efecto no se aprecia, ya que el valor significativo de una retención del volumen de agua solo aparece durante el segundo día del ensayo. Este

compuesto, al igual que quinabactina y AMF4 es útil para combatir el estrés hídrico en plantas dicotiledóneas pero no para plantas monocotiledóneas.

El diseño racional del compuesto agonista cyanabactina en *Arabidopsis* consigue inhibir la actividad de la PP2C en presencia de los receptores PYR1, PYL1 y PYL5 *in vitro* (Vaidya et al., 2017). Sin embargo, en presencia de los receptores de *Setaria* consigue inhibir la actividad de la fosfatasa en presencia de SvPYL1, SvPYL2, SvPYL3, SvPYL4 y SvPYL5 y SvPYL6 en menor medida. De manera similar, en ensayos realizados con receptores de trigo este compuesto se une a los receptores TaPYL1-7 (Vaidya et al., 2019). Esta diferencia entre la activación de los receptores de *Arabidopsis* y otras especies, una vez más sugiere que los pequeños cambios de la secuencia de aminoácidos que componen los receptores son suficientes para producir una actividad diferencial de compuestos agonistas, dando valor a los estudios realizados en plantas diferentes a *Arabidopsis*, como es el caso de este TFM.

En ensayos *in vivo* cyanabactina reduce el crecimiento de la raíz de *Arabidopsis* 48h post tratamiento, manteniéndose hasta los 6 días. Sin embargo, en *Setaria* este compuesto no tiene actividad sobre el control del crecimiento de la raíz. De la misma manera, este compuesto es el que tiene un menor impacto en el cierre estomático tanto de *Arabidopsis* como de *Setaria*, como queda reflejado en los ensayos realizados con la cámara de infrarrojos. En nuestros ensayos de sequía, este compuesto no ofrece una ventaja sobre los tratamientos control, ya que los datos arrojados no son significativos, ni en el caso de *Arabidopsis* ni en el de *Setaria*.

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la resistencia a la sequía orquestada por los compuestos agonistas no es una condición otorgada solamente por la reducción de la tasa de transpiración, sino que también intervienen otros mecanismos a posteriori, lo que explicaría por qué las plantas de *Setaria* a pesar de aumentar la temperatura foliar causado por una reducción de la transpiración, no confiere de resistencia a la sequía. Como hemos observado, la dinámica del cierre estomático ocurre 12h tras la aplicación del ABA/agonista en *Setaria*, a partir de ese momento la aplicación de un segundo spray con 100µM del ABA/agonista no genera el mismo efecto que el primero, por lo que debe de existir un mecanismo que inhiba o bien la

actividad o bien la percepción del ABA/agonista, haciendo que la planta sea menos sensible al efecto del ABA/agonista. Como se observó en los ensayos de crecimiento de raíz, *Setaria* es muy sensible al ABA y por lo tanto debe de existir un mecanismo de regulación fina que mantenga el “pool” de ABA en sus límites. Este mecanismo puede tener su origen en que las plantas no pueden mantener los estomas cerrados ya que en algún momento debe de regular la temperatura para que muchas de las reacciones que tengan lugar en las células se lleven a cabo correctamente y además mientras los estomas están cerrados la planta no puede fijar CO₂, por lo que no pueden crecer. Es por ello que algunos compuestos a pesar de conseguir reducir la transpiración, no parecen ser suficientemente fuertes como para conferir a las plantas de *Setaria* de resistencia a la sequía.

La caracterización y desarrollo de agroquímicos que confieran resistencia ante el estrés abiótico como es la sequía es una herramienta útil que nos brinda la oportunidad de cultivar plantas en un clima que cada vez se vuelve más adverso y hostil. La caracterización de estos compuestos en *Arabidopsis* y *Setaria* nos ha permitido establecer cuál es la eficiencia de cada compuesto en ambos modelos de estudio. Mientras que en *Arabidopsis* el compuesto AMF4 otorga más resistencia a la sequía que el propio ABA, en *Setaria* el ABA sigue siendo el único tratamiento que produce una mayor tolerancia a la sequía. Es necesario seguir estudiando y desarrollando nuevas estrategias que permitan identificar nuevos compuestos que interactúen con los receptores PYL/PYR/RCAR con la suficiente afinidad como para producir una respuesta anti-transpirante tanto en plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas.

CONCLUSIONES

- I. Las raíces de *Setaria viridis* son 10 veces más sensibles al ABA que las de *Arabidopsis thaliana*.
- II. Todos los compuestos agonistas estudiados en este TFM consiguen activar en menor o mayor medida los receptores del ABA *in vitro* pero no siempre generan un aumento de la resistencia a la sequía.
- III. Para una apertura máxima de los estomas de *Setaria viridis* se necesita un flujo de fotones de 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, frente a los 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de *Arabidopsis thaliana*.
- IV. Se ha conseguido poner a punto el método de termo-imágenes en plantas de *Setaria viridis*.
- V. El incremento de la temperatura de las hojas debido a la reducción de la transpiración en plantas de *Arabidopsis thaliana* ocurre 24h tras la aplicación del tratamiento con 50 μM de ABA/agonista y en *Setaria viridis* a las 12h post-aplicación del ABA/agonista a 100 μM .
- VI. Se ha conseguido caracterizar la actividad de los compuesto Zeabactina, Zeabactina-o y Zeabactina-m, siendo este último la forma más activa
- VII. Ninguno de los compuestos estudiados confieren una resistencia a la sequía a largo plazo, a excepción del ABA, en plantas de *Setaria viridis*, sugiriendo un mecanismo fino que regule los niveles endógenos de ABA/compuestos agonistas.
- VIII. Los cambios en los aminoácidos que componen el bolsillo de unión de ABA de los diferente receptores de cada especie determinan la especificidad por los compuestos agonistas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Análisis de termo-imagen.

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis* con un mes de edad que fueron cultivadas en un fitotrón de día corto con 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad a una temperatura de 21 °C grados durante el día y 19 °C durante la noche con una iluminación de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las plantas fueron rociadas con 2 mL aproximadamente de una solución compuesta por 10 mM MES, 0.02 % Silweet y 50 μM del compuesto correspondiente. Cada planta fue rociada homogéneamente por la mañana tras el encendido de luces y las macetas fueron dispuestas aleatoriamente en bandejas dejando un espacio entre cada planta para evitar así el contacto entre ellas. En experimentos de “time-lapse” realizados para determinar el tiempo que tarda la planta en reducir la transpiración se dejó la cámara infrarroja FLIR E95 tomando imágenes cada 10 minutos para poder captar el cambio en temperatura foliar durante 48 horas. Para los experimentos a un tiempo concreto, se registró la temperatura de las plantas 24h post-tratamiento mediante fotos térmicas dentro del fitotrón. Para la toma de las fotos infrarrojas, las macetas se manipularon con pinzas para evitar la transferencia de calor y se tomaron con la mayor brevedad posible para evitar cambios en la temperatura.

Para *Setaria viridis*, se usaron plantas de una semana que fueron crecidas en un fitotrón de día largo con 14 horas de luz a 27 °C y 10 horas de oscuridad a 24 °C. Para caracterizar la actividad de los compuestos, se utilizó una solución compuesta por 10 mM MES, 0.02% de Tween-20 y 100 μM del compuesto agonista. El spray fue realizado fuera del fitotrón tras encender las luces, rociando las plantas de manera homogénea y disponiéndolas en bandejas de manera aleatoria en el fitotrón. En experimentos de “time-lapse” realizados para determinar el tiempo que tardan las plantas de *Setaria* en reducir la transpiración se dejó la cámara infrarroja FLIR E95 tomando imágenes cada 10 minutos para poder captar el cambio en temperatura foliar durante 48 horas. Para los experimentos a un tiempo concreto se registró la temperatura de las plantas 12h después desde que se realizó el spray.

Posteriormente, para determinar la temperatura foliar registrada se procesaron las imágenes infrarrojas mediante el software FLIR Tools. Se analizaron 10 puntos de temperatura foliar por cada maceta y cada experimento contó al menos con 6 macetas. Cada experimento fue realizado tres veces.

Ensayos de crecimiento de raíz

Las semillas de *Arabidopsis* fueron esterilizadas con etanol al 70% y posteriormente con una solución desinfectante compuesta por 30% de lejía, 0.02 % Tween-20 durante 10 minutos en un agitador. A continuación fueron lavadas 5 veces con 1 mL de agua estéril y se sembraron sobre medio MS (4.3 g/L de sales MS, 1 % sacarosa, 1 % agar, pH 5.7) en placas petri de 90 mm. Las placas fueron estratificadas durante 3 días en cámara fría a 4 °C. A continuación, las placas fueron colocadas en la cámara de crecimiento (condiciones de 16 horas de luz, 8 horas de oscuridad) en posición vertical. Tras 3 días en crecimiento, las plántulas se transfirieron a una placas petri cuadradas de 90mm con medio MS (4.3 g/L de sales MS, 1 % sacarosa, 1 % agar, pH 5.7) y el compuesto agonista/ABA a una concentración de 10µM. Las plantas se dejaron crecer y las placas se escanearon a los 2 y a los 6 días tras transferirlas a las placas con los diferentes tratamientos. Se utilizaron 10 plantas por cada tratamiento en duplicado y el experimento se repitió 3 veces. Se midieron las raíces de las imágenes mediante el software Fiji.

En el caso de *Setaria*, es necesario quitar la testa de la semilla para mejorar la germinación. Tras eliminar la testa manualmente mediante fricción, las semillas se esterilizaron con una solución 30% de lejía, 0.02 % Tween-20 durante 10 minutos en un agitador y posteriormente se lavaron 5 veces con agua estéril. Estas semillas no se estratificaron sino que se sembraron en medio MS (4.3 g/L de sales MS, 1 % sacarosa, 1 % agar, pH 5.7) en placas petri cuadradas de 90 mm, y se dejaron en vertical en el fitotrón hasta que las raíces alcanzaran una longitud de 1 cm aproximadamente. Esta longitud se alcanzó por lo general a los 2 días. En ese momento, se transfirieron 8 plántulas a cada placa MS que contenía el tratamiento correspondiente. Las

placas se dejaron en posición vertical y se escanearon a los 2 y a los 5 días, midiendo las raíces a través del software Fiji. Se utilizaron 8 plántulas por tratamiento en duplicado y cada experimento se repitió 3 veces.

Ensayos de germinación

Los ensayos de germinación fueron llevados a cabo con semillas de *Arabidopsis Col-0* (silvestres) y una línea mutante *112458* insensible al ABA (González-Guzman et al., 2012). Tras esterilizar las semillas tal y como se describe previamente, se les agregó 1.5mL de TAP-Agar (0.12 % agarosa en agua) en un tubo Ependorf de 2mL y se agitaron para distribuir las homogéneamente. Posteriormente con la micropipeta electrónica se tomó 200 μ L de esta solución con las semillas y se distribuyeron 20 μ L (conteniendo 25 semillas aproximadamente) en cada pocillo de una placa de 24 pocillos que contenían 1 mL de medio MS sólido junto con el tratamiento correspondiente. Las placas se estratificaron durante 3 días. A continuación las placas se dejaron en horizontal en el fitotrón Sanyo a 24°C durante un periodo de 3 días en el cual cada 24h se tomó una foto de cada pocillo a través del Macroscopio Leica con un aumento x2 y un objetivo x 0.5.

Ensayos de actividad fosfatasa PP2C *in vitro*.

Para realizar los ensayos se utilizaron proteínas recombinantes producidas en *E.coli* tal y como se describió previamente (Vaidya et al., 2019). Para los ensayos enzimáticos, por un lado, se preparó un mix con 1 μ M de la fosfatasa PP2C dNHAB1 y 2 μ M de los receptores SvPYL1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 de *Setaria viridis*. A continuación, en una placa de 96 pocillos se añadió 1 μ L del compuesto agonista, 1 μ L MnCl₂ y 48 μ L del mix de la fosfatasa y cada uno de los receptores por separado. Posteriormente se dejaron los pocillos durante 10 minutos incubando y se agregaron 50 μ L de 50 mM p-nitrofenil-fosfato

(*pNPP*) como sustrato. Se monitorizó la absorbancia a 405 nM durante 20 minutos en un lector de placas VICTOR Multilabel Plate Reader. La actividad de la fosfatasa en ausencia de agonista o ABA se tomó como 100 % y la actividad de la fosfatasa en presencia de ABA o de los agonistas se calculó relativa a ese valor.

Ensayos de sequía

Tanto en el caso de plantas de *Setaria* como de *Arabidopsis*, antes de iniciar el experimento se pesó la tierra de cada maceta para que todos tuvieran la misma cantidad de sustrato. En el caso de *Arabidopsis*, se cultivó 1 planta por maceta durante aproximadamente un mes en condiciones de día corto (8 horas de luz y 16 horas de oscuridad), usando un mínimo de 6 plantas por tratamiento y repitiendo el experimento al menos 2 veces. Las plantas fueron rociadas con una solución 10 mM MES pH 5.7, 0,02 % Silweet y 50µM de compuesto agonista/ABA o la misma cantidad de DMSO como control, y se colocaron de manera aleatoria sobre una bandeja, momento en el que las plantas se dejaron de regar. Este ensayo tuvo una duración de 14 días en los cuales el día 1, 6 y 13 se realizó un spray y se registró el peso de las macetas en los días 1, 3, 4, 7, 10 y 14.

En el caso de *Setaria* se plantaron aproximadamente 25 semillas por macetero y se dejaron crecer durante 1 semana en un fitotrón con 14 horas de luz a 27 °C y 10 horas de oscuridad a 24 °C con una iluminación de 300 µmol..... Previo a la aplicación del spray con los compuestos agonistas, las macetas fueron saturadas de agua el día antes del ensayo. Tras aplicar el primer spray con una solución 10 mM MES pH 5.7, 0,02 % Silweet y 100µM de compuesto agonista/ABA o la misma cantidad de DMSO como control, las plantas fueron privadas de agua durante el resto del ensayo. El ensayo tuvo una duración de 8 días y se realizó tratamiento con los diferentes compuestos o DMSO como control, los días 1, 3 y 6.

BIBLIOGRAFÍA

Antoni, R., Gonzalez-Guzman, M., Rodriguez, L., Peirats-Llobet, M., Pizzio, G.A., Fernandez, M.A., De Winne, N., De Jaeger, G., Dietrich, D., Bennett, M.J., et al. (2012). PYRABACTIN RESISTANCE1-LIKE8 Plays an Important Role for the Regulation of Abscisic Acid Signaling in Root. *PLANT PHYSIOLOGY* 161, 931–941.

Belda-Palazon, B., Gonzalez-Garcia, M.-P., Lozano-Juste, J., Coego, A., Antoni, R., Julian, J., Peirats-Llobet, M., Rodriguez, L., Berbel, A., Dietrich, D., et al. (2018). PYL8 mediates ABA perception in the root through non-cell-autonomous and ligand-stabilization-based mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 115, E11857–E11863.

Brutnell, T.P., Wang, L., Swartwood, K., Goldschmidt, A., Jackson, D., Zhu, X.-G., Kellogg, E., and Eck, J.V. (2010). *Setaria viridis*: A Model for C4 Photosynthesis. *The Plant Cell* 22, 2537–2544.

Cao, M.-J., Zhang, Y.-L., Liu, X., Huang, H., Zhou, X.E., Wang, W.-L., Zeng, A., Zhao, C.-Z., Si, T., Du, J., et al. (2017). Combining chemical and genetic approaches to increase drought resistance in plants. *Nature Communications* 8.

Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., Finkelstein, R.R., and Abrams, S.R. (2010). Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. *Annual Review of Plant Biology* 61, 651–679.

Daryanto, S., Wang, L., and Jacinthe, P.-A. (2016). Global Synthesis of Drought Effects on Maize and Wheat Production. *PLoS ONE* 11, e0156362.

Dietrich, D., Pang, L., Kobayashi, A., Fozard, J.A., Boudolf, V., Bhosale, R., Antoni, R., Nguyen, T., Hiratsuka, S., Fujii, N., et al. (2017). Root hydrotropism is controlled via a cortex-specific growth mechanism. *Nature Plants* 3, 17057.

Forestan, C., Farinati, S., Zambelli, F., Pavesi, G., Rossi, V., and Varotto, S. (2020). Epigenetic signatures of stress adaptation and flowering regulation in response to extended drought and recovery in *ZEA MAYS*. *Plant Cell Environ* 43, 55–75.

Gonzalez-Guzman, M., Pizzio, G.A., Antoni, R., Vera-Sirera, F., Merilo, E., Bassel, G.W., Fernandez, M.A., Holdsworth, M.J., Perez-Amador, M.A., Kollist, H., et al. (2012). Arabidopsis PYR/PYL/RCAR Receptors Play a Major Role in Quantitative Regulation of Stomatal Aperture and Transcriptional Response to Abscisic Acid. *The Plant Cell* 24, 2483–2496.

He, Y., Hao, Q., Li, W., Yan, C., Yan, N., and Yin, P. (2014). Identification and Characterization of ABA Receptors in *Oryza sativa*. *PLOS ONE* 9, e95246.

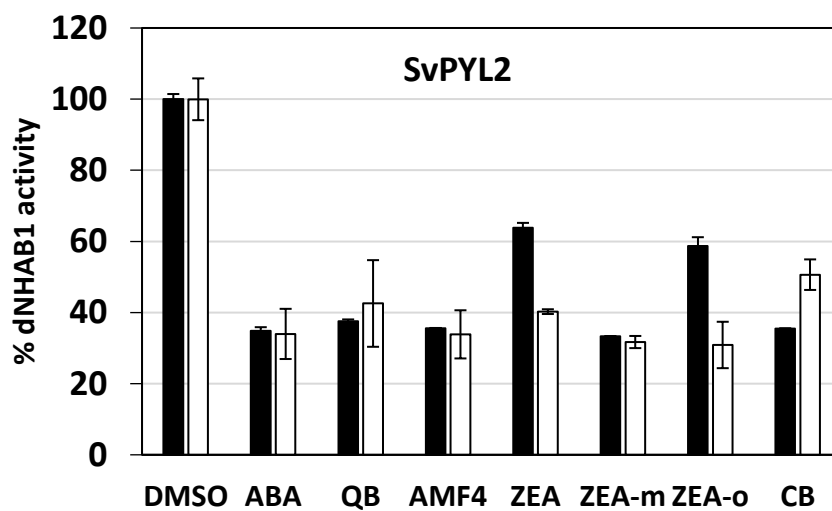
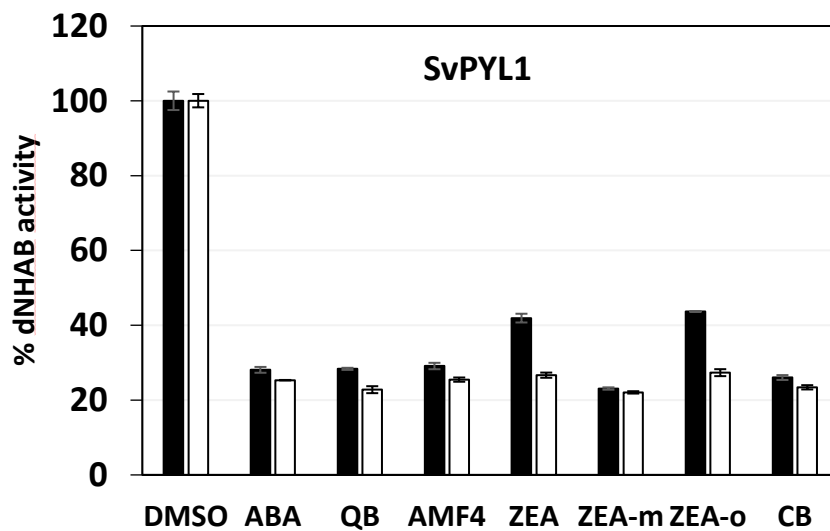
Helander, J.D.M., Vaidya, A.S., and Cutler, S.R. (2016). Chemical manipulation of plant water use. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 24, 493–500.

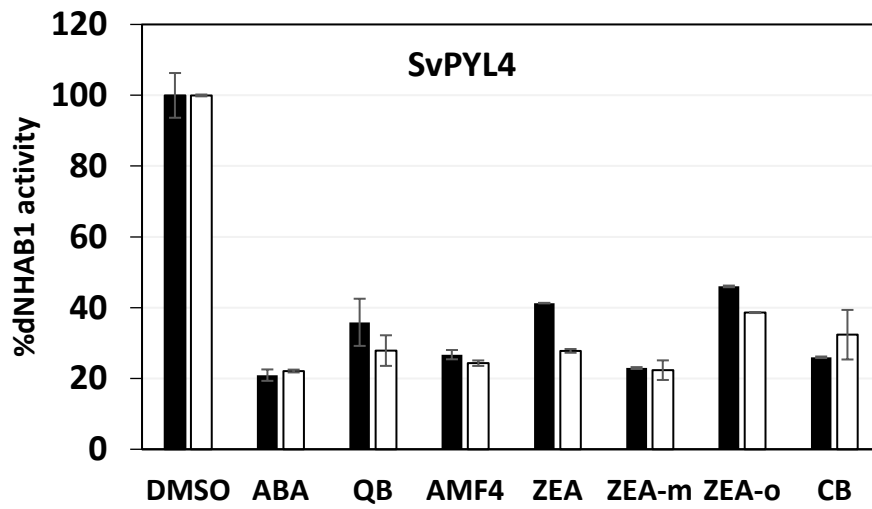
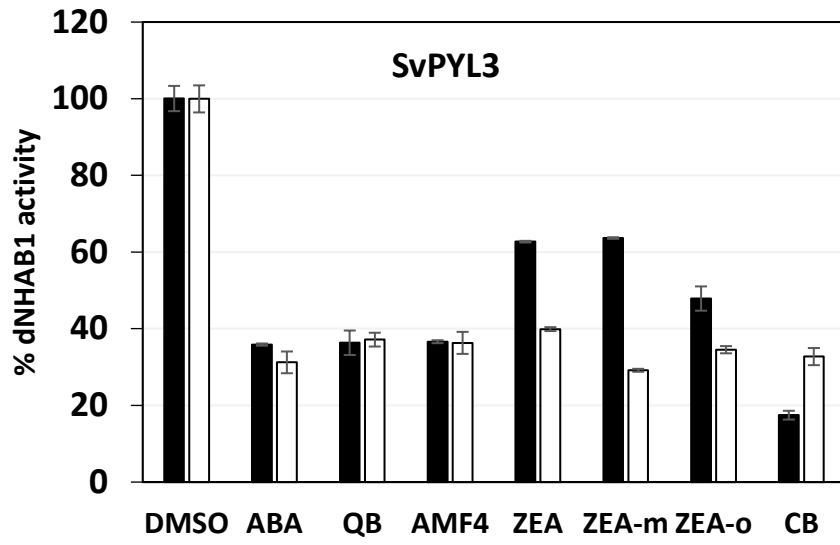
Kelly, S. (2019). The molecular evolution of C4 photosynthesis: opportunities for understanding and improving the world's most productive plants. *Journal of Experimental Botany* 70, 795–804.

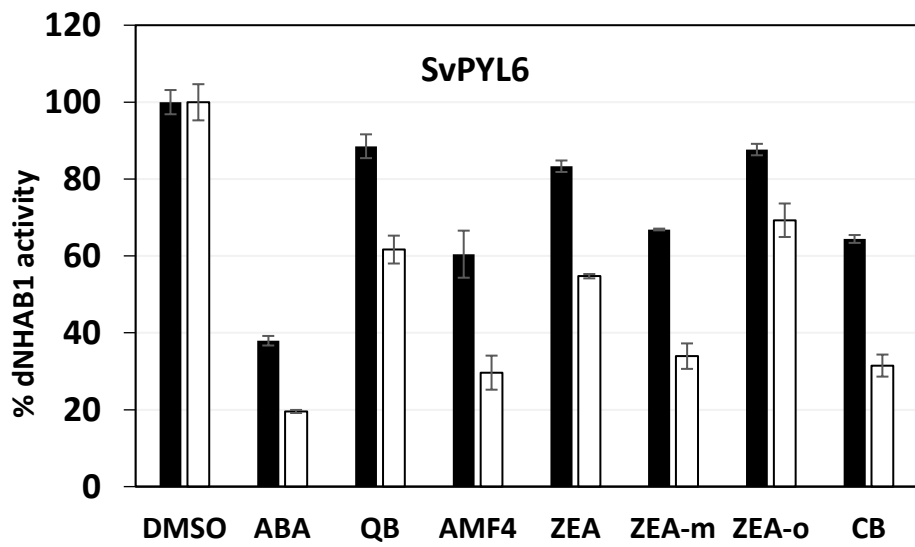
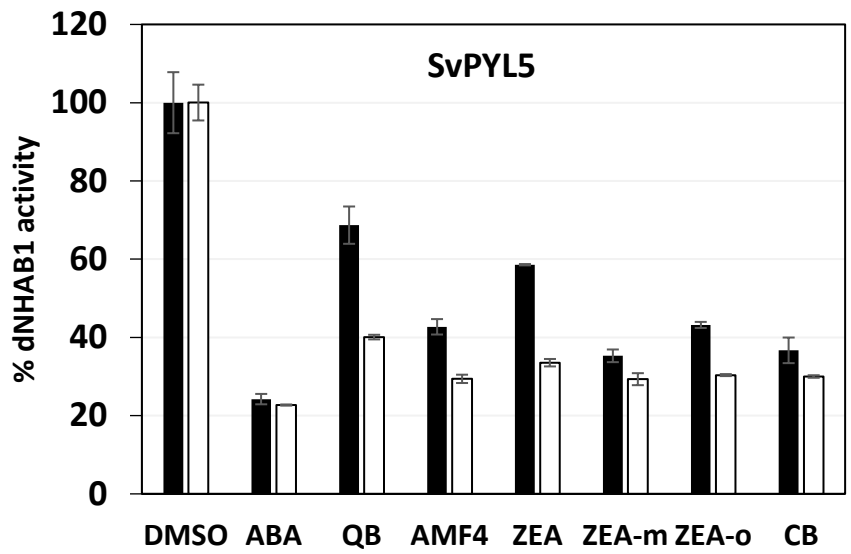
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., and Grill, E. (2009). Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Abscisic Acid Sensors. *Science* 324, 1064–1068.
- Mega, R., Abe, F., Kim, J.-S., Tsuboi, Y., Tanaka, K., Kobayashi, H., Sakata, Y., Hanada, K., Tsujimoto, H., Kikuchi, J., et al. (2019). Tuning water-use efficiency and drought tolerance in wheat using abscisic acid receptors. *Nat Plants* 5, 153–159.
- Min, M.K., Choi, E.-H., Kim, J.-A., Yoon, I.S., Han, S., Lee, Y., Lee, S., and Kim, B.-G. (2019). Two Clade A Phosphatase 2Cs Expressed in Guard Cells Physically Interact With Abscisic Acid Signaling Components to Induce Stomatal Closure in Rice. *Rice* 12, 37.
- Mustilli, A.-C., Merlot, S., Vavasseur, A., Fenzi, F., and Giraudat, J. (2002). Arabidopsis OST1 Protein Kinase Mediates the Regulation of Stomatal Aperture by Abscisic Acid and Acts Upstream of Reactive Oxygen Species Production. *Plant Cell* 14, 3089–3099.
- Nuccio, M.L., Paul, M., Bate, N.J., Cohn, J., and Cutler, S.R. (2018). Where are the drought tolerant crops? An assessment of more than two decades of plant biotechnology effort in crop improvement. *Plant Science* 273, 110–119.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 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.F., et al. (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324, 1068–1071.
- Pri-Tal, O., Shaar-Moshe, L., Wiseglass, G., Peleg, Z., and Mosquna, A. (2017). Non-redundant functions of the dimeric ABA receptor BdPYL1 in the grass *Brachypodium*. *Plant J* 92, 774–786.
- Ray, D.K., Mueller, N.D., West, P.C., and Foley, J.A. (2013). Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050. *PLoS ONE* 8, e66428.
- Rodriguez, P.L., Lozano-Juste, J., and Albert, A. (2019). PYR/PYL/RCAR ABA receptors. In *Advances in Botanical Research*, (Elsevier), pp. 51–82.
- Rudall, P.J., Chen, E.D., and Cullen, E. (2017). Evolution and development of monocot stomata. *Am. J. Bot.* 104, 1122–1141.
- Santiago, J., Rodrigues, A., Saez, A., Rubio, S., Antoni, R., Dupeux, F., Park, S.-Y., Márquez, J.A., Cutler, S.R., and Rodriguez, P.L. (2009). Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. *Plant J.* 60, 575–588.
- Seo, M., and Marion-Poll, A. (2019). Abscisic acid in plants (Cell).
- Vaidya, A.S., Peterson, F.C., Yarmolinsky, D., Merilo, E., Verstraeten, I., Park, S.-Y., Elzinga, D., Kaundal, A., Helander, J., Lozano-Juste, J., et al. (2017). A Rationally Designed Agonist Defines Subfamily IIIA Abscisic Acid Receptors As Critical Targets for Manipulating Transpiration. *ACS Chem. Biol.* 12, 2842–2848.

Vaidya, A.S., Helander, J.D.M., Peterson, F.C., Elzinga, D., Dejonghe, W., Kaundal, A., Park, S.-Y., Xing, Z., Mega, R., Takeuchi, J., et al. (2019). Dynamic control of plant water use using designed ABA receptor agonists. *Science* 366, eaaw8848.

ANEXO 1. Ensayos de actividad fosfatasa-PP2C.







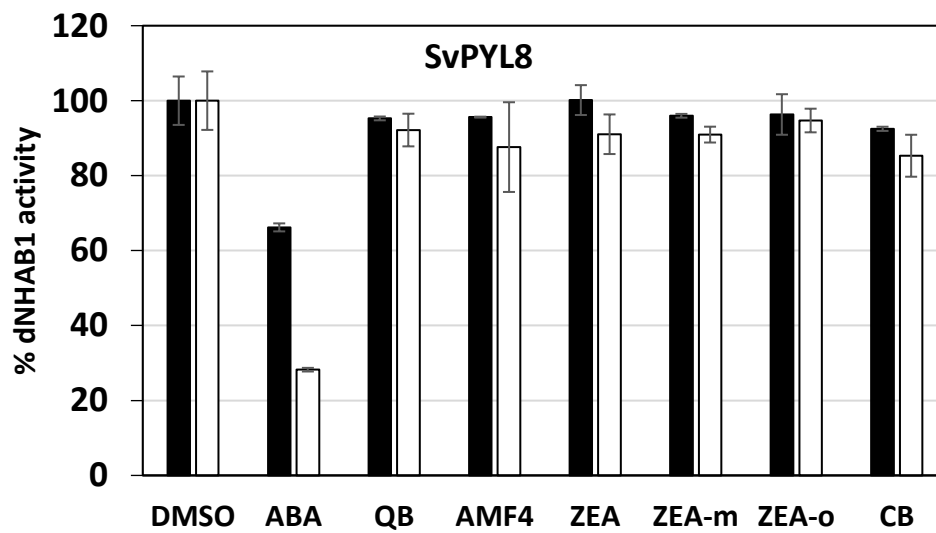
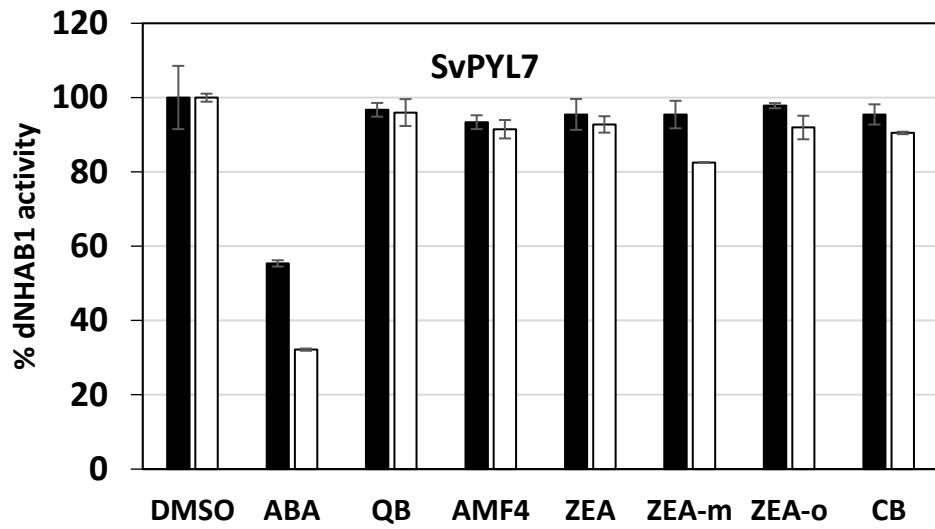


Figura 1S. Potencial de los compuestos agonistas contra los receptores SvPYL de *Setaria viridis*. SvPYL1-3 pertenecen al clado III, SvPYL4-7 al clado II y SvPYL8 al I.