

### III. OTRAS DISPOSICIONES

## MINISTERIO DE ECONOMÍA, INDUSTRIA Y COMPETITIVIDAD

- 541** *Resolución de 21 de diciembre de 2017, del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, por la que se publica el Convenio de colaboración con Timac Agro España, SA, para desarrollar nuevas moléculas vegetales que promuevan y potencien el desarrollo de las plantas.*

El Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, O.A., M.P (INIA), Organismo autónomo adscrito al Ministerio de Economía, Industria y Competitividad y Timac Agro España, S.A., han formalizado con fecha 13 de diciembre de 2017, un Convenio de colaboración, para desarrollar nuevas moléculas vegetales que promuevan y potencien el desarrollo de las plantas.

En cumplimiento de lo dispuesto en el artículo 48.8 de la Ley 40/2015, de 1 de octubre, de Régimen Jurídico del Sector Público, esta Dirección dispone su publicación en el «Boletín Oficial del Estado».

Madrid, 21 de diciembre de 2017.–El Director del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Manuel Láinez Andrés.

#### **CONVENIO ENTRE EL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA, O.A, M.P. Y TIMAC AGRO ESPAÑA, S.A.S. PARA DESARROLLAR NUEVAS MOLÉCULAS VEGETALES QUE PROMUEVAN Y POTENCIEN EL DESARROLLO DE LAS PLANTAS**

En Madrid, a ... de ... de 2017.

#### REUNIDOS

De una parte, don Manuel Láinez Andrés, Director del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, O.A., M.P. (en lo sucesivo INIA), con CIF Q-2821013-F, con sede en Madrid, carretera de la Coruña, km 7,5, en representación del mismo en virtud de la Orden ECC/1392/2012, de 8 de junio, por la que se dispone su nombramiento, actuando conforme a las atribuciones que le confiere el artículo 12.2.d) del Estatuto del INIA, aprobado por Real Decreto 1951/2000, de 1 de diciembre, modificado por Real Decreto 718/2010, de 28 de mayo.

Y, de otra parte, doña Amaya Ansa Yunta, como representante legal de «Timac Agro España, S.A.» (en lo sucesivo, TIMAC), con CIF número A31007644, domiciliada en Pol. Arazuri-Orcoyen, calle C, número 32, 31160 Orcoyen (Navarra), inscrita en el Registro Mercantil de Navarra en el tomo 129, folio 157, hoja NA-5254, con poder otorgado mediante escritura ante el Notario de Pamplona don Joaquín de Pitarque Rodríguez de 21 de diciembre de 2012 y número de protocolo 3.882.

Actuando ambos en razón de sus respectivas competencias y reconociéndose poderes y facultades suficientes para formalizar el presente convenio,

#### EXPONEN

Primero.

Que el INIA, organismo autónomo adscrito al Ministerio de Economía, Industria y Competitividad por el Real Decreto 531/2017, de 26 de mayo, por el que se desarrolla su estructura orgánica básica, actúa conforme a lo establecido en el Real Decreto 1951/2000, de 1 de diciembre, por el que se aprueba el Estatuto del Organismo, modificado por Real Decreto 718/2010, de 28 de mayo. Asimismo, de acuerdo con el artículo 34 de la

Ley 14/2011, de 1 de junio, de la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, el INIA como Organismo Público de Investigación, puede suscribir convenios para el desarrollo de proyectos y actuaciones de investigación científica, desarrollo e innovación.

Segundo.

Que TIMAC es una entidad dedicada al desarrollo de, fabricación y venta de fertilizantes.

Tercero.

Que el INIA, en su Departamento de Biotecnología del Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP), Centro Mixto de Investigación del INIA y la Universidad Politécnica de Madrid, desarrolla, entre otras, investigaciones relacionadas con caracterización de nuevos metabolitos que potencian el crecimiento del sistema radicular y de las plantas en condiciones normales de desarrollo y de estrés por deficiencia nutricional. Así, estos metabolitos son moléculas candidatas a formar parte de fertilizantes para potenciar el crecimiento y la productividad vegetal.

Cuarto.

Que tanto TIMAC como el INIA están de acuerdo en establecer una colaboración en materia de desarrollo de nuevas moléculas vegetales que potencien y promuevan el crecimiento de las plantas y su productividad. Para ello se desarrollarán nuevas vías de síntesis químicas de dichos metabolitos que se testarán en plantas en condiciones de invernadero y posteriormente en campo. También se analizará el efecto de estos metabolitos en las plantas tras su aplicación a nivel molecular, utilizando técnicas «ómicas» (ionómica, genómica y metabolómica principalmente). En una fase posterior, se incorporarán estos metabolitos en fertilizantes de liberación controlada y su uso en cultivos de interés agronómico.

Por todo ello, las partes acuerdan suscribir el presente Convenio, que se registrará conforme a las siguientes:

## CLÁUSULAS

Primera. *Objeto del convenio.*

El objeto del presente convenio es la colaboración de ambas partes en la realización de investigaciones relacionadas con el desarrollo de nuevas moléculas vegetales que potencien y promuevan el crecimiento de las plantas y su productividad, de acuerdo con la memoria técnica que se adjunta como anexo I.

Segunda. *Actuaciones de las partes.*

El INIA se obliga a desarrollar las actividades relacionadas con la generación de metabolitos, el crecimiento y análisis de las plantas en cultivo in vitro y en invernadero y los análisis moleculares del efecto de los metabolitos en plantas tratadas, de acuerdo con la memoria técnica que se incluye como anexo I (apartados 4 y 5).

Asimismo el INIA dará apoyo técnico y científico a la Dra. Ángela E. Sáez Somolinos, de la empresa Timac Agro, que se desplazará a las instalaciones del INIA para colaborar con el grupo del Dr. del Pozo en este trabajo.

El responsable del convenio en el INIA será el Dr. Juan Carlos del Pozo Benito, Científico Titular del INIA en el CBGP.

TIMAC se obliga a:

– Analizar la acumulación de nutrientes (iones) en plantas tratadas con y sin metabolitos mediante la técnica de IPS.

- Generar fertilizantes de nueva generación incluyendo los metabolitos sintetizados.
- Dar apoyo científico/técnico al laboratorio del Dr. del Pozo en el uso de fertilizantes en cultivos en invernadero y en futuras pruebas en campo.

La empresa TIMAC se compromete asimismo a aportar personal cualificado, en particular la Dra. Angela E. Saez Somolinos, especializada en el ámbito de las actividades a realizar dentro de este convenio, que desarrollará su trabajo en las instalaciones del INIA, con la supervisión del investigador responsable del Convenio en el INIA.

El responsable del convenio en la empresa TIMAC será don Marcos Boya Pradera.

#### Tercera. *Evaluación económica.*

La evaluación económica total para el periodo de duración del Convenio asciende a ciento veintiséis mil euros (126.000 €).

La valoración de la aportación que realiza el INIA se cuantifica en 62.000 euros, distribuidos en:

- Personal propio: 45.000 euros (15.000 €/año).
- Material fungible y utilización de instalaciones y equipos propios: 15.000 euros.
- Uso de espacio de cultivo de plantas: 2.000 euros.

La valoración de la aportación que realiza TIMAC se cuantifica en 64.000 euros, distribuidos en:

- Personal propio: 60.000 euros (20.000 €/año).
- Utilización de instalaciones y equipos propios y análisis iónicos: 4.000 euros.

El presente Convenio no conlleva aportación económica alguna entre las partes.

La financiación de las actividades de investigación objeto del presente Convenio se soportará por cada una de las partes, costeando cada una de ellas los importes derivados de sus propias tareas de investigación. En paralelo, se podrá solicitar conjuntamente financiación pública o privada para el desarrollo de estas actividades de investigación.

#### Cuarta. *Comisión de seguimiento.*

Se establecerá una Comisión de seguimiento con objeto de examinar la marcha de los trabajos, revisar su programación, si es necesario, y resolver las discrepancias, dudas o conflictos que se presente en la ejecución de las actividades del Convenio.

La Comisión de seguimiento se reunirá siempre que cualquiera de las partes lo estime oportuno y en un plazo máximo de 15 días tras la solicitud de convocatoria de cualquiera de las partes. Esta Comisión estará formada por dos representantes de cada una de las partes. Los representantes del INIA serán la Subdirectora General de Investigación y Tecnología o persona en quien delegue, que la presidirá, y el coordinador del convenio en el INIA. Los representantes de TIMAC serán Dr. Roberto Baigorri Ekisoain y D. Marcos Boya Pradera. Las decisiones en el seno de la Comisión se tomarán por unanimidad, siendo necesaria para su válida constitución la presencia de al menos un representante de cada parte.

En lo no previsto en el presente Convenio, y a falta de normas propias, la Comisión de seguimiento se regirá por lo establecido, para los órganos colegiados, en la Sección 3.ª del Capítulo II de la Ley 40/2015, de 1 de octubre, de Régimen Jurídico del Sector Público.

#### Quinta. *Información entre las partes.*

Cada parte se compromete a mantener informada a la otra parte firmante del presente Convenio, tanto de los resultados de los trabajos científico-técnicos alcanzados como de cualquier extremo relevante para la consecución del mismo.

Será necesario obtener previamente el acuerdo entre las partes para informar a terceros sobre el contenido y el desarrollo del Convenio y haciendo mención expresa a la existencia del mismo.

*Sexta. Propiedad de los resultados.*

Los resultados obtenidos tendrán carácter reservado y ambas partes mantendrán la confidencialidad sobre la información generada durante la ejecución de los trabajos del Convenio.

La propiedad de los resultados que eventualmente pudieran obtenerse, sin menoscabo de la normativa en la materia que les sea aplicable y del reconocimiento de la autoría, pertenecerá a las instituciones firmantes en los términos establecidos en el artículo 54 de la Ley 2/2011, de 4 de marzo, de Economía Sostenible, y de acuerdo con su grado de contribución en la obtención de aquéllos.

La posible publicación de los resultados en revistas científicas o de divulgación necesitará del permiso por escrito y expreso de ambas partes.

*Séptima. Régimen de personal.*

Cuando el personal de una de las partes desarrolle alguna actividad en una sede perteneciente a la otra, deberá respetar sus normas de funcionamiento interno sin que en ningún caso se altere su relación jurídica ni adquiera derecho alguno frente a ella, quedando, en todo caso, en el ámbito de la organización y dirección de la institución a la que pertenezca.

Serán de cuenta de cada parte, la cobertura de las obligaciones en materia de seguridad social, mutualidad, seguro de accidentes y todo tipo de cargas y gravámenes relativos al personal que aporten para la realización y desempeño de los trabajos objeto del presente Convenio. También serán responsables de la cobertura de la responsabilidad civil en que pudieran incurrir durante el desarrollo de los trabajos previstos en el mismo.

*Octava. Extinción.*

La extinción del Convenio será por conclusión o cumplimiento del mismo o por resolución. Son causas de resolución:

- a) El transcurso del plazo de vigencia del Convenio sin haberse acordado la prórroga del mismo.
- b) El acuerdo de las partes.
- c) El desistimiento unilateral, con un preaviso a la otra parte de al menos tres meses.
- d) El incumplimiento de las obligaciones y compromisos asumidos por parte de alguna de las partes. El incumplimiento será comunicado a la parte incumplidora, mediante preaviso, de forma fehaciente, con el requerimiento para que cumpla en el plazo de tres meses con las obligaciones o compromisos que se consideran incumplidos. Este requerimiento será comunicado a la persona que ostente la presidencia de la Comisión de Seguimiento. Si trascurrido el plazo indicado en el requerimiento persistiera el incumplimiento, la parte que lo dirigió notificará a la parte incumplidora la concurrencia de la causa de resolución y se entenderá resuelto el Convenio.
- e) Por decisión judicial declaratoria de la nulidad del Convenio.

En caso de resolución anticipada, se finalizarán las actividades que estuvieran en ejecución, sin perjuicio de las indemnizaciones procedentes por los daños y perjuicios ocasionados en caso de resolución por incumplimiento o desistimiento unilateral.

*Novena. Comienzo de efectos y duración del Convenio.*

La duración del presente Convenio, que surtirá efectos desde la fecha de publicación en el «BOE», previa inscripción en el Registro de Convenios del Sector Público Estatal,

será de 3 años. No obstante podrá ser objeto de prórrogas, cada vez por 1 año hasta un máximo de 2 veces, por acuerdo de las partes antes de su finalización, mediante la suscripción del correspondiente Acuerdo de Prórroga, sin que en ningún caso la duración total del convenio, incluidas las prórrogas, pueda ser superior a ocho años.

*Décima. Modificación del Convenio.*

El presente convenio podrá ser modificado por acuerdo de las partes, mediante la suscripción de la correspondiente adenda.

*Undécima. Confidencialidad y protección de datos.*

Ambas partes se comprometen a adoptar las medidas oportunas para respetar la confidencialidad y asegurar el tratamiento de los datos de carácter personal de acuerdo a la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.

*Duodécima. Régimen jurídico y resolución de conflictos.*

El presente Convenio se encuentra entre los previstos en el apartado c) del artículo 47.2 de la Ley 40/2015, de 1 de octubre, de Régimen Jurídico del Sector Público, y tiene su fundamento en lo establecido en el artículo 34 de la Ley 14/2011, de 1 de junio, de la Ciencia, la Tecnología y la Innovación. Asimismo, de acuerdo con lo previsto en el artículo 4.1.d) del texto refundido de la Ley de Contratos del Sector Público, aprobado por Real Decreto Legislativo 3/2011, de 14 de noviembre, queda excluido del ámbito de esta Ley, siéndole de aplicación en defecto de normas específicas, los principios de dicho texto legal para resolver dudas y lagunas que pudieran producirse.

Las cuestiones litigiosas a que pueda dar lugar la interpretación, modificación, efectos o resolución del presente Convenio serán resueltas en el seno de la Comisión de Seguimiento. Si no hubiera acuerdo, ambas partes se someten de común acuerdo a la jurisdicción y competencia de los Juzgados y Tribunales del orden civil o mercantil de la ciudad de Madrid para la resolución de las discrepancias que pudieran eventualmente surgir entre ellas.

En prueba de conformidad, y para la debida constancia de todo lo convenido, ambas partes firman el presente Convenio en duplicado ejemplar y en todas sus hojas, en el lugar y fecha al principio indicados.—El Director del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Manuel Láinez Andrés.—La representante de «Tímac Agro España, S.A.», Amaya Ansa Yunta.

## ANEXO I

## Convenio de colaboración INIA-TIMAC AGRO, S.A.

**Resumen:**

**Título:** Explorando nuevos metabolitos vegetales con función hormonal que promueven el crecimiento

Las tendencias demográficas predicen una duplicación de la población en 2050, lo que conllevará una mayor demanda de alimentos. Esta situación supone un gran reto científico, ya que urge aumentar la producción de cultivos, pero dentro de una agricultura más sostenible. El uso de la biotecnología y el desarrollo de nuevas estrategias es imprescindible para poder alcanzar estos nuevos hitos. La producción agrícola está directamente correlacionada con el crecimiento de las plantas, que a su vez está controlado por redes de señalización hormonal. La auxina es una hormona con un papel central, ya que participa en el control de la mayoría de los procesos biológicos de las plantas. La auxina se percibe mediante un sistema de co-receptores que implican a una proteína F-box que interacciona con sus dianas IAA. Este sistema co-receptor permite múltiples combinaciones: F-box (5 proteínas)-IAA (23 proteínas). Por ello, en la biología de las auxinas siempre se ha planteado la posible existencia de otras moléculas con función auxínica que regule diferentes procesos a través de co-receptores específicos. Recientemente, hemos identificado un nuevo metabolito que se acumula en raíces tratadas con alta radiación lumínica que tiene una estructura bi-auxínica modificada con un azúcar (BiAux). Hemos sintetizado químicamente BiAux y su aplicación a medio de cultivo de plantas parece inducir el crecimiento del sistema radicular y la expresión de marcadores moleculares de la respuesta a auxina. Sin embargo, otros procesos regulados por las auxinas no se ven afectados, por lo que es posible que BiAux tenga una función parcial, regulando procesos determinados. En este proyecto pretendemos verificar si BiAux actúa como una nueva hormona vegetal, cómo se percibe y qué rutas regula a nivel molecular. Para ello, contamos con un grupo multidisciplinar con experiencia en biología molecular de plantas, metabolómica, síntesis química y análisis de estructuras e interacciones de proteínas.

**Palabras claves:** plantas, productividad, hormonas, síntesis química, síntesis enzimática, interacción molecular

**SUMMARY**

**Title:** Exploring novel plant metabolites with hormone-like function that promote growth. Latest demographic trends predict a doubling of the population in 2050. This situation makes extremely urgent to increase crop production, but within sustainable agriculture, what represents a major challenge for scientist. The use of biotechnology and the development of new ideas and strategies is essential to achieve these milestones. Agricultural production is directly correlated with plant growth, which is mainly controlled by different hormonal signaling networks. The phytohormone auxin plays central role in controlling, in collaboration with other hormones and signaling pathways, almost all biological processes in plants. Auxin is perceived by a co-receptor system that involves a F-box protein and their targets, IAA. This co-receptor system allows multiple combinations in vivo: F-box (5 proteins) -IAA (23 proteins). Therefore, it is possible that other auxin-like molecules might regulate different processes through the interaction with specific co-receptors. We recently identified a novel metabolite that accumulates in roots. This new molecule has a structure composed by 2 auxin molecules that are modified with a sugar (BiAux). We have chemically synthesized BiAux and its application to plant culture mediums induces root growth and the expression of auxin response molecular markers. However, some auxin-regulated processes, such as root growth inhibition, is not affected by BiAux application, indicating that it may have a partial function as a molecule with "auxinic" function, regulating only certain processes. In this project we intend to verify if BIAUX, or BIAUX-modified molecules, act as a new hormone, to study how it is perceived and to identify what pathways are regulated by this novel compound. To do this, we have built a multidisciplinary group with expertise in plant molecular biology, chemical synthesis and analysis of protein structures and interactions.

**Keywords:** plants, productivity, hormones, chemical synthesis, molecular interaction

## PROPUESTA CIENTÍFICA

### **Problema actual: incremento de la población mundial, mayor demanda de alimentos.**

El siglo pasado ha sido testigo de un extraordinario éxito de la mejora de plantas y de técnicas agronómicas, “*la revolución verde*”, que dio lugar a la duplicación de la productividad de los cultivos consiguiéndose un importante descenso mundial del hambre. Las tendencias demográficas actuales predicen una duplicación de la población en 2050 que demandará una mayor producción de alimentos. Por lo tanto, existe una urgente necesidad de mantener o incluso aumentar los incrementos de producción de cultivos. En la *revolución verde*, el incremento de la productividad agrícola fue en gran medida el resultado del aumento del uso de insumos, agua y fertilizantes, además de la mejora genética. Sin embargo, ahora nos enfrentamos a un reto fundamentalmente diferente: aumentar el rendimiento de los cultivos dentro de un sistema sostenible: menor uso de fertilizantes, agua y pesticidas, y que se adapte al cambio climático (Tilman et al 2002). Por ello, para poder dar demanda a estos nuevos retos, la ciencia debe hacer uso de nuevas herramientas biotecnológicas que permitan incrementar la productividad agrícola dentro de una agricultura más sostenible.

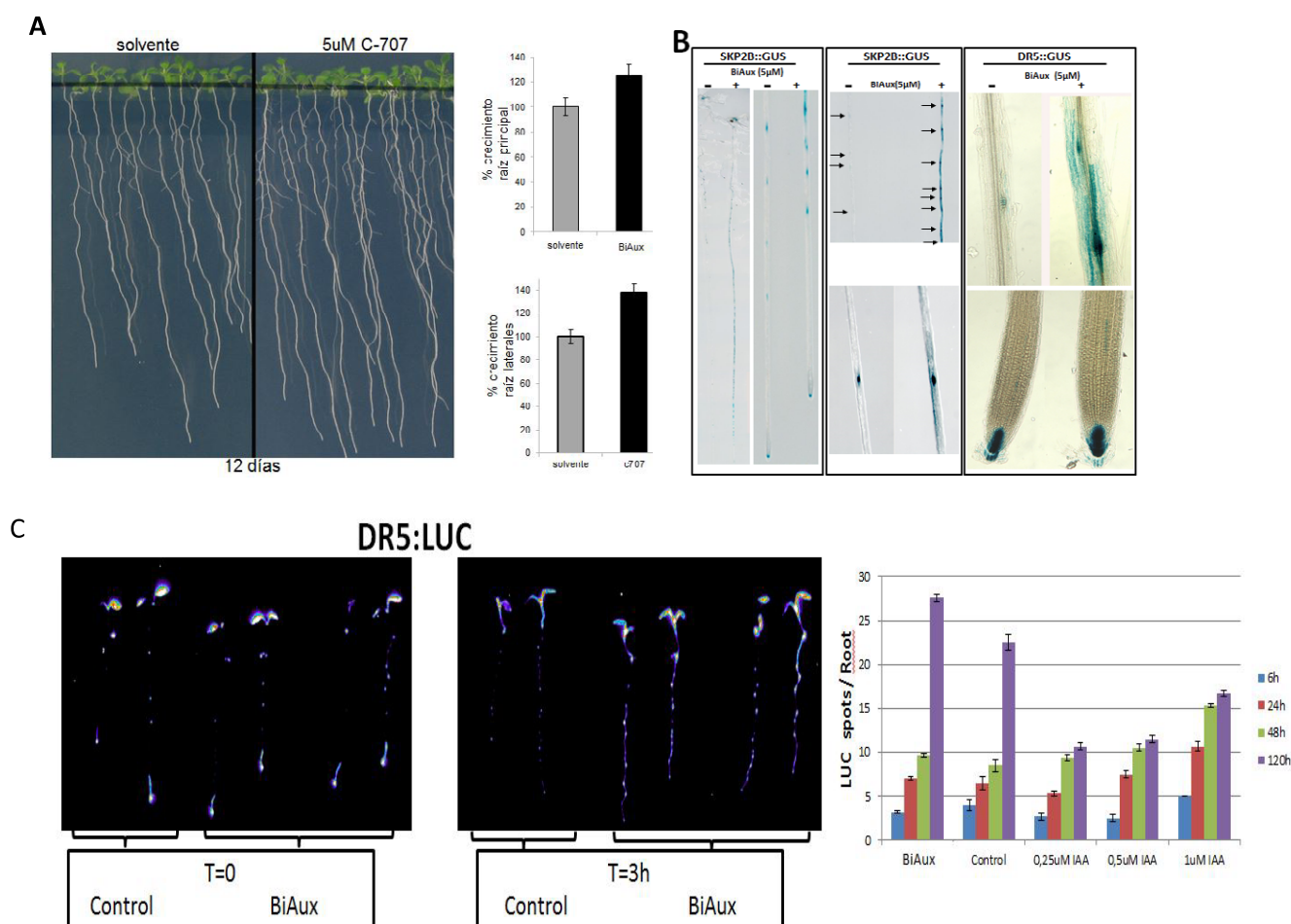
### **Marco conceptual o experimental del problema en la actualidad:**

Tradicionalmente, el sistema radicular no ha sido objeto de mejora para incrementar la producción de las plantas. Sin embargo, es obvio que, debido a su función básica en la captación de nutrientes y agua, así como la interacción con la micro-flora del suelo, una mejora del sistema radicular sea importante para mejorar el crecimiento y producción de las plantas. Tradicionalmente se han utilizado extractos de ácidos húmicos para fomentar el crecimiento de las plantas. Sin embargo, estos extractos son variables y se desconoce por completo el/los principios activos que promueven este crecimiento (Mora et al., 2012; Canellas et al., 2013). En esta línea, también se han utilizado bacterias y hongos como agentes de promotores del crecimiento de las plantas, debido a que estos microorganismos producen metabolitos que promueven el crecimiento (Ahemad, 2014; Gera Hol et al., 2014). Otra alternativa sería la identificación de moléculas bio-activas que favorezcan la formación del sistema radicular y paralelamente la toma de los nutrientes del medio y/o favorezcan su uso eficiente en la planta. En este sentido, cabe resaltar que existen en la actualidad amplias colecciones de moléculas, tanto de origen natural como sintetizadas químicamente al azar. Estas colecciones se han utilizado con éxito para estudiar procesos biológicos a nivel molecular, genético, morfológico o para la identificación de nuevas moléculas con función farmacológica (Futamura et al., 2013; Schenone et al., 2013). Concretamente en el ámbito de las plantas, estas colecciones se han utilizado para identificar nuevos componentes de rutas de señalización o potenciadores de la resistencias a patógenos entre otros procesos (Audenaert et al., 2013; Xuan et al., 2013; Hu et al., 2013). La prospección de colecciones de moléculas para buscar sustancias potenciadoras del crecimiento es una alternativa biotecnológica muy interesante y con alto potencial. Sin embargo, uno de los escollos más serios en este planteamiento sería el uso de sustancias químicas no-naturales, ya que requeriría la aprobación de diferentes agencias de

seguridad alimentaria y humana antes de su uso y comercialización. Por ello, la identificación de moléculas o metabolitos naturales, producidos por las propias plantas, sería una opción perfecta ya que su uso no plantearía este tipo de problemática.

### Propuesta alternativa: Identificación funcional de metabolitos de planta que promuevan el crecimiento

Recientemente, en el laboratorio del Dr. del Pozo se ha identificado un metabolito que se acumula en las raíces de un mutante que tiene afectado el proceso de *N*-glicosilación de proteínas. Este metabolito, BiAux, tiene una estructura basada en 2 moléculas de auxina (éster metílico del ácido indol-acético dimerizado) metiladas y la modificación de una de ellas con un azúcar (posiblemente glucosa) acetilado. Este metabolito se acumula por efecto de la radiación lumínica sobre el sistema radicular y por el estrés causado por deficiencia de fósforo en las plantas. En colaboración con el grupo de la Dra. Hernaiz (UCM) se ha logrado sintetizar este compuesto mediante síntesis química en el laboratorio. Al añadir BiAux al medio de cultivo de plantas hemos observado que promueve la formación y el crecimiento de las raíces laterales (LR), incrementando el sistema radicular (Fig. 1A).



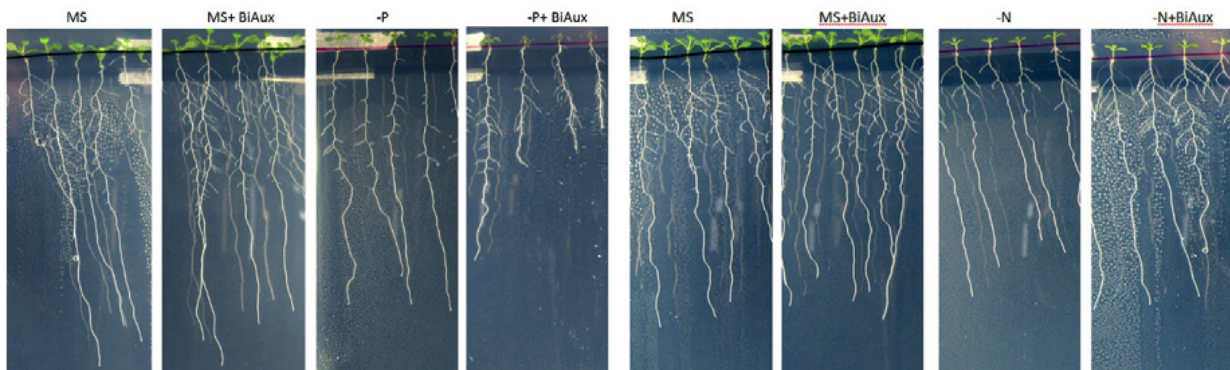


**Figura 1: Efecto de BiAux sobre el desarrollo radicular.** **A)** Plantas de *Arabidopsis* se crecieron durante 12 días en medio MS con o sin 5  $\mu$ M de BiAux. Se aprecia un mayor número de raíces laterales (RL) emergidas. El panel de la derecha indica el aumento de la longitud relativa de la raíz principal o del crecimiento de la longitud de las raíces laterales de plantas tratadas con BiAux respecto a las tratadas con el solvente, mostrando una amplificación del sistema radicular total. **B)** BiAux induce la expresión de marcadores de formación de raíces laterales (SKP2Bp::GUS) y de respuesta a las auxinas solo en los puntos de emergencia de RL. **C)** BiAux induce más número de primordios de raíces laterales que la auxina endógena IAA. Plántulas portadoras del marcador DR5:LUC se cultivaron durante 5 días en medio MS. Posteriormente se pasaron a medio nuevo conteniendo mock, BiAux (5  $\mu$ M) o diferentes concentraciones de IAA indicadas en la figura durante 6, 24, 48 o 120 horas. A estos tiempos se analizó el número de puntos que expresaban LUC que se corresponden con los primordios de raíces laterales.

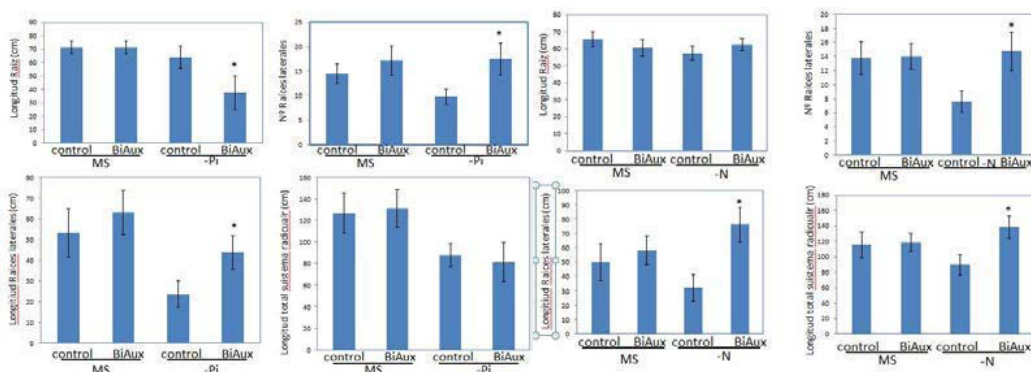
Es remarcable que el tratamiento con BiAux induce la expresión de marcadores moleculares de la respuesta a auxinas, como es la expresión de DR5:GUS en la zona de formación de raíces laterales, pero no en los meristemos (Figura 1B). Sin embargo, otros procesos regulados por las auxinas, y en principio, negativos para el sistema radicular, como es la inhibición de la elongación de las raíces, no se ven afectados por BiAux. Por ello, es posible que BiAux funcione, al menos parcialmente, como hormona “auxínica”, regulando sólo algunos procesos determinados. La auxina se percibe por un sistema de co-receptores que implica a una proteína F-box (familia TIR1/AFBs), E3 ligasas de ubiquitina, y sus dianas de degradación, los represores transcripcionales Aux/IAA (Dharmasiri et al., 2005a). La auxina natural IAA (indol-acetic acid) favorece la interacción entre TIR1/AFBs y los IAA, actuando como pegamento molecular. La complejidad de este sistema de co-receptores es muy alta, ya que son 5 F-box diferentes (Dharmasiri et al., 2005b) y 29 Aux/IAA (Liscum and Reed, 2002). Todas estas combinaciones podrían explicar por qué la auxina es una hormona central que regula básicamente todos los aspectos del desarrollo de las plantas. Sin embargo, cabe preguntarse: ¿es solo el IAA, o hay otras moléculas naturales, las que regulan la actividad de TIR/AFBs-Aux/IAA para dar respuestas concretas durante el desarrollo? Se han identificados diferentes conjugados de las auxinas *in vivo*. Por ejemplo, auxinas conjugadas con aminoácidos que parecen actuar como reservorio de auxinas para su liberación puntual (Hangarter and Good, 1981, Kramer et al., 2015, Yu et al., 2015). También se ha encontrado que metil-IAA tiene una posible función auxínica, ya que la acción de esterasas que eliminan el metilo liberarían IAA activo (Yang et al., 2008; Westfall et al., 2013). Sin embargo, aunque el tratamiento con metil-IAA genera un fenotipo similar al encontrado con la aplicación de IAA, el metil-IAA no se ha encontrado *in vivo* en las plantas. Asimismo se ha utilizado la síntesis química para modificar la molécula IAA y obtener nuevas moléculas funcionales (potenciadores o inhibidores de la señalización de las auxinas) para entender mejor su función (Hayashi and Overvoorde, 2013).

Como se comentó anteriormente, el estudio del sistema radicular ha tenido una escasa relevancia comparada con el estudio de los órganos aéreos en los programas de mejora vegetal, aunque el sistema radicular ha sido utilizado en programas de mejoras a través de su uso como porta-injertos. Debido a las crecientes necesidades de cultivo, las deficiencias nutricionales de los suelos, la escasez de agua y el cambio climático hacen que la manipulación de los sistemas radiculares para hacer los cultivos más eficientes y poder desarrollar una agricultura más sostenible sea una opción biotecnológica con grandes perspectivas (de Dorlodot et al., 2007; Den Herder et al., 2010).

En las últimas décadas, el incremento de la productividad agrícola fue en gran medida el resultado del aumento del uso de insumos, agua y fertilizantes, además de la mejora genética. Las plantas requieren diversos macro- y micro-nutrientes minerales para su crecimiento. De hecho, uno de los determinantes más relevantes de la productividad agrícola es el estatus nutricional de las cosechas, especialmente en lo concerniente a nitrógeno (N) fósforo (P) y potasio (K). Tradicionalmente el problema de la nutrición se ha solucionado con aportes masivos de los nutrientes en los fertilizantes. Esta práctica conlleva problemas importantes, como lo es el coste económico de las materias primas y el problema medioambiental del aporte en exceso de nutrientes, que es lavado por las lluvias y contamina los acuíferos promoviendo la eutrofización (Lewis et al., 20014; Ansari et al., 2014). Resultados preliminares apuntan a que la aplicación de BiAux cambia la morfología del sistema radicular en condiciones de deficiencia de N y de P, por lo que es posible que también cambie la capacidad de asimilación de estos nutrientes, favoreciendo su crecimiento (Fig. 2).



**Figura 2A:** Efecto de BiAux durante el crecimiento de las plantas en deficiencia de fósforo (-P) o de nitrato (-N) durante 12 días. BiAux acorta el sistema radicular durante la deficiencia de P pero estimula mucho sistema lateral durante la deficiencia de nitrato.



**Figura 2B:** Cuantificación del crecimiento del sistema radicular primario y secundario en plantas crecidas en medio rico MS o en medios sin fósforo (-Pi) o menos nitrógeno (-N) en presencia o ausencia de BiAux (5µM)

### Objetivos propuestos:

Creemos que poder identificar cómo funciona BiAux a nivel fisiológico y molecular, cómo se percibe y obtener nuevas de BiAux modificadas para que sean más eficientes será de gran importancia como herramienta biotecnológica para poder incrementar la productividad con sustancias naturales. Para ello, proponemos una serie de objetivos:

1. Mejorar el proceso de síntesis de BiAux, haciendolo más sostenible.
2. Obtener nuevas moléculas de BiAux con ligeras modificaciones en condiciones más sostenibles.
3. Estudiar cómo perciben BiAux las plantas.
4. Analizar a nivel molecular las rutas inducidas por BiAux.
5. Estudiar el efecto de estas nuevas moléculas en cultivos agronómicos. Aquí TimacAgro podría contribuir directamente :
  - Cuantificación de nutrientes en plantas modelos (*Arabidopsis* y cultivos) tratadas con o sin BiAux en cultivo *in vitro* y en invernadero
  - TimacAgro: Podría proporcionar sustratos de tierras con concentraciones de nutrientes conocidas/controladas. Fertilizantes mezclados con BiAux para valorar su efecto en cultivos en invernadero.

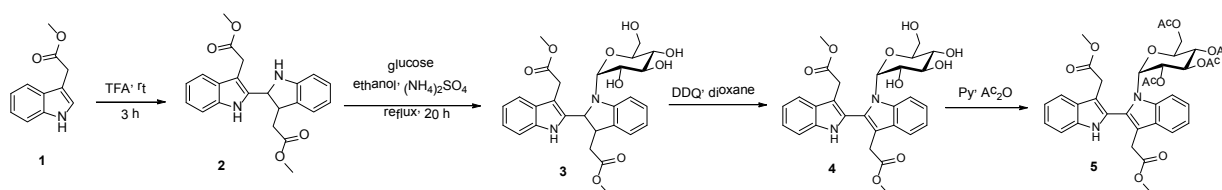
Para llevar a cabo este proyecto, hemos organizado un consorcio con investigadores que tienen una amplia experiencia en procesos de síntesis química y enzimática (Dra. Hernaiz y Dra. Hoyos) de la Universidad Complutense de Madrid, en biología molecular y celular y en la respuesta a las auxinas en plantas (Dr. Carlos del Pozo) INIA y en estudios *in silico* de interacciones moleculares proteína-ligando (Dr. F. Pacios) Universidad Politécnica de Madrid. Este grupo multidisciplinar reúne la experiencia necesaria para llevar a cabo los objetivos planteados, y garantiza la realización de un proyecto científico de alta calidad.

### Metodología y herramientas utilizadas

#### 1. Optimización del proceso de síntesis química de BiAux.

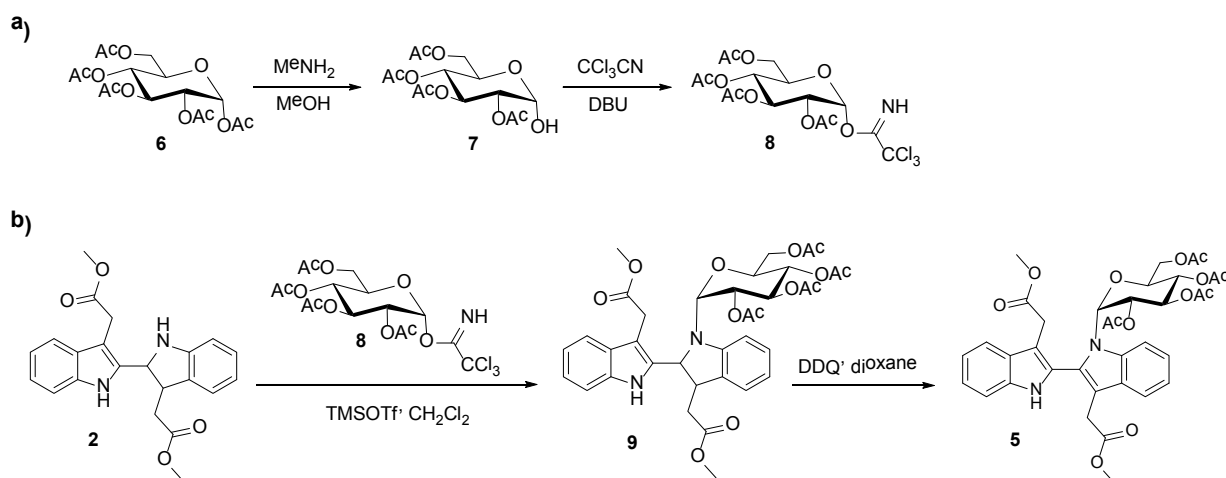
Esta experimentación se llevará a cabo en la Universidad Complutense de Madrid.

La obtención de BiAux (**5**, Esquema 1) se ha descrito a través del proceso sintético mostrado en el Esquema 5 1, mediante 5 pasos de reacción a partir del éster metílico del ácido indolacético (IAA, **1**) (Chisholm y Vranken, 1995, Gilbert *et al.*, 1997, Bergman *et al.*, 2000). Esta ruta incluye un paso de glicosilación del intermedio **2**, a través de metodologías de química clásica de azúcares, responsable de la obtención de bajos rendimientos del producto final **5**.



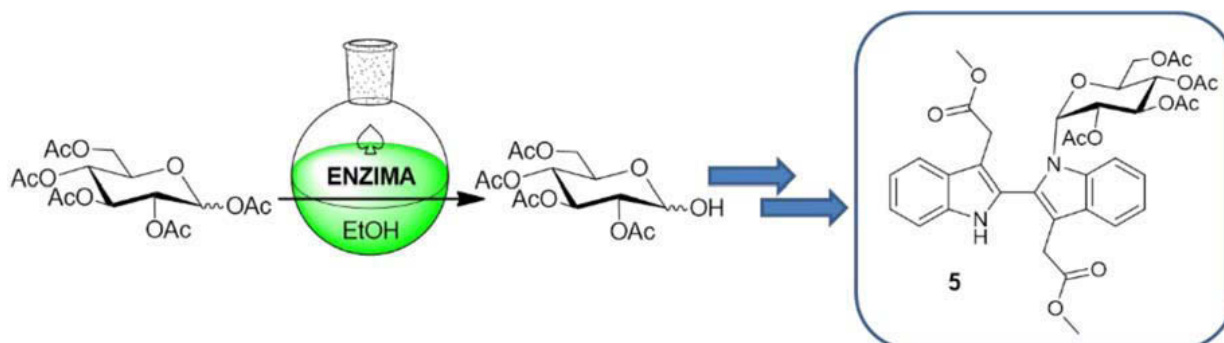
### Esquema 1. Síntesis descrita de BiAux.

Hoy en día existen estrategias sintéticas en el campo de la química de azúcares que permiten mejorar los rendimientos obtenidos en las reacciones de glicosilación, tales como la activación de la posición anomérica (Nicolaou and Mitchell, 2001). Por ello proponemos la inclusión de estas nuevas estrategias en la preparación de BiAux y derivados, tal y como se plantea en el Esquema 2a. Mediante la activación de la posición anomérica del azúcar peracetilado con la formación del tricloroacetimidado se pueden aumentar considerablemente los rendimientos, así como extender esta metodología a la glicosilación del intermedio **2** con otros azúcares diferentes a glucosa (Esquema 2b), con el fin de preparar análogos de BiAux y estudiar su actividad.



### Esquema 2. Nuevas estrategias de síntesis de BiAux.

Por otro lado, la implementación de la biocatálisis en la preparación de derivados glicosilados ha permitido reducir enormemente los pasos de reacción ya que la exquisita regio- y quimioselectividad de las enzimas evita la necesidad de utilizar numerosos pasos de protección y desprotección. En este contexto, planteamos dos rutas quimioenzimáticas para la preparación de BiAux, de forma que se pueda simplificar su síntesis a la vez que se aumenta considerablemente la sostenibilidad del proceso. En la **primera aproximación** se propone la utilización de lipasas como catalizadores de la desacilación selectiva de la posición anomérica de azúcares peracetilados mediante procesos de alcoholisis o hidrólisis. El equipo de trabajo posee una amplia experiencia en este campo, mediante la desacetilación selectiva de la posición anomérica de azúcares peracetilados catalizada por la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* (PSL), por lo que esta estrategia puede ser fácilmente utilizada en la preparación de BiAux (Sandoval et al., 2014). De esta manera se simplificará la ruta sintética y se evitará la utilización de reactivos como piridina, necesarios en la síntesis tradicional de BiAux (Esquema 3).



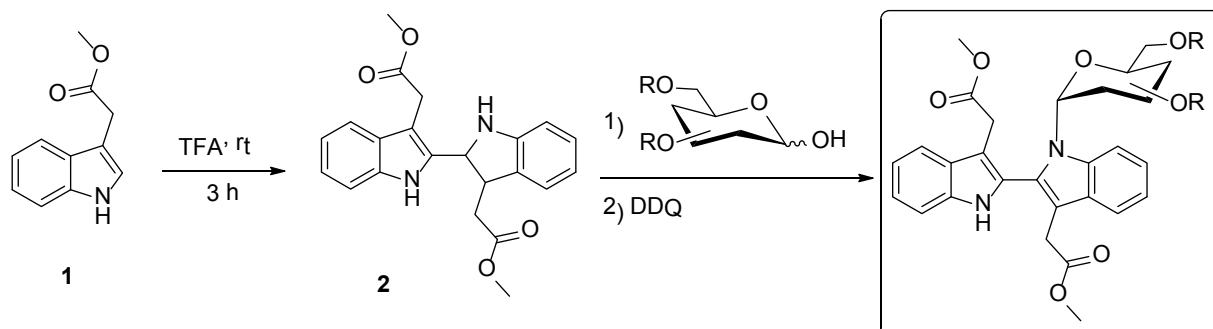
**Esquema 3.** Alternativas biocatalíticas basadas en la utilización de lipasas para la obtención de intermedios sintéticos de BiAux.

La productividad del proceso puede verse también mejorada mediante la inmovilización del biocatalizador, ya que así se haría posible su recaptación del medio de reacción y su reutilización. En este contexto, se estudiarán diferentes métodos de inmovilización de lipasas sobre diferentes soportes activados en las que nuestro grupo de investigación tiene una amplia experiencia (Aires-Trapote, et al., 2015). Además, este tipo de reacciones pueden llevarse a cabo en disolventes catalogados como sostenibles, tales como los bio-disolventes (disolventes que provienen de biomasa), reduciendo el impacto medioambiental del proceso sintético. También se estudiará el empleo de este tipo de disolventes en otros pasos del esquema sintético propuesto anteriormente, con esta misma finalidad.

Como **segunda aproximación biocatalítica** que puede optimizar la preparación de BiAux se basa en el empleo de enzimas glicosidasas y glicosintasas ya que estas enzimas son capaces de llevar a cabo la reacción de transglicosidación en condiciones sostenibles. Para ello proponemos utilizar glucosidasas y manosidasas capaces de introducir el resto del azúcar en el esqueleto indólico.

## 2. Obtener nuevas moléculas de BiAux con modificaciones.

Debido a que no se ha podido determinar si **BiAux contiene una molécula de glucosa o manosa** in planta, es necesario sintetizar BiAux con ambos azúcares para analizar su actividad. Una vez optimizada la preparación de BiAux utilizando glucosa peracetilada en la glicosilación del dímero de IAA, esta metodología se extenderá a la preparación de análogos mediante el empleo de diferentes azúcares peracetilados. Así, se prepararán análogos que contengan galactosa o manosa peracetilados, cuya actividad se estudiará a continuación. Dependiendo de los resultados se podrá analizar el efecto de modificar el azúcar con sulfato, amino, azida o simplemente hidroxilo desprotegido, con el fin de identificar nuevos metabolitos con mayor actividad biológica (Esquema 4).



Esquema 4. Diferentes modificaciones del azúcar que se incorpora al esqueleto del bi-indol.

### 3. Identificación del sistema de percepción de BiAux.

Como se comentó anteriormente, las auxinas naturales, y otras sintéticas como el 2,4-D, se perciben por un sistema de co-receptores. Para facilitar el estudio funcional de estos co-receptores, en el laboratorio del Dr. M. Estelle se desarrolló un sistema de doble híbrido que permite analizar la interacción entre diferentes miembros de la familia TIR1/AFBs con los miembros de la Aux/IAA en levaduras. En presencia de auxina en el medio de cultivo de las levaduras se favorece la interacción entre TIR1/AFBs y los factores Aux/IAA (Calderón Villalobos et al., 2012).

Utilizando este sistema queremos **analizar la interacción entre diferentes miembros de la familia AFB y Aux/IAA en presencia de BiAux**. Se utilizará IAA como control positivo y etanol como control negativo. Asimismo, también se analizará si BiAux interfiere con la interacción entre TIR1-Aux/IAA en presencia de la auxina natural IAA.

Asimismo, utilizando las estructuras cristalográficas de complejos de TIR1 con auxina natural (IAA) u otros compuestos auxínicos (códigos PDB 2P1N, 2P1O, 2P1P y 2P1Q), el Dr. F. Pacios estudiará en primer lugar las **interacciones en el sitio de unión de TIR1 con BiAux y BiAux modificados**, ligandos cuyas geometrías se modelarán con programas de Mecánica Molecular. Se comenzará con cálculos de “docking” para obtener la estructura de los diferentes complejos TIR1-BiAux y posteriormente se analizarán las interacciones proteína-ligando mediante cálculos de Mecánica y/o Dinámica Molecular. Estos estudios nos indicarán si BiAux puede potencialmente unirse a TIR1/AFBs. En caso afirmativo, en un futuro proyecto se analizará dicha unión utilizando BiAux radiactivo (Jurado et al, 2010).

SKP2A es una proteína implicada en el control de la división celular que también une auxinas (Jurado et al. 2010). Por tal motivo, se analizará si SKP2A puede unir también BiAux o BiAux-modificados partiendo del sitio de unión caracterizado en la proteína (Jurado et al. 2010) para explorar otras posibles regiones de interacción. Esta tarea, que será competencia del Dr. F. Pacios, requerirá de cálculos de docking sistemáticos, evaluación de las diferentes afinidades proteína-ligando mediante cálculos de Mecánica Molecular y selección del sitio de unión preferente, caso de que SKP2A muestre la posibilidad de unir BiAux o BiAux-modificados. En caso afirmativo, en un futuro proyecto se analizará dicha unión utilizando BiAux radiactivo.

#### 4. Estudio funcional de BiAux a nivel molecular.

El tratamiento de plantas con BiAux induce cambios en la morfología de la raíz. Por ello, identificar qué efectores moleculares están afectados es básico para poder entender la función de BiAux y su posible uso como regulador del crecimiento de plantas. Para ello proponemos llevar a cabo un **análisis transcriptómico** mediante RNAseq. Plantas de Arabidopsis se crecerán durante 12 días en presencia o ausencia de 5  $\mu\text{M}$  de BiAux. El RNA total de las raíces y parte aérea se purificará y se analizará mediante la tecnología de RNAseq de forma independiente (se subcontratará a la empresa BGI para este servicio). También se llevará a cabo un análisis similar con aquellos compuestos modificados que presenten una mejor actividad biológica.

Los datos de expresión y procesamiento alternativo nos informarán de qué genes y rutas génicas se inducen/reprimen por la acción de BiAux. Se realizarán comparativas con otros análisis transcriptómicos (hormonales, estreses, etc) para identificar qué rutas fisiológicas están alertadas por BiAux. En global, estos análisis nos permitirán posicionar la respuesta de BiAux dentro del desarrollo de las plantas. Prestaremos especial relevancia a los datos transcriptómicos mediados por auxinas (existen diferentes experimentos de raíces y auxinas en los bancos de datos). Esto nos permitirá desglosar qué parte de la respuesta a esta hormona es mediada por BiAux y qué parte es específica de este nuevo metabolito.

Ya que BiAux altera la respuesta de las raíces a la deficiencia de nitrógeno en el medio, experimentos transcripcionales similares se llevarán a cabo con raíces crecidas **en deficiencia de N con o sin BiAux en el medio**. Este análisis nos permitirá identificar posiblemente genes que se deben des-regular para potenciar el sistema radicular en estas condiciones de deficiencia nutricional. Estos resultados nos permitirán entender cómo funciona BiAux a nivel molecular y poder mejorar el sistema radicular de las plantas en condiciones de deficiencia nutricional.

Estos resultados nos proporcionarán datos sobre las posibles dianas moleculares de BiAux, que posteriormente podrían ser utilizadas para programas de mejora en combinación con aplicación de estos productos. Asimismo, proporcionarán resultados muy interesantes desde el punto de investigación científica, ya que nos permitirá descubrir nuevas rutas que controlan el crecimiento y desarrollo del sistema radicular.

#### 5. Estudiar el efecto de estas nuevas moléculas en cultivos agronómicos.

En este objetivo pretendemos analizar el efecto de BiAux y nuevas moléculas sintetizadas en el objetivo 2 en especies de interés agronómico en el invernadero. Previamente, caracterizaremos si BiAux es activo mediante su aplicación vía foliar. Recientemente se ha mostrado que moléculas, RNA o DNA puede penetrar vía foliar para realizar una función dentro de las plantas. Así, una vez rociadas con el metabolito o con el solvente, se analizará la expresión del marcador de desarrollo radicular SKP2Bp::GUS (Manzano et al., 2012) en plantas de tomate (estas líneas de tomate ya están generadas disponible en el laboratorio actualmente) en las raíces a diferentes días para analizar su efecto a nivel molecular y poder así determinar la concentración óptima de rociado, y su espaciado en el tiempo. Por otro lado, se preparará una mezcla de sustrato (tierra 3 partes:vermiculita 1 parte) con BiAux a diferentes concentraciones para crecer directamente las plantas sobre este sustrato. Por último, se regará estas plantas con una concentración de 1-5  $\mu\text{M}$  de BiAux semanalmente.

Una vez determinada su eficiencia mediante aplicación foliar ore, pretendemos analizar el efecto de BiAux y/o modificados de este en dos especies de alto valor económico como son el **tomate y la patata como sistemas modelos**. Se crecerán estas especies en el invernadero y se regarán semanalmente con una solución de 1  $\mu\text{M}$  o 3  $\mu\text{M}$  de compuestos o con el solvente como control. Para ello aplicaremos BiAux en el agua de regadío o bien por spray directo sobre las hojas para analizar si es capaz de absorberse y potenciar el crecimiento directamente.

Se recogerán datos de velocidad de crecimiento, tiempo de floración, área foliar, tamaño y peso de frutos y tubérculos. Estos datos nos permitirán analizar la efectividad de este compuesto en cultivos de relevancia económica y estimar así el coste de síntesis/incremento de producción para poder analizar su viabilidad económica.

## IMPACTO CIENTÍFICO Y/O SOCIO-ECONÓMICO DEL PROYECTO

Los resultados esperables de este proyecto tendrán una gran relevancia tanto científica como social. Por un lado, la identificación de metabolitos naturales de plantas y su uso para mejorar el crecimiento del sistema radicular, y subsiguiente incremento de la producción, es de una elevada relevancia. Hasta la fecha solo se han identificado metabolitos bacterianos y fúngicos promotores del crecimiento, pero no naturales de plantas. Por ellos, estos resultados se podrán publicar en revistas de alta repercusión científica.

Por otro lado, la identificación de sustancias vegetales-naturales promotoras del crecimiento radicular proporcionará un sistema respetuoso con el medioambiente para incrementar la producción agrícola, lo que repercutirá positivamente en el desarrollo de agricultura sostenible y en beneficios directos para la sociedad. Es de esperar que esta sustancia, o similares, favorezcan la asimilación de nutrientes, por lo que se podría reducir el suministro de fertilizantes.

### El plan de difusión e internacionalización, en su caso, de los resultados.

Los resultados, debido a su elevada relevancia, se podrán publicar en revistas de alto índice de impacto del tipo Plant Physiology, New Phytology, etc. Asimismo, estos resultados se podrán exponer, después de su protección intelectual, en diferentes foros de comunicación como congresos o workshops específicos del tema.

### Transferencia de resultados: resultados potencialmente transferibles y detallar el plan previsto para la transferencia de los mismos.

Estos resultados son susceptibles de **protección intelectual**. De hecho, una empresa multinacional de fertilizantes, Roullier, ha mostrado su interés por el metabolito citado y su uso, aunque están solicitando más datos y análisis de su posible aplicación aplicación y eficiencia en plantas de interés agronómico. Por ello, es importante proteger intelectualmente la formulación del metabolito identificado, su síntesis y uso como sustancia promotora del crecimiento.



## Referencias

- Calderon Villalobos, L. I.; Lee, S.; De Oliveira, C.; Ivetac, A.; Brandt, W.; Armitage, L.; Sheard, L. B.; Tan, X.; Parry, G.; Mao, H.; Zheng, N.; Napier, R.; Kepinski, S.; Estelle, M. *Nat Chem Biol* **2012**, *8*, 477.
- Canellas, L.; Balmori, D.; MÃ©dici, L.; Aguiar, N. I.; Campostrini, E.; Rosa, R. C.; FaÃ§anha, A.; Olivares, F. b. *Plant and soil* **2013**, *366*, 119.
- Chisholm, J. D.; Van Vranken, D. L., *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6672-6673.
- de Dorlodot, S.; Forster, B.; Pages, L.; Price, A.; Tuberosa, R.; Draye, X. *Trends Plant Sci* **2007**, *12*, 474.
- Den Herder, G.; Van Isterdael, G.; Beeckman, T.; De Smet, I. *Trends Plant Sci* **2010**, *15*, 600.
- Dharmasiri, N.; Dharmasiri, S.; Estelle, M. *Nature* **2005**, *435*, 441.
- Dharmasiri, N.; Dharmasiri, S.; Weijers, D.; Lechner, E.; Yamada, M.; Hobbie, L.; Ehrismann, J. S.; Jurgens, G.; Estelle, M. *Dev Cell* **2005**, *9*, 109.
- Futamura, Y.; Muroi, M.; Osada, H. *Molecular BioSystems* **2013**, *9*, 897.
- Gera Hol, W. H.; de Boer, W.; Medina, A. **2014**, *1*, 59.
- Gilbert, E. J.; Ziller, J. W.; Van Vranken, D. L. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 16553-16564
- Hangarter, R. P.; Good, N. E. *Plant Physiology* **1981**, *68*, 1424.
- Hayashi, K.-i.; Overvoorde, P. In *Plant Chemical Biology*; John Wiley & Sons, Inc, 2013.
- Jurado, S.; Abraham, Z.; Manzano, C.; Lopez-Torrejon, G.; Pacios, L. F.; Del Pozo, J. C. *Plant Cell* **2010**, *10.1105/tpc.110.078972*.
- Kramer, E. M.; Ackelsberg, E. M. *Frontiers in Plant Science* **2015**, *6*, 150.
- Lewis, W. M.; Wurtsbaugh, W. A.; Paerl, H. W. *Environmental Science & Technology* **2014**, *45*, 10300.
- Lewis, W. M.; Wurtsbaugh, W. A.; Paerl, H. W. *Environmental Science & Technology* **2014**, *45*, 10300.
- Liscum, E.; Reed, J. W. *Plant Mol Biol* **2002**, *49*, 387.
- Manzano, C.; Ramirez-Parra, E.; Casimiro, I.; Otero, S.; Desvoyes, B.; De Rybel, B.; Beeckman, T.; Casero, P.; Gutierrez, C.; J, C. D. P. *Plant Physiol* **2012**, *160*, 749.
- Mora, V. n.; Baigorri, R.; Bacaicoa, E.; Zamarreño, A. M.; García-Mina, J. M. *Environmental and Experimental Botany* **2012**, *76*, 24
- Nicolau, K. C.; Mitchell, H. J., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1576-1624.
- Sandoval, M.; Hoyos, P.; Cortés, A.; Bavaro, T.; Terreni, M.; Hernáiz, M. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 55495-55502.
- Schenone, M.; Dancik, V.; Wagner, B. K.; Clemons, P. A. *Nat Chem Biol* **2013**, *9*, 232.
- Tilman, D.; Cassman, K. G.; Matson, P. A.; Naylor, R.; Polasky, S. *Nature* **2002**, *418*, 671.
- Westfall, C. S.; Muehler, A. M.; Jez, J. M. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288*, 19304.
- Xuan, W.; Murphy, E.; Beeckman, T.; Audenaert, D.; De Smet, I. *Journal of Chemical Biology* **2013**, *6*, 43.
- Yang, Y.; Xu, R.; Ma, C. J.; Vlot, A. C.; Klessig, D. F.; Pichersky, E. *Plant Physiol* **2008**, *147*, 1034.
- Yu, P.; Lor, P.; Ludwig-Müller, J.; Hegeman, A.; Cohen, J. *Planta* **2015**, *241*, 539.