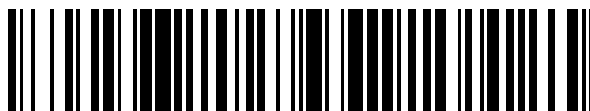


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 958**

51 Int. Cl.:

C07C 13/18 (2006.01)
C07D 213/02 (2006.01)
A01N 35/06 (2006.01)
A01N 35/08 (2006.01)
A01N 37/44 (2006.01)
A01N 41/10 (2006.01)
A01N 43/30 (2006.01)
A01N 43/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.09.2010 PCT/IB2010/002571**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **24.03.2011 WO11033389**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2010 E 10771181 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 2477491**

54 Título: **Aditivos para plantas y usos de los mismos para modular la síntesis de glicerolípidos de membrana en plantas**

30 Prioridad:

17.09.2009 EP 09290709

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.11.2017

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE ET
AUX ÉNERGIES ALTERNATIVES (100.0%)
Bâtiment "Le Ponant D" 25, rue Leblanc
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**CLEMENT, MATHILDE;
DESNOS, THIERRY y
NUSSAUME, LAURENT**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 641 958 T3

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

DESCRIPCIÓN

Aditivos para plantas y usos de los mismos para modular la síntesis de glicerolípidos de membrana en plantas

El fosfato (F) es un macronutriente esencial requerido para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Con frecuencia presente en cantidades limitadas en los suelos, el fosfato está atrapado en las formas orgánica o mineral y esta fijación da como resultado su baja disponibilidad para las plantas.

Para aumentar la productividad de los cultivos, el bajo contenido en fosfato inorgánico (Fi) de los suelos agrícolas se complementa por aplicación de grandes cantidades de fertilizantes de fosfato. Sin embargo, la mayoría de estas aportaciones aplicadas permanecen no disponibles para las plantas debido a fijación orgánica y complejación inorgánica y el amplio uso de estos fertilizantes aumenta las preocupaciones medioambientales. Por supuesto, los minerales de fosfato con frecuencia contienen cantidades traza de sustancias peligrosas tales como arsénico, cadmio, polonio y uranio, y si no se aplica una etapa de limpieza después de la extracción, el uso continuo de fertilizantes de fosfato puede conducir a una acumulación de estos elementos en el suelo. Además, debido a una mayor demanda, el precio del fosfato ha aumentado enormemente desde 2007. Por lo tanto, hay una necesidad de aditivos para plantas sin fosfato que puedan ayudar a la absorción de fosfato por las plantas, para reducir las aportaciones de fosfato sin disminuir el crecimiento de las plantas.

En los casos de deficiencia de fosfato, las plantas presentan cambios drásticos que aumentan la adquisición de F de los suelos y mejoran su uso en la planta. La falta de Fi conduce a modificaciones morfológicas tales como una reducción significativa del crecimiento, acumulación de antocianina en las hojas y una arquitectura de raíz modificada para explorar horizontes más ricos en F. La falta de fosfato también induce numerosos cambios bioquímicos (Raghothama, 1999). La absorción de fosfato es potenciada por una combinación de un número mayor de transportadores de fosfato, en particular Pht1;4 (Misson et al., 2004) y la secreción de ácidos orgánicos y enzimas tales como fosfatasas y nucleasas en la rizosfera. Usando chips de genes de Affymetrix de genoma completo *Arabidopsis thaliana* (ATH1), Misson et al., han estudiado la expresión global de los genes como respuesta a la carencia de Fi para cuantificar las variaciones espaciotemporales en abundancia de transcripción de 22.810 genes (Misson et al., 2005). El análisis reveló una inducción coordinada y supresión de genes sensibles a Fi, 612 y 254, respectivamente. La clasificación funcional de algunos de estos genes indicó su implicación en varias rutas metabólicas, transporte de iones, transducción de señales, regulación transcripcional y otros procedimientos relacionados con el crecimiento y el desarrollo. En particular, este estudio demostró que varios transportadores de metales eran inducidos en plantas carentes de fosfato y que está implicada una cantidad significativa de genes sensibles en rutas biosintéticas de lípidos (Misson et al., 2005).

Hay 3 clases principales de lípidos en la biomasa de la planta: 1) triacilgliceroles (o aceites), 2) glicerolípidos que contienen fósforo (o fosfolípidos) y 3) sulfo y galactolípidos exentos de fósforo (glucolípidos de plástidos). Los lípidos más abundantes proporcionados por las plantas para fines nutricionales o no nutricionales se detallan a continuación:

Glicerolípidos

Su estructura molecular es una cadena principal de glicerol de 3 carbonos, esterificada por uno, dos o tres ácidos grasos (**Figura 1A**). Los glicerolípidos principales en la biomasa de la planta son triacilgliceroles (o aceites), glicerolípidos que contienen fósforo (o fosfolípidos) y sulfo y galactolípidos sin fósforo (glucolípidos de plástidos).

Los glicerolípidos con tres acilos, o triacilgliceroles (los TAG), son una forma principal de almacenamiento de carbono y energía en las células y se conocen como aceites (**Figura 1B**). Los cultivos oleaginosos son la fuente principal de aceites nutricionales. En el intestino, su hidrólisis libera ácidos grasos esenciales, que no pueden ser sintetizados por las células humanas. El aceite vegetal es más sano que la grasa animal y es recomendado contra el sobrepeso y las cardiopatías. Se han centrado los esfuerzos en lograr síntesis de ácidos grasos para aumentar la proporción de acilos de interés terapéutico. Aumentar el TAG en las semillas es también una cuestión importante pero difícil y ahora se prevé la producción de TAG en órganos distintos de las semillas para hacer frente a una demanda adicional (Durrett et al., 2008).

El aceite puede convertirse también en gasolina, denominada biocombustible o biodiésel. Se debate esta utilización puesto que la actual producción de aceites vegetales sólo cubriría una fracción de la demanda de gasolina y desvía la producción de oleaginosas de la nutrición. Se invierten esfuerzos, por lo tanto, para producir aceite en otros órganos de las plantas, tales como las hojas (Durrett et al., 2008) o en otros organismos como las algas (Chisti, 2007). Al contrario que con las semillas, la producción de aceites en las hojas debería asumir la presencia de grandes cantidades de glicerolípidos de membrana incluyendo fosfolípidos y glucolípidos de plástidos (**Figura 1C**).

Los glicerolípidos con dos acilos forman el volumen de la membrana biológica. El carbono no acilado de la cadena principal de glicerol puede albergar una cabeza polar que determine su orientación dentro de las bicapas de membrana y su función biológica. Esta cabeza polar puede ser fosfatada, en los fosfolípidos, que es el lípido de membrana más abundante en células animales y en células vegetales fuera de los plástidos. La cabeza polar también puede estar desprovista de fosfato, como en los glucolípidos sintetizados de manera abundante en las

membranas de los cloroplastos y encontrada únicamente en organismos que contienen plástidos.

Fosfolípidos

Los fosfolípidos contienen hasta un tercio del contenido en fósforo en las plantas y son una fuente principal de F en nutrición humana en mezclas de lecitina. Los fosfolípidos más abundantes son fosfatidilcolina (FC) y fosfatidiletanolamina (FE). Las mezclas de lecitina de soja comerciales contienen ~ 70% de fosfolípidos junto con los TAG. Los fosfolípidos comestibles son recomendados para la salud humana y aumentar la proporción de fosfolípidos en ese contexto sería interesante. Viceversa, los fosfolípidos también se consideran perjudiciales tanto para aceites comestibles como para conversión de aceite en biodiésel. En este último caso, las impurezas de fosfolípidos ocasionan el taponamiento de los depósitos en los motores y son una limitación para el uso de petróleos brutos como sustitutos de la gasolina. Numerosos proyectos de investigación se centran, por lo tanto, en su eliminación, denominada "desgomado del aceite", por filtración/decantación o tratamientos con lipasas. El alto nivel de fosfolípidos en las hojas es, por lo tanto, una limitación para cualquier proyecto que tenga como objetivo producir aceites en estos órganos para aplicaciones de biodiésel. Así, las altas o bajas concentraciones en fosfolípidos en los tejidos vegetales presentan su interés. En condiciones como en un suministro bajo en F_i, los fosfolípidos son convertidos en FC, que se convierte después en glucolípidos de plástidos.

Glucolípidos de plástidos.

Los glucolípidos de plástidos consisten en mono- y digalactolípidos (MGDG, DGDG) y el cuantitativamente minoritario sulfoquinovosildiacilglicerol (SQDG), con frecuencia denominado sulfolípidos. Los galactolípidos son el principal glicerolípidos en membranas de cloroplastos y, por lo tanto, el lípido más abundante en tejidos verdes. Los galactolípidos son importantes para la calidad de la harina en el procedimiento de horneado de pan (Selmair and Koehler, 2008). Después de la ingestión, son hidrolizados por una galactolipasa pancreática y se digieren rápidamente. Recientes estudios han demostrado que los glucolípidos también presentaban propiedades terapéuticas: se demostró que MGDG presentaba una acción antiinflamatoria *in vivo* (Bruno et al., 2005) y propiedades anticancerosas, como actividades inductoras de muerte celular programada (Andrianasolo et al., 2008) y, junto con DGDG y SQDG, actuaban directamente sobre efectores de mamíferos y humanos de proliferación de células cancerosas (ADN polimerasa, Cdt1, p53) (Maeda et al., 2007). Además, se demostró que los liposomas de glucolípidos de plástidos permiten el suministro de moléculas anticancerosas (Liguori et al., 2008). El uso no nutricional de los glucolípidos de plástidos podía diversificar, por lo tanto, las aplicaciones de los lípidos agrícolas.

En la naturaleza, la relación de fosfolípido frente a glucolípidos de plástido está excelentemente controlada y es ajustada por las plantas en función de la disponibilidad de fósforo del suelo. En el suministro bajo en F_i, los fosfolípidos son hidrolizados, se potencia la síntesis de glucolípidos de plástidos y se exporta digalactolípidos fuera de los plástidos a membranas empobrecidas en fosfolípidos (Jouhet et al., 2007). En condiciones no limitantes, la relación fosfolípido/glucolípidos es alrededor de 50:50 en hojas de *Arabidopsis*. La baja disponibilidad de fósforo provoca la hidrólisis de los fosfolípidos y la acumulación de sulfo/galactolípidos, que conduce a una relación fosfolípido/glucolípidos alrededor de 20:80. Este fenómeno es observado en todos los principales cultivos: se indicó recientemente que en las raíces de la avena la relación DGDG/FC aumenta por un factor de 10, de 0,25 en suministro de F_i sin limitación a ~3,0 en suministro bajo en F_i (Tjellstrom et al., 2008).

Sería interesante poder reprogramar el metabolismo de los glicerolípidos de una manera similar, fomentando la conversión neta de fosfolípidos en glucolípidos. Disminuir la proporción de fosfolípidos sería beneficioso, por ejemplo, puesto que son perjudiciales en los aceites. Además, los fosfolípidos que son considerados como un desecho en este contexto, se convertirían en planta en glucolípidos con valor añadido. Por supuesto, estos lípidos son esenciales para la fotosíntesis y la calidad de algunos alimentos procesados y podían extraerse y purificarse para fines biomédicos. Sin embargo, la conversión neta de fosfolípidos en glucolípidos por imitación de la respuesta de las plantas a un suministro de bajo contenido en fósforo, pero sin ejercer impacto sobre la biomasa, aparece como una barrera tecnológica.

Por lo tanto, hay en la actualidad la necesidad de moléculas que puedan actuar sobre los mecanismos de remodelación de los glicerolípidos para modular la síntesis de glicerolípidos de membrana *en planta*.

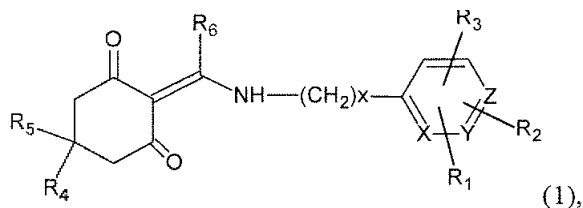
Usando una propuesta de detección sistemática quimiogenética (fijando como objetivo el transportador de fósforo Pht1;4), los autores han identificado una molécula, denominada MC2, que modula varios marcadores moleculares de deficiencia de fósforo (inducción de Pht1;4, Pldz2, mgd3 e inhibición de Irt1), así como la mayoría de las modificaciones fisiológicas observadas en los casos de deficiencia de fósforo (acumulación de almidón y antocianinas, inhibición del crecimiento de la raíz primaria, modificación de la composición de glucolípidos, inducción de fosfatasa, ...).

Después, por identificación sistemática de un gran número de análogos de MC2, se identificó una familia de compuestos que pueden actuar de manera selectiva sobre algunos de estos marcadores y modificaciones asociadas. Estos resultados se resumen en la Tabla 1 de la parte experimental a continuación. Estos sorprendentes resultados preparan el camino a prácticas agrícolas y bioindustriales novedosas basadas en el ajuste de la síntesis de los glicerolípidos de membrana *en planta*. Dependiendo de varios factores detallados a continuación, la presente

invención permite una reducción de la necesidad de aportaciones de fosfato en suelos y/o una combinación de altos rendimientos (obtenidos en presencia de fosfato abundante) y producción de glucolípidos interesantes reducidos normalmente por dicha práctica agrícola.

- 5 Así, ventajosamente, se ha demostrado que esta familia de compuestos, cuando se usa en un aditivo para plantas, puede redirigir el metabolismo de la planta hacia el de una planta con una deficiencia en fosfato y modificar, por lo tanto, el perfil, especialmente la relación relativa, de las moléculas de almacenamiento de energía, tales como almidón, fosfolípidos y glucolípidos.

Un primer aspecto de la presente invención es un aditivo para plantas que comprende un compuesto de fórmula 1:



10 en la que:

- x es un número entero seleccionado entre 0 y 1;

- X, Y, Z se seleccionan entre C y N y a lo sumo uno de X, Y y Z es N;

- 15 - R₁, R₂, R₃, se seleccionan del grupo de: H; un alquilo C₁-C₆ posiblemente sustituido por uno o varios grupos seleccionados entre: OR, NRR', CONRR', NO, COOR, SO₂, SO₂R, COR, NO₂ y un halógeno; un alqueno C₁-C₆ posiblemente sustituido por uno o varios grupos seleccionados entre: OR, NRR', CONRR', NO, COOR, SO₂, SO₂R, COR, NO₂ y un halógeno; OR; NRR'; NO; CONRR'; COOR; SO₂; SO₂R; SR; COR; NO₂ y un halógeno; en la que R y R', independientemente entre sí, se seleccionan entre: H, un alquilo C₁-C₆ y un alqueno C₁-C₆;

- R₁, R₂, R₃, se sitúan en cualquiera de los átomos de carbono del ciclo aromático, en el que dos grupos adyacentes seleccionados entre R₁, R₂ y R₃ pueden formar un ciclo o un heterociclo juntos;

- 20 - R₄, R₅, independientemente entre sí, se seleccionan del grupo de: H; un alquilo C₁-C₆; un acilo C₁-C₆ y un anillo aromático y

- R₆ es H, SH, SCH₃ o un alquilo C₁-C₆.

- 25 Preferiblemente, el aditivo para plantas comprende un compuesto de fórmula (I) en la que sólo uno de X, Y, Z es N, siendo los otros dos C, o un compuesto seleccionado de análogos de MC2 #2-3, #5-10, #12, #14, #21-22, #24-27, #29-32, #34-45 y #47.

Más específicamente, la invención pertenece a un aditivo para plantas que comprende un compuesto de fórmula 1, en la que:

- x = 0;

- X, Y, Z se seleccionan entre C y N y a lo más uno de X, Y y Z es N;

- 30 - R₁, R₂, R₃, independientemente entre sí, se seleccionan del grupo de: H; un alquilo C₁-C₆ posiblemente sustituido por uno o varios grupos seleccionados entre: OH, OR, NH₂, NHR, CONH₂, NO, CONHR, COOH, COOR, SO₂, SO₂R, COH, COR, NO₂ y un halógeno; un alqueno C₁-C₆ posiblemente sustituido por uno o varios grupos seleccionados entre: OH, OR, NH₂, NHR, CONH₂, NO, CONHR, COOH, COOR, SO₂, SOR, COH, COR, NO₂ y un halógeno; OH; OR; NH₂; NO; NHR; CONH₂; CONHR; COOH; COOR; SO₂; SO₂R; SCH₃; COH; COR; NO₂ y un halógeno, en la que R es un alquilo C₁-C₆ o un alqueno C₁-C₆;

- R₁, R₂, R₃, se sitúan sobre cualquiera de los átomos de carbono del ciclo aromático, en el que dos grupos adyacentes seleccionados entre R₁, R₂ y R₃ pueden formar un ciclo o un heterociclo juntos;

- R₄, R₅, independientemente entre sí, se seleccionan del grupo de: H; un alquilo C₁-C₆; un acilo C₁-C₆; un benceno y

- R₆ es H.

- 40 Por "aditivo para plantas" se quiere decir cualquier clase de aditivo para suelos, enmienda de suelo, fertilizante o acondicionador del suelo, que pueda usarse, por supuesto, para modificar un suelo, pero también en cultivos hidropónicos. Preferiblemente, el aditivo para plantas no es herbicida.

Ejemplos de compuestos que pueden usarse en aditivos para plantas según la invención se describen en la siguiente tabla:

Nombre	Fórmula	Nombre	Fórmula	Nombre	Fórmula	Nombre	Fórmula	Nombre	Fórmula
MC2		#5		#15		#22			
#1		#6		#11		#16		#23	
#2		#7		#12		#17		#24	
#3		#8		#13		#19		#25	
#4		#9		#14		#20		#27	

Nombre	Fórmula	Nombre	Fórmula	Nombre	Fórmula	Nombre	Fórmula	Nombre	Fórmula
28		#32		#36		#40		#44	
29		#33		#37		#41		#45	
30		#34		#38		#42		#46	
31		#35		#39		#43		#47	

Tabla 1: MC2 y ejemplos de análogos de MC2 que pueden usarse en aditivos para plantas según la invención.

En una realización preferida, el compuesto de fórmula 1 induce una regulación hacia arriba de los genes PHT1;4 en plantas cuando se añaden al medio de cultivo. Ejemplos no limitantes de compuestos que pueden usarse según esta realización son MC2 y sus análogos #1-7, 9-16, 19-20, 22, 24-25, 27-28, 32-34, 36-39, 43-44 y 47 descritos en la Tabla 1 anterior. Esta propiedad funcional, así como las otras propiedades mencionadas a continuación, pueden ensayarse usando los protocolos y los materiales descritos en la parte experimental que sigue. Dependiendo de la aplicación, el experto ensayará estas propiedades en raíces, en semillas, en hojas o en varios de estos elementos (o en una mezcla de varias partes de la planta). Un aditivo para plantas preferido según la presente invención comprende, por lo tanto, al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en MC2 y sus análogos #1-7, 9-16, 19-20, 22, 24-25, 27-28, 32-34, 36-39, 43-44 y 47 o una combinación de los mismos.

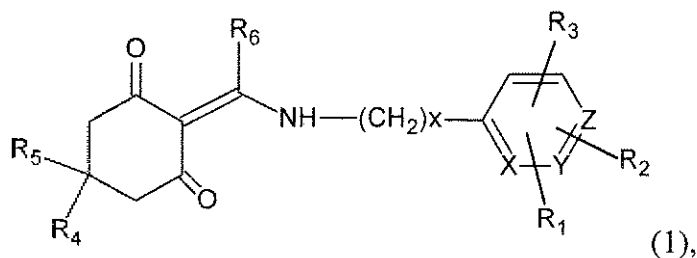
Según otra realización preferida, el compuesto de fórmula 1, cuando se añade al medio de cultivo de las plantas, induce en dichas plantas una regulación hacia arriba de uno o los dos genes que codifican la fosfolipasa DZ2 y la enzima MGD3. Todos los compuestos que han sido ensayados y que se describen en la Tabla 1, excepto análogo #8 de MC2, presentan esta propiedad, al menos en las hojas. Los aditivos para plantas preferidos según esta realización comprenden al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en MC2 y sus análogos #1-8, #9-17, #19-20, #22-25, #27-47 o una combinación de los mismos. Son útiles en particular para cultivar plantas para producción de biocombustible (también denominado biodiésel).

Un aditivo para plantas que comprende un compuesto que induce un cambio en el patrón de los lípidos, especialmente una disminución de la relación fosfolípido/glucolípido, sin que produzca impacto significativamente sobre el crecimiento de las plantas ni en la expresión del transportador de fosfato PHT1;4, puede usarse ventajosamente para cultivar plantas para la producción de biodiésel y/o para la producción de glucolípidos de plástidos. Ejemplos no limitantes de compuestos que pueden usarse ventajosamente para esta aplicación debido a su especificidad en remodelación de lípidos, son los análogos de MC2 que se refieren en la Tabla 1 como #23, #29, #30, #31, #40, #41, #42, #45 y #46, así como combinaciones de los mismos.

Compuestos tales como #27 o #28 (y, en una menor extensión, MC2 y sus análogos #5, #20, #22, #37, #43, #44 y #47), que no inducen una reducción del crecimiento de la raíz, a pesar del hecho de que inducen la expresión del gen PHT1;4, también pueden usarse para las aplicaciones anteriores. Otra aplicación ventajosa de un compuesto con dichas propiedades es su uso en un aditivo para suelos para disminuir la necesidad de fertilizantes que contienen fosfato. Por supuesto, la adición de dicho compuesto (o de una mezcla de dichos compuestos) a un medio para plantas/suelo aumentará la capacidad de dicha planta para movilizar y/o absorber el fosfato inorgánico que esté presente en dicho medio o suelo. Puesto que estos compuestos no limitan de por sí el crecimiento de la planta, favorecerán, por el contrario, el crecimiento en un entorno deficiente en fosfato.

Según otra realización, el aditivo para plantas según la invención comprende un compuesto de fórmula 1 que induce una regulación hacia arriba del transportador de hierro IRT1 en las plantas, cuando se añade al medio de cultivo. Ejemplos de dichos compuestos ensayados por los autores son los análogos de MC2 referidos como #1-3, #5, #7-15, #19-20, #22-25 y #27-47. Pueden usarse ventajosamente aditivos para plantas que comprendan estos compuestos para aumentar la fitorremediación de metales pesados, puesto que un aumento de la absorción de hierro va asociada normalmente a un aumento de la absorción de todos los metales.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un aditivo para plantas para cultivar plantas para producción de biocombustible o para producción de glucolípidos de plástidos, o para reducir la necesidad de fertilizante de fosfato para cultivar plantas, comprendiendo dicho aditivo para plantas un compuesto de fórmula 1:



en la que:

- x es un número entero seleccionado entre 0 y 1;

- X, Y, Z se seleccionan entre C y N y a lo sumo uno de X, Y y Z es N;

- R₁, R₂, R₃, se seleccionan del grupo de: H; un alquilo C₁-C₆ posiblemente sustituido por uno o varios grupos seleccionados entre: OR, NRR', CONRR', NO, COOR, SO₂, SO₂R, COR, NO₂ y un halógeno; un alquenilo C₁-C₆ posiblemente sustituido por uno o varios grupos seleccionados entre: OR, NRR', CONRR', NO, COOR, SO₂, SO₂R, COR, NO₂ y un halógeno; OR; NRR'; NO; CONRR'; COOR; SO₂; SO₂R; SR; COR; NO₂ y un halógeno y R y R', independientemente entre sí, se seleccionan entre: H, un alquilo C₁-C₆ y un alquenilo C₁-C₆;

- R₁, R₂, R₃, se sitúan en cualquiera de los átomos de carbono del ciclo aromático, en el que dos grupos adyacentes seleccionados entre R₁, R₂ y R₃ pueden formar un ciclo o un heterociclo juntos;

- R₄, R₅, independientemente entre sí, se seleccionan del grupo de: H; un alquilo C₁-C₆; un acilo C₁-C₆ y un anillo aromático y

5 - R₆ es H, SH, SCH₃ o un alquilo C₁-C₆.

En una realización, el aditivo para plantas se usa para cultivar plantas para producción de biocombustible o para producción de glucolípidos de plástidos.

Preferiblemente, el biocombustible es bioetanol.

10 En otra realización, el aditivo para plantas se usa para reducir la necesidad de fertilizante de fosfato para cultivar plantas.

Otras características de la invención también serán evidentes durante la descripción que sigue de los datos experimentales obtenidos por los autores y que le proporcionan el soporte experimental requerido, sin limitar su alcance.

Leyendas para las figuras

15 **Figura 1:** Estructura de tres clases principales de lípidos en plantas. **A.** Glicerolípidos. **B.** Triacilgliceroles. **C.** Glicerolípidos de membrana.

Figura 2: Localización histoquímica de la actividad de GUS en punta de raíz de crecimiento de *pht1;4-1* en medio de alto contenido en fosfato (500 µM) suministrado con MC2 o cultivado en medio de bajo contenido en fosfato.

20 **Figura 3:** Mediciones del contenido en Fi en hojas y en raíces de plántulas de tipo natural de diez días cultivadas en medio de alto contenido en fosfato, en medio de bajo contenido en fosfato y en medio de alto contenido en fosfato suministrado con 5 µM de MC2. Los valores representan la media de 3 experimentos ± DE.

Figura 4: Se ensayó la actividad de la fosfatasa ácida de manera espectrofotométrica en extracto de raíz de plantas de 10 días cultivadas en medio de alto contenido en fosfato, en medio de bajo contenido en fosfato o en medio de alto contenido en fosfato suministrado con 5 µM de MC2. Los valores representan la media de 3 experimentos ± DE.

25 **Figura 5:** Análisis de crecimiento de raíz como respuesta a medio de alto contenido en fosfato, medio de bajo contenido en fosfato o medio de alto contenido en fosfato suministrado con MC2. Los valores se expresan en % de control y representan la media de 12 plantas ± DE.

Figura 6: Localización histoquímica de la actividad de GUS en punta de raíz de *Cyclin B1* cultivado en medio de alto contenido en fosfato (500 µM) suministrado con MC2 (5 µM) o cultivado en medio de bajo contenido en fosfato.

30 **Figura 7:** Contenido en almidón de plántulas de tipo natural de 10 días. Las plantas fueron cultivadas en medio de alto contenido en fosfato, medio de bajo contenido en fosfato o medio de alto contenido en fosfato suministrado con MC2 (5 µM). El almidón se hizo visible por coloración con yodo.

35 **Figura 8:** Contenidos en antocianinas de plántulas de tipo natural de 10 días. Las plantas fueron cultivadas en medio de alto contenido en fosfato, medio de bajo contenido en fosfato o medio de alto contenido en fosfato suministrado con MC2 (5 µM). Los niveles de antocianinas fueron determinados de manera espectrofotométrica.

Figura 9: Localización histoquímica de la actividad de GUS en punta de raíz de *MGD3* cultivado en medio de alto contenido en fosfato (500 µM) suministrado con MC2 (5 µM) o cultivado en medio de bajo contenido en fosfato.

Figura 10: Localización histoquímica de la actividad de GUS en punta de raíz de *PLDξ2* cultivado en medio de alto contenido en fosfato (500 µM) suministrado con MC2 (5 µM) o cultivado en medio de bajo contenido en fosfato.

40 **Figura 11:** Contenido en hierro determinado por ICP-OES (espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado por inducción, por sus siglas en inglés). Las plantas fueron cultivadas en medio de alto contenido en fosfato, medio de bajo contenido en fosfato o medio de alto contenido en fosfato suministrado con MC2 (5 µM).

45 **Figura 12:** Ensayo de Western de ferritina en planta en extractos de proteínas de hojas de plantas cultivadas en medio de alto contenido en fosfato, medio de bajo contenido en fosfato o medio de alto contenido en fosfato suministrado con MC2 (5 µM). Se cargaron 25 µg de proteína total por línea.

Figura 13: Localización histoquímica de la actividad de GUS en punta de raíz de *IRT1* cultivado en medio de alto contenido en fosfato (500 µM) suministrado con MC2 (5 µM) o cultivado en medio de bajo contenido en fosfato.

Figura 14: Crecimiento de raíz de plantas de *Medicago truncatula*, en un medio deficiente de fosfato, suministrado o

no con MC2.

Ejemplos

Como respuesta a la falta de fosfato, se puede observar un gran número de modificaciones fisiológicas y moleculares en las plantas:

- 5 1. La afluencia de fosfato se aumenta debido a la sobreexpresión de genes transportadores de fosfato de la familia PHT y el aumento en la actividad de la fosfatasa.
2. Se detiene el crecimiento de la raíz principal pero no es debido a una inhibición de la actividad meristemática.
3. La falta de fosfato induce una respuesta a la tensión.
4. El metabolismo de los lípidos se modifica.
- 10 5. El transporte y la acumulación de hierro se modifican.

Los autores han usado varias técnicas y diferentes marcadores para evaluar todas estas modificaciones fisiológicas y moleculares y caracterizar efectos de MC2/ análogos de MC2 con detalle.

Materiales y métodos

Estirpes celulares usadas en este estudio.

- 15 La estirpe celular pPHT1;4::GUS (DCJ 10) es como se describe por Misson et al. (Misson et al., 2004). Esta estirpe celular expresa el informador de GUS bajo el control del activador del gen PHT1;4.

La estirpe celular pPLDZ2:GUS-GFP es como se describe por Cruz-Ramirez et al. (Cruz-Ramirez et al., 2006) y expresó una fusión de GUS-GFP con el control del activador de *pldz2*.

- 20 Las células pMGD3:GUS son como se describe por Kobayashi et al. (Kobayashi et al., 2004). En estas células, el informador de GUS se expresa con el control del activador de *mgd3*.

Se obtuvieron células pIRT1:GUS como se describe por Vert et al. (Vert et al., 2002) y soportaron una fusión de activador de *irt1*-GUS.

La estirpe celular pCycB1;1:GUS es como se describe por Colón-Carmona et al. (Colon-Carmona et al., 1999) y expresa el informador de GUS con el control del activador del gen ciclina B1.

- 25 La estirpe celular 8'G se obtuvo como sigue: para la fusión del activador de PHT1;4, una región 2 kb aguas arriba del ORF de PHT1;4 se clonó en el vector pENTR/D-TOPO (estuche de clonación pENTR™/D-TOPO®, ref. K2400-20, Invitrogen) y se transformó en pKGWFS7 (Karimi et al, 2002) por recombinación usando Gateway BP (mezcla de enzimas Gateway® BP Clonase®, ref. 11789-013, Invitrogen) y mezclas de enzimas LR Clonasa (enzima LR Clonase® II Plus, ref. 12538-120, Invitrogen), respectivamente, para producir la fusión de los genes pPHT1;4:GUS-GFP. Esta fusión se introdujo después en el genoma de *Arabidopsis* por el sistema de transformación mediado por *Agrobacterium* (Logemann et al., 2006).

Todas estas estirpes celulares proceden de *A. thaliana*.

Condiciones de crecimiento.

- 35 Se esterilizó la superficie de las semillas y se sembraron en placas de petri conteniendo medio MS/10 (MgSO₄ 0,15 mM, NH₄NO₃ 2,1 mM, KNO₃ 1,9 mM, NaH₂PO₄ 0,5 o 0,005 mM, CaCl₂ 0,3 mM, KI 0,5 μM, Fe 10 μM, H₃BO₃ 10 μM, MnSO₄ 10 μM, ZnSO₄ 3 μM, CuSO₄ 0,01 μM, CoCl₂ 0,01 μM, Na₂MoO₄ 0,1 μM, AEDT 2 μM, tiamina 0,03 μM, piridoxina 0,24 μM, ácido nicotínico 0,4 μM, inositol 55 μM, MES 14 mM (pH 5,8), sacarosa al 0,5% y agar al 0,8%. En el medio deficiente en Fe, se usó NaCl (0,5 mM) para reemplazar la cantidad equivalente de sodio proporcionada por NaH₂PO₄. Después de 3 días a 4 °C, se pusieron las placas en una posición vertical y se cultivaron las plantas durante 10 días en una cámara de cultivo en un régimen de 14 h de luz/10 h de oscuridad (22/18 °C, 150 μE m⁻²s⁻¹).

Coloración de Gus

- 45 Se examinó en las plantas actividad de GUS sumergiendo las muestras en una disolución de coloración de GUS (tampón de fosfato de sodio 50 mM de pH 7,0; Tritón X-100 al 0,01%, K₃Fe(CN)₆ 1 mM, K₄Fe(CN)₆ 1 mM, 1 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-GLUCURÓNIDO (X-Gluc A) y se incubaron a 37 °C durante la noche. Después de la coloración, se fijaron las plantas 2 horas en tampón de fosfato de sodio 50 mM pH 7,0; 1% de glutaraldehído; 4% de formaldehído.

Coloración de almidón.

Se sumergieron hojas en etanol (96%) durante 6 h para retirar pigmento y se coloreó con disolución Lugol (Fluka) durante 30 min para hacer visibles los gránulos de almidón.

Análisis del contenido en antocianinas.

- 5 Se extrajeron antocianinas con propanol:HCl:H₂O (81:1:18) durante 5 min a temperatura ambiente y 3 min a 100°C. Se centrifugaron las muestras durante 10 min a 4°C. Se recogieron los sobrenadantes y se midió la absorción a 530 nM y 652 nM. Se calculó el contenido en antocianinas como A₅₃₀-2.2A₆₅₂ (Lange et al., 1971).

Medición del contenido en Fi celular libre.

- 10 Se mezclaron raíces (10 mg) y hojas (25 mg), se pesaron, se molieron en nitrógeno líquido, se volvieron a suspender y se homogeneizaron en 250 µl de tampón MES (0,7 M, pH 5,8). Se realizaron tres replicados para cada experimento. Después de 5 min., de centrifugación, se recuperó el sobrenadante. Se midió el contenido en fosfato usando el método de verde malaquita como se describe (Delhaize and Randall, 1995). Se añadieron ciento cincuenta microlitros de disolución de molibdato (17,55 g/l de (NH₄)₆Mo₇, 4H₂O, H₂SO₄ 2 M) a la muestra (50 µl) diluida en agua (700 µl). Diez minutos después, se añadieron entonces 150 µl de disolución de verde malaquita (3,5 g/l de alcohol polivinílico, 0,35 g/l de verde malaquita). Se realizaron mediciones a 610 nm después de 2 h. Se calcularon las concentraciones usando una curva de calibración (realizada con una disolución de KH₂PO₄) y se expresaron por peso fresco.

Ensayo de Western

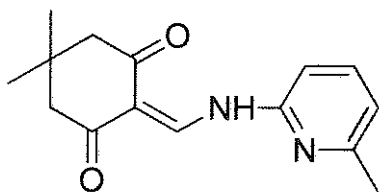
- 20 Después de SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 12% y transferencia sobre una membrana de nitrocelulosa, se inmunodetectó ferritina con un anticuerpo policlonal de conejo primario contra AtFER1 y un anticuerpo anticonejo de cabra secundario conjugado con fosfatasa alcalina.

ICP OES

- 25 Se mineralizaron hojas frescas de plantas de 10 días *in vitro* (alrededor de 50 mg de material fresco) en HNO₃ al 14% en un sistema de microondas (MarsX, CEM) para la determinación de macro y microelementos por espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado por inducción (ICP OES Vista MPX, Varian).

Ejemplo 1: Como respuesta a MC2, la afluencia de fosfato se aumenta debido a la sobreexpresión de genes transportadores de fosfato de la familia PHT y el aumento en la actividad de la fosfatasa.

- 30 La detección sistemática genética química se basó en expresión de PHT1;4 usando la estirpe pPHT1;4::GUS (Misson et al., 2004). Este gen no se expresa en medio con alto contenido en fosfato y es inducido claramente como respuesta a falta de fosfato. Los autores han aislado una molécula, denominada MC2, que puede inducir la expresión de PHT1;4 incluso si la planta se cultiva en medio de alto contenido en fosfato (**Figura 2**). La fórmula de MC2 es la siguiente:



- 35 Para evaluar si esta expresión interfiere con el contenido en fosfato, se analizó el contenido en fosfato en diferentes condiciones: medio de alto contenido en fosfato (+Fi), medio de bajo contenido en fosfato (-Fi) y medio de alto contenido en fosfato + MC2, 5 µM (+Fi, +MC2 5 µM). El tratamiento de MC2 indujo una acumulación de fosfato en hojas y en raíces (dos veces más comparado con la condición de control) (**Figura 3**). Esta acumulación de fosfato puede explicarse fácilmente por la sobreexpresión del transportador de fosfato.

- 40 Como respuesta a la deficiencia de fosfato, las plantas pueden segregar fosfatasa en el suelo para removilizar el fosfato del suelo. Las pruebas de actividad de fosfatasa mostraron que, como respuesta a la falta de fosfato, la actividad de fosfato aumenta enormemente. MC2 imita el efecto de la falta de fosfato que induce actividad de la fosfatasa (**Figura 4**).

Ejemplo 2: Se detiene el crecimiento de la raíz principal pero no es debido a una inhibición de actividad meristemática.

- 45 Como respuesta a la falta de fosfato, se inhibe el crecimiento de la raíz principal (Svistoonoff et al., 2007). Como

respuesta a la molécula MC2, el crecimiento de la raíz principal también se detiene de una manera dependiente de la dosis (**Figura 5**).

La detención del crecimiento de la raíz principal se debe parcialmente a la inhibición de actividad meristemática. La expresión del gen *Cycline B1* (*CycB1*) es un buen marcador de actividad meristemática. La expresión de este gen se midió como respuesta al medio de alto contenido en fosfato (+Fi), medio de bajo contenido en fosfato (-Fi) y medio de alto contenido en fosfato + MC2, 5 μ M (+Fi, +MC2 5 μ M). Como respuesta a la deficiencia de fosfato, *CycB1* se expresa menos. Sorprendentemente, como respuesta a MC2, la actividad meristemática no se reduce (**Figura 6**). Así, se puede concluir que la inhibición del crecimiento de la raíz principal observada como respuesta a la molécula no se debe a la inhibición de la actividad meristemática.

10 Ejemplo 3: La respuesta a la tensión.

Como respuesta a la falta de fosfato, también se inducen respuestas a la tensión de la planta, tales como acumulaciones de almidón y antocianinas. Se analizó el efecto de MC2 sobre la acumulación de estos dos compuestos.

15 Después de la coloración Lugol, apareció acumulación de almidón como vesículas azules oscuras en las células. Como respuesta a la deficiencia de fosfato, el almidón se acumula enormemente (**Figura 7**). Se obtuvo la misma respuesta después de tratamiento de MC2.

Se analizó la acumulación de antocianinas in vitro por una prueba espectroscópica. La falta de fosfato, así como el tratamiento de MC2, indujo una fuerte acumulación de antocianinas (**Figura 8**).

Ejemplo 4: Modificaciones del metabolismo de los lípidos.

20 Como respuesta a la falta de fosfato, se modifica el metabolismo de los lípidos (Benning and Ohta, 2005). Las plantas sintetizan preferiblemente sulfo- y galactolípidos en vez de fosfolípidos. Están implicadas varias enzimas en esta movilización de nuevo. A partir de estudios previos en laboratorio (Misson et al., 2005), se sabe que dos genes que codifican respectivamente enzima MGD3 y PLD ξ 2 (Cruz-Ramirez et al., 2006; Yamaryo et al., 2008) son inducidos claramente como respuesta a la falta de fosfato. Los autores han analizado, por lo tanto, la expresión de
25 estos dos genes en condiciones de medio de alto contenido en fosfato (+Fi), medio de bajo contenido en fosfato (-Fi) y medio de alto contenido en fosfato + MC2, 5 μ M (+Fi, +MC2 5 μ M).

MGD3 no se expresa en medio de alto contenido en fosfato. Se tiene que observar que este gen se expresa claramente como respuesta a la falta de fosfato y como respuesta al tratamiento de MC2 (**Figura 9**).

30 Como *MGD3*, el gen *PLD ξ 2* no se expresa en medio de alto contenido en fosfato, sino que se expresa claramente como respuesta a su falta y tratamiento de MC2 (**Figura 10**). A partir de este experimento, parece que MC2 imita los efectos de la falta de fosfato que afectan al metabolismo de los lípidos.

Ejemplo 5: El transporte y la acumulación de hierro se modifican también.

A partir del estudio previo en laboratorio, se sabe que, como respuesta a la falta de fosfato, se acumula hierro en las células induciendo la acumulación de ferritina (Hirsch et al., 2006). Para determinar el efecto de MC2 sobre el
35 metabolismo del hierro, se cuantificó el contenido en hierro por ICP-OES (**Figura 11**), se analizó la acumulación de ferritina por el ensayo de Western (**Figura 12**) y finalmente se analizó la expresión del gen *IRT1*, puesto que este gen codifica un transportador de hierro (**Figura 12**).

40 El análisis ICP-OES de contenido en hierro mostró que, como respuesta a la falta de fosfato, el hierro se acumula claramente pero no después de tratamiento de MC2 (**Figura 11**). El análisis por el método de Western de acumulación de ferritina reveló que se acumula ferritina como respuesta a la falta de fosfato, pero no como respuesta al tratamiento de MC2 (**Figura 12**).

IRT1 transporta hierro de fuera al interior de la planta. Como respuesta a la falta de fosfato, este transportador no se expresa debido a que el hierro se acumula claramente. La planta no necesita importar hierro (**Figura 13**). Sorprendentemente, el tratamiento de MC2 inhibe la expresión de *IRT1* incluso si no se acumula hierro en la planta.

45 Se proporciona un resumen de los efectos de MC2 sobre las plantas en la Tabla 2.

Ejemplo 6: Efectos de análogos de MC2 sobre las plantas.

Los efectos descritos en los ejemplos precedentes también se han ensayado para una serie de análogos de la molécula de MC2. Sorprendentemente, pareció que, para casi todos estos análogos, sólo se observó parte de estos efectos. Por supuesto, algunos análogos pueden ejercer impacto de manera específica en la síntesis de los lípidos,
50 mientras que otros presentan un impacto sobre transportador de hierro, crecimiento de la planta, etc.

Por ejemplo, los análogos #21, #29, #30, #31, #41, #42, #45 ejercen impacto sobre, específicamente, el metabolismo de los lípidos que induce PLD ξ 2 y MGD3. Los autores también aislaron análogos que podían inducir

expresión de PHT1;4 sin modificar el crecimiento de la raíz: #1, #5, #7, #11, #14, #20, #22, #27, #43, #44, #47.

Todos los resultados, junto con las fórmulas de los análogos, se resumen en la Tabla 3 a continuación.

Ejemplo 7: Efecto de MC2 sobre el crecimiento de raíces en un medio deficiente en fosfato.

5 Se esterilizó la superficie de semillas *Medicago truncatula* como sigue: remojando en ácido sulfúrico concentrado durante 10 min., enjuagando tres veces con agua destilada estéril, remojando en disolución de blanqueador al 10%/Tween 20 al 0,1% durante 10 min., con agitación suave y finalmente enjuagando las semillas tres veces con agua destilada estéril. Las semillas germinaron 48 horas en la oscuridad. Después, se transfirieron las plantas en medio Murashige and Skoog (MS)/10 (MgSO₄ 0,15 mM, NH₄NO₃ 2,1 mM, KNO₃ 1,9 mM, NaH₂PO₄ 0,5 o 0,005 mM, CaCl₂ 0,3 mM, KI 0,5 μM, Fe 10 μM, H₃BO₃ 10 μM, MnSO₄ 10 μM, ZnSO₄ 3 μM, CuSO₄ 0,01 μM, CoCl₂ 0,01 μM, Na₂MoO₄ 0,1 μM, AEDT 2 μM, tiamina 0,03 μM, piridoxina 0,24 μM, ácido nicotínico 0,4 μM, inositol 55 μM, MES 14 mM (pH 5,8), sacarosa al 0,5% y agar al 0,8% suministrado con fosfato (500 μM) o empobrecido con fosfato (10 μM) con o sin molécula MC2 (5 μM). En el medio deficiente en fosfato (Fi), se usó NaCl (0,5 mM) para reemplazar la cantidad equivalente de sodio proporcionada por NaH₂PO₄). Se mantuvieron las plantas 10 días en un régimen de 14 h de luz/10 h 150 μE m⁻²s⁻¹ de oscuridad con una temperatura de 22/18 °C para fases luz/oscuridad en un fitotrón.

10

15 Los resultados, indicados en la figura 14, muestran que el crecimiento de las raíces de las plantas en un medio deficiente en Fi mejora en presencia de MC2 e ilustra la reducción de la necesidad de fertilizante de fosfato cuando a la planta se le suministra MC2.

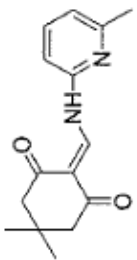
Referencia	Nombre	Formula	Crecim. raíz	8'G::GUS	PLDz::GUS	IRT1::GUS	MGD3::GUS	CycB1::GUS	Almidón	Anto.
		+P	100	-	-	+	-	+	-	46
		-P	20	+	+	-	+	-	+	1008
5521417	MC2		51	+	+	-	+	+	+	454

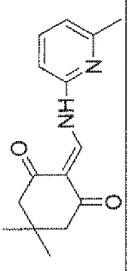
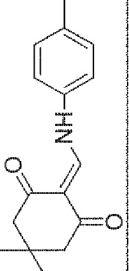
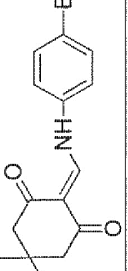
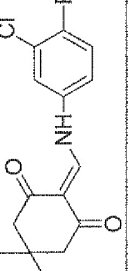
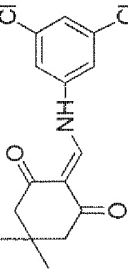
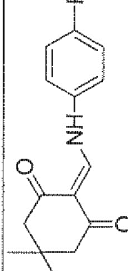
Tabla 2: Impacto de fosfato, deficiencia en fosfato y MC2 en varios parámetros de crecimiento de planta.

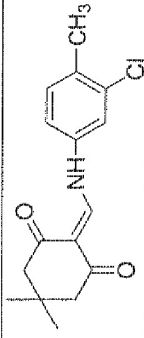
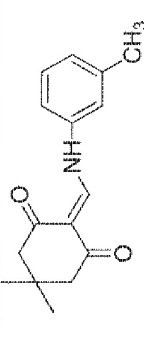
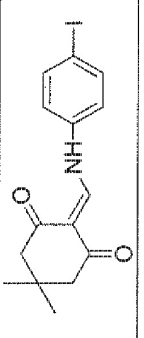
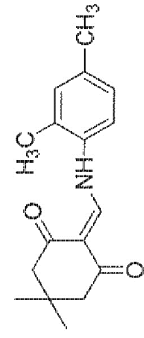
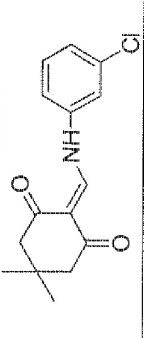
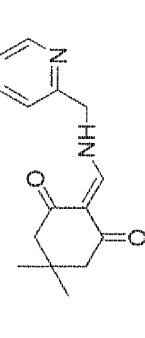
Crecimiento raíz: expresado como un porcentaje con respecto a un control; 8'G::GUS: seguimiento de la expresión del transportador de fosfato Phr1.4;

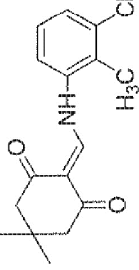
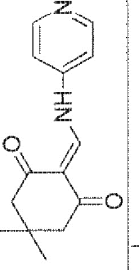
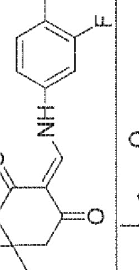
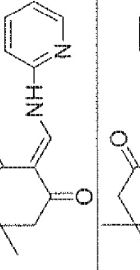
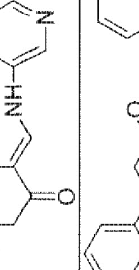
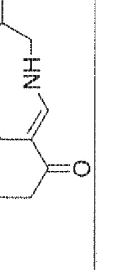
PLDz::GUS; seguimiento de la expresión del gen que codifica fosfolipasa D2; IRT1::GUS: seguimiento de la expresión del gen que codifica el transportador de hierro IRT1;

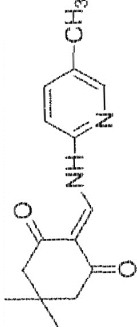
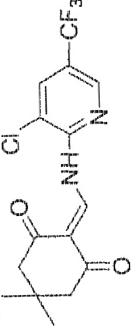
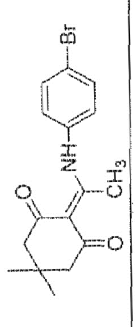
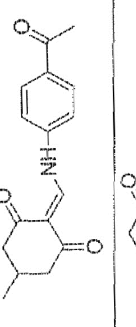
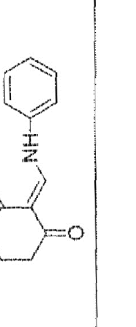
MGD3::GUS seguimiento de la expresión del gen que codifica la enzima MGD3; CycB1::GUS seguimiento de la expresión del gen que codifica Cyclin B1;

Alm. : acumulación de almidón; Anto: acumulación de antocianos.

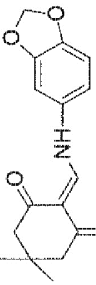
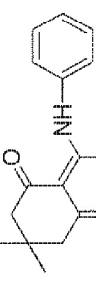
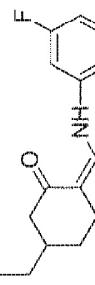
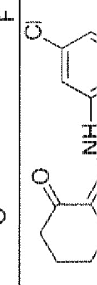
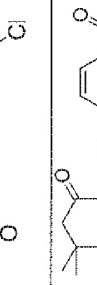

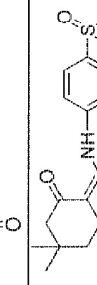
Referencia	Nombre	Fórmula	Crecim. raíz	8'G ::GUS	PLDz ::GUS	IRTI ::GUS	MGD3 ::GUS	CyeB ::GUS	Almidón	Anto.
5521417	MC2		51	+	+	-	+	+	+	454
5220640	#1			+	+	+	-	+	+	274
5220641	#2			+	+	+	-	+	-	258
5249268	#3			+	+	+	+	+	+	806
5482362	#4		50	+	+	-	+	-	+	210
5484851	#5		73	+	+	+	-	+	+	110

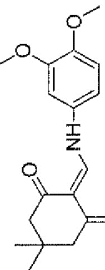
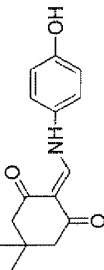
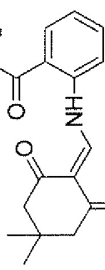
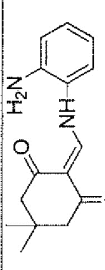
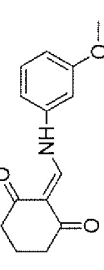
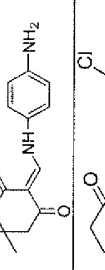
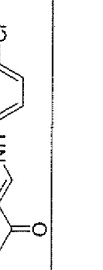
Referencia	Nombre	Fórmula	Crecim. raíz	8'G :GUS	PLDz :GUS	IRT1 :GUS	MGD3 :GUS	CysB :GUS	Almidón	Anto.
5486289	#6		53	+	-	-	+	+	+	+
5491335	#7		75	+	-	+	+	+	+	172
5491651	#8		56	-	-	+	-	+	-	37
5492143	#9		71	+	+	+	+	+	-	130
5492676	#10		41	+	+	+	+	+	-	225
5493194	#11		63	+	+	-	+	+	+	163

Referencia	Nombre	Fórmula	Crecim. raíz	8'G ::GUS	PLDz ::GUS	IRT1 ::GUS	MGD3 ::GUS	CyeB ::GUS	Almidón	Anto.
5493512	#12		57	+	+	+	+	+	+	850
5521400	#13		42	+	+	+	+	+	+	513
5630089	#14		61	+	+	+	+	+	+	150
5666610	#15		40	+	+	+	+	+	+	283
5666611	#16		40	+	+	-	+	-	+	431
5666617	#17		60	-	-	-	+	-	+	408

Referencia	Nombre	Fórmula	Crecim. raíz	8'G::GUS	PLDz::GUS	IRT1::GUS	MGD3::GUS	CysB::GUS	Almidón	Anto.
5785319	#19		47	+	+	+	+	+	+	193
5858517	#20		72	+	+	+	+	+	-	142
5963688	#21		93	-	-	+	-	+	-	146
F621	#22		72	+	+	+	-	-	-	101
AURORA 3525	#23		100	-	-	+	+	-	-	42

Referencia	Nombre	Fórmula	Crecim. raiz	8'0 : :GUS	PLDz::GU S	IR11 : :GUS	MGD3 : :GUS	CyeB : :GUS	Almidón	Anto.
ES113	#24		54	+	+	+	+		-	240
ES188	#25		63	+	-/+	+	+		+	405
E228	#26		6	?*	?*	?*	?*		+	640
ES292	#27		98	+	+	+	+		-	43
ST927	#28		100	+	-	+	+		+	247
ST981	#29		85	-	+	+	+		+	146

Referencia	Nombre	Fórmula	Crecim. raíz	8'G : -GUS	PLDz : GUS	IRT1 : GUS	MGB3 : GUS	CyeB : GUS	Almidón	Anto.
ST3897	#30		65	-	+	+	+		+	189
ST2248	#31		89	-	-	+	+		-	62
E1968	#32		13	+	+	+	-		+	103
CB285	#33		59	+	+	+	-/+		+	167
ESI40	#34		59	+	+	+	+		+	289
CB395	#35		60	-/+	+	+	+		+	208
SR97	#36		58	+	+	+	+		+	235

Referencia	Nombre	Fórmula	Crecim. raíz	8'G: :GUS	PLDz: :GUS	IRT1: :GUS	MGD3: :GUS	CyeB: :GUS	Almidón	Anto.
E1725	#37		69	+	+	+	+		+	204
E1829	#38		60	+	-	+	+		+	206
DW196	#39		60	+	+	+	+		+	183
7W-0874	#40		85	-	-	+	+		-	65
7H-940	#41		65	-	-	+	+		-	111
AI-559/ 36942007	#42		68	-	+	+	+		-	226
10N-521S	#43		67	+	+	+	+		-	186

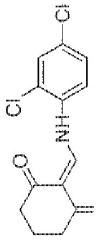
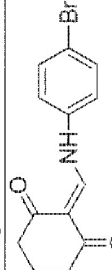
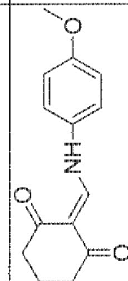
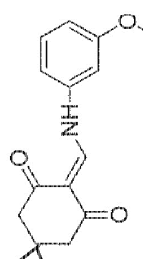
Referencia	Nombre	Fórmula	Crecim. raíz	8'G: :GUS	PLDz: :GUS	IRT1: :GUS	MGD3: :GUS	CycB1: :GUS	Almidón	Anto.
10N-523S	#44		68	+	+	+	+		-	123
10N-524S	#45		67	-	+	+	+		-	106
10N-525S	#46		70	-	-	+	+		-	167
5W-0900	#47		70	+	+	+	+/-		+	324

Tabla 3: Impacto de análogos de MC2 sobre el crecimiento de las plantas.

Crecimiento raíz: expresado como un porcentaje respecto a un control; **8'G::GUS;** seguimiento de la expresión del transportador de fosfato Pht1; **4; PLDz::GUS;** seguimiento de la expresión del gen que codifica fosfolipasa D22; **IRT1::GUS;** seguimiento de la expresión del gen que codifica el transportador de hierro IRT1; **MGD3::GUS;** seguimiento de la expresión del gen que codifica la enzima MGD3; **CycB1::GUS;** seguimiento de la expresión del gen que codifica Cyclin B1; **Alm. :** acumulación de almidón; **Anto.:** acumulación de antocianos. *: no pudieron determinarse resultados debido a la toxicidad de este compuesto.

REFERENCIAS

- Andrianasolo, E. H., Haramaty, L., Vardi, A., White, E., Lutz, R. y Falkowski, P. (2008) Apoptosis-inducing galactolipids from a cultured marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. *J Nat Prod*, **71**, 1197-1201.
- 5 Benning, C. y Ohta, H. (2005) Three enzyme systems for galactoglycerolipid biosynthesis are coordinately regulated in plants. *J Biol Chem*, **280**, 2397-2400.
- Bruno, A., Rossi, C., Marcolongo, G., Di Lena, A., Venzo, A., Berrie, C. P. y Corda, D. (2005) Selective in vivo anti-inflammatory action of the galactolipid monogalactosyldiacylglycerol. *Eur J Pharmacol*, **524**, 159-168.
- Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv*, **25**, 294-306.
- 10 Colon-Carmona, A., You, R., Haimovitch-Gal, T. y Doerner, P. (1999) Technical advance: spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J*, **20**, 503-508.
- Cruz-Ramirez, A., Oropeza-Aburto, A., Razo-Hernandez, F., Ramirez-Chavez, E. y Herrera-Estrella, L. (2006) Phospholipase DZ2 plays an important role in extraplasmidic galactolipid biosynthesis and phosphate recycling in *Arabidopsis* roots. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**, 6765-6770.
- 15 Delhaize, E. y Randall, P. J. (1995) Characterization of a Phosphate-Accumulator Mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, **107**, 207-213.
- Durrett, T. P., Benning, C. y Ohlrogge, J. (2008) Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels. *Plant J*, **54**, 593-607.
- Hirsch, J., Marin, E., Floriani, M., Chiarenza, S., Richaud, P., Nussaume, L. y Thibaud, M. C. (2006) Phosphate deficiency promotes modification of iron distribution in *Arabidopsis* plants. *Biochimie*, **88**, 1767-1771.
- 20 Jouhet, J., Marechal, E. y Block, M. A. (2007) Glycerolipid transfer for the building of membranes in plant cells. *Prog Lipid Res*, **46**, 37-55.
- Karimi, M., Inze, D. y Depicker, A. (2002) GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci*, **7**, 193-195.
- 25 Kobayashi, K., Awai, K., Takamiya, K. y Ohta, H. (2004) *Arabidopsis* type B monogalactosyldiacylglycerol synthase genes are expressed during pollen tube growth and induced by phosphate starvation. *Plant Physiol*, **134**, 640-648.
- Lange, H., Shropshire, W. y Mohr, H. (1971) An Analysis of Phytochrome-mediated Anthocyanin Synthesis. *Plant Physiol*, **47**, 649-655.
- Liguori, L., Marques, B., Villegas-Mendez, A., Rome, R. y Lenormand, J. L. (2008) Liposomes-mediated delivery of pro-apoptotic therapeutic membrane proteins. *J Control Release*, **126**, 217-227.
- 30 Logemann, E., Birkenbihl, R. P., Ulker, B. y Somssich, I. E. (2006) An improved method for preparing *Agrobacterium* cells that simplifies the *Arabidopsis* transformation protocol. *Plant Methods*, **2**, 16.
- Maeda, N., Kokai, Y., Ohtani, S., Sahara, H., Hada, T., Ishimaru, C., Kuriyama, I., Yonezawa, Y., Iijima, H., Yoshida, H., Sato, N. y Mizushima, Y. (2007) Antitumor effects of the glycolipids fraction from spinach which inhibited DNA polymerase activity. *Nutr Cancer*, **57**, 216-223.
- 35 Misson, J., Raghothama, K. G., Jain, A., Jouhet, J., Block, M. A., Bligny, R., Ortet, P., Creff, A., Somerville, S., Rolland, N., Doumas, P., Nacry, P., Herrera-Estrella, L., Nussaume, L. y Thibaud, M. C. (2005) A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**, 11934-11939.
- 40 Misson, J., Thibaud, M. C., Bechtold, N., Raghothama, K. y Nussaume, L. (2004) Transcriptional regulation and functional properties of *Arabidopsis* Pht1;4, a high affinity transporter contributing greatly to phosphate uptake in phosphate deprived plants. *Plant Mol Biol*, **55**, 727-741.
- Raghothama, K. G. (1999) Phosphate Acquisition. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **50**, 665-693.
- 45 Selmair, P. L. y Koehler, P. (2008) Baking performance of synthetic glycolipids in comparison to commercial surfactants. *J Agric Food Chem*, **56**, 6691-6700.
- Svistoonoff, S., Creff, A., Reymond, M., Sigoillot-Claude, C., Ricaud, L., Blanchet, A., Nussaume, L. y Desnos, T. (2007) Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nat Genet*, **39**, 792-796.

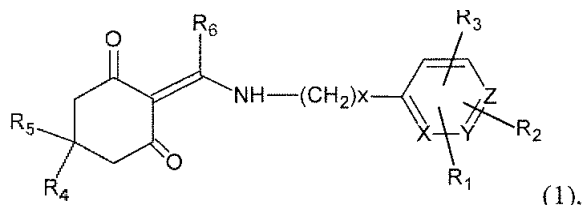
Tjellstrom, H., Andersson, M. X., Larsson, K. E. y Sandelius, A. S. (2008) Membrane phospholipids as a phosphate reserve: the dynamic nature of phospholipid-to-digalactosyl diacylglycerol exchange in higher plants. *Plant Cell Environ*, **31**, 1388-1398.

5 Vert, G., Grotz, N., Dedaldechamp, F., Gaymard, F., Guerinot, M. L., Briat, J. F. y Curie, C. (2002) IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell*, **14**, 1223-1233.

Yamaryo, Y., Dubots, E., Albrieux, C., Baldan, B. y Block, M. A. (2008) Phosphate availability affects the tonoplast localization of PLDzeta2, an Arabidopsis thaliana phospholipase D. *FEBS Lett*, **582**, 685-690.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un aditivo para plantas para cultivar plantas para producción de biocombustible o glucolípidos de plástidos o para reducir la necesidad de fertilizante de fosfato para cultivar plantas, comprendiendo dicho aditivo para plantas un compuesto de fórmula 1:



5

en la que:

- x es un número entero seleccionado entre 0 y 1;

- X, Y, Z se seleccionan entre C y N y a lo sumo uno de X, Y y Z es N;

10 - R₁, R₂, R₃, se seleccionan del grupo de: H; un alquilo C₁-C₆ posiblemente sustituido por uno o varios grupos seleccionados entre: OR, NRR', CONRR', NO, COOR, SO₂, SO₂R, COR, NO₂ y un halógeno; un alqueno C₁-C₆ posiblemente sustituido por uno o varios grupos seleccionados entre: OR, NRR', CONRR', NO, COOR, SO₂, SO₂R, COR, NO₂ y un halógeno; OR; NRR'; NO; CONRR'; COOR; SO₂; SO₂R; SR; COR; NO₂ y un halógeno y R y R', independientemente entre sí, se seleccionan entre: H, un alquilo C₁-C₆ y un alqueno C₁-C₆;

15 - R₁, R₂, R₃, se sitúan en cualquiera de los átomos de carbono del ciclo aromático, en el que dos grupos adyacentes seleccionados entre R₁, R₂ y R₃ pueden formar un ciclo o un heterociclo juntos;

- R₄, R₅, independientemente entre sí, se seleccionan del grupo de: H; un alquilo C₁-C₆; un acilo C₁-C₆ y un anillo aromático y

- R₆ es H, SH, SCH₃ o un alquilo C₁-C₆.

2. Uso según la reivindicación 1, en el que:

20 - x = 0;

- X, Y, Z se seleccionan entre C y N y a lo sumo uno de X, Y y Z es N;

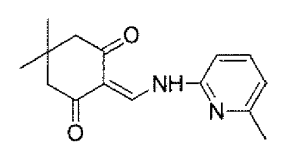
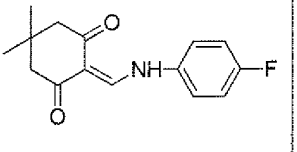
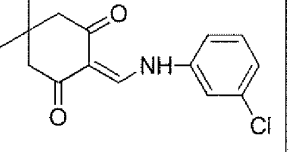
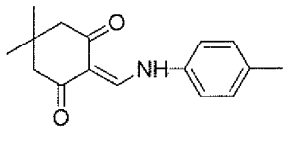
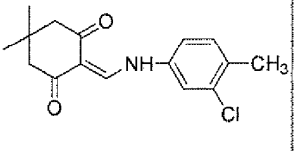
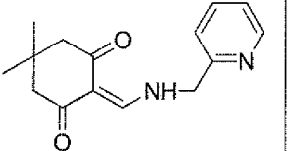
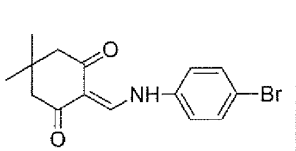
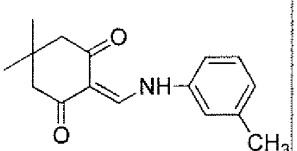
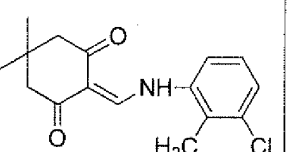
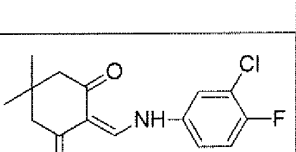
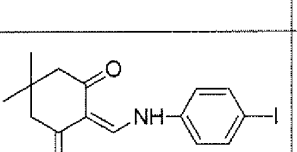
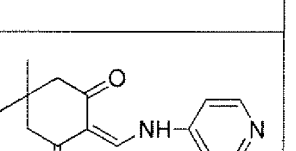
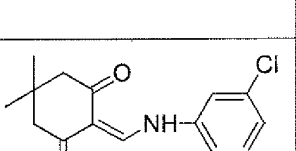
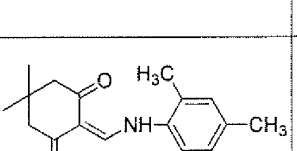
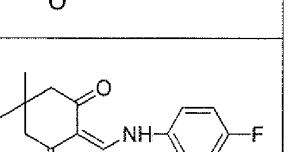
25 - R₁, R₂, R₃, independientemente entre sí, se seleccionan del grupo de: H; un alquilo C₁-C₆ posiblemente sustituido por uno o varios grupos seleccionados entre: OH, OR, NH₂, NHR, CONH₂, NO, CONHR, COOH, COOR, SO₂, SO₂R, COH, COR, NO₂ y un halógeno; un alqueno C₁-C₆ posiblemente sustituido por uno o varios grupos seleccionados entre: OH, OR, NH₂, NHR, CONH₂, NO, CONHR, COOH, COOR, SO₂, SO₂R, SOR, COH, COR, NO₂ y un halógeno; OH; OR; NH₂; NO; NHR; CONH₂; CONHR; COOH; COOR; SO₂; SO₂R; SCH₃; COH; COR; NO₂ y un halógeno y R es un alquilo C₁-C₆ o un alqueno C₁-C₆;

- R₁, R₂, R₃, se sitúan sobre cualquiera de los átomos de carbono del ciclo aromático, en el que dos grupos adyacentes seleccionados entre R₁, R₂ y R₃ pueden formar un ciclo o un heterociclo juntos;

30 - R₄, R₅, independientemente entre sí, se seleccionan del grupo de: H; un alquilo C₁-C₆; un acilo C₁-C₆; un benceno y

- R₆ es H.

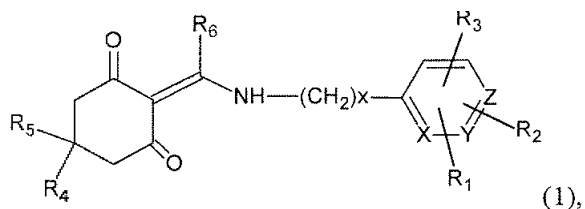
3. Uso según la reivindicación 2, que comprende al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en MC2 y sus análogos #1-7, #9-16, #19-20, #22, #24-25, #27-28, #32-34, #36-39, #43-44 y #47.

MC2		#5		#10	
#1		#6		#11	
#2		#7		#12	
#3		#8		#13	
#4		#9		#14	

Nombre	Fórmula	Nombre	Fórmula	Nombre	Fórmula
#15		#22		#29	
#16		#23		#30	
#17		#24		#31	
		#25		#32	
#19		#26		#33	
#20		#27		#34	
#21		#28		#35	

Nombre	Fórmula	Nombre	Fórmula	Nombre	Fórmula
#36		#40		#44	
#37		#41		#45	
#38		#42		#46	
#39		#43		#47	

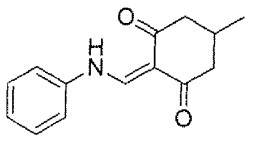
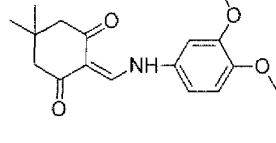
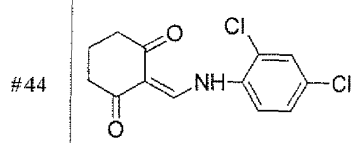
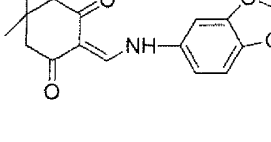
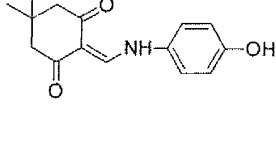
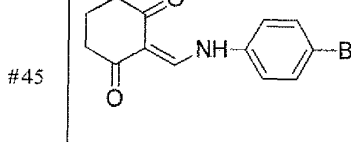
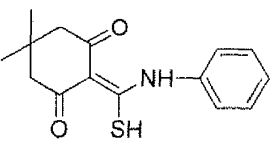
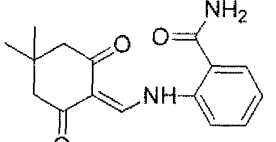
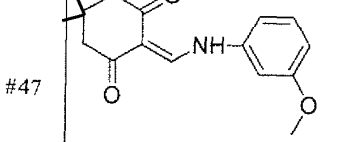
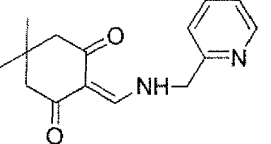
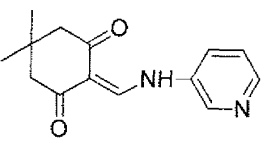
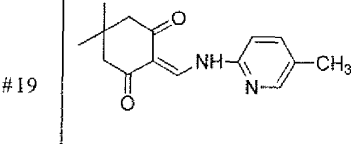
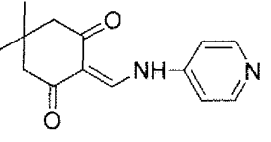
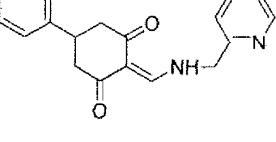
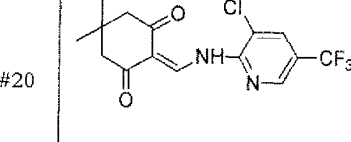
4. Un aditivo para plantas que es un compuesto de fórmula 1:

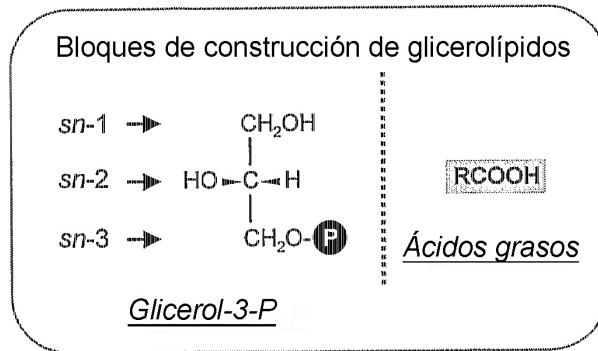


5 en la que R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , x , X , Y y Z son como se define en la reivindicación 1, siendo dicho compuesto seleccionado de:

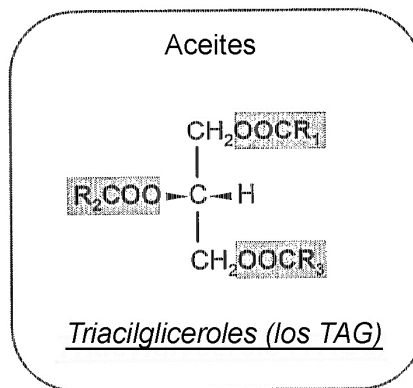
ES 2 641 958 T3

Nombre	Fórmula	Nombre	Fórmula	Nombre	Fórmula
#2		#7		#12	
#3		#8		#14	
#5		#9		#21	
#6		#10		#22	
#24		#32		#40	
#25		#34		#41	
#26		#35		#42	
#27		#36		#43	

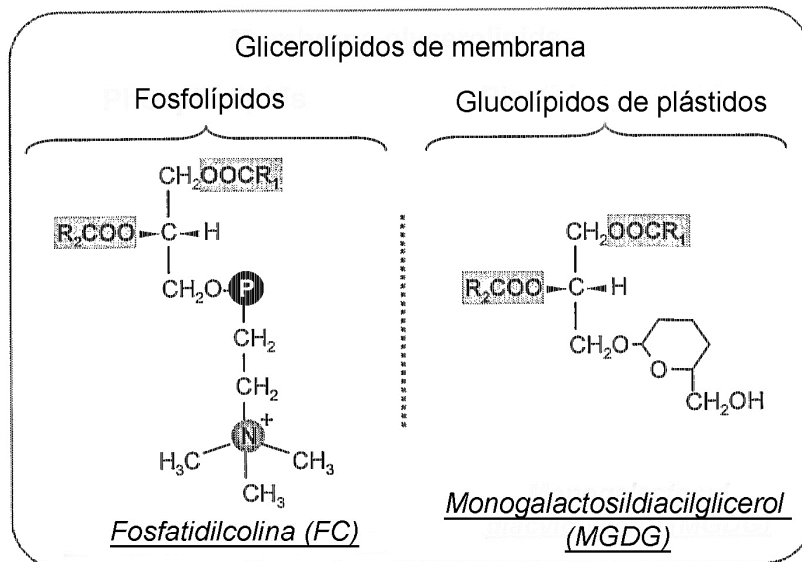
#29		#37		#44	
#30		#38		#45	
#31		#39		#47	
#11		#16		#19	
#13		#17		#20	



A



B



C

Figura 1

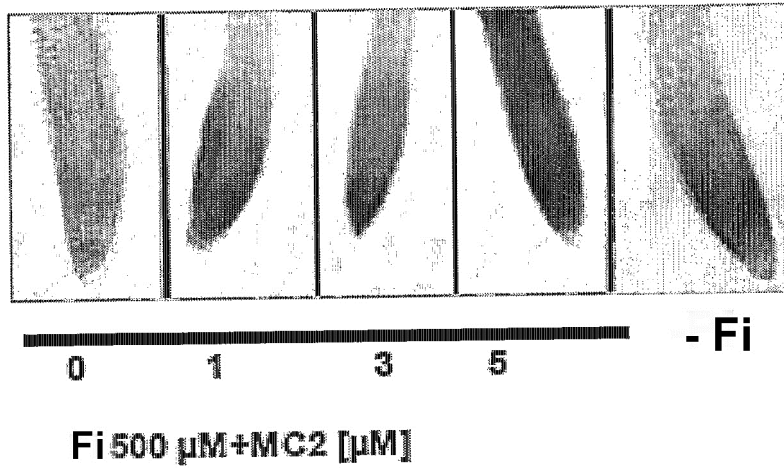


Figura 2

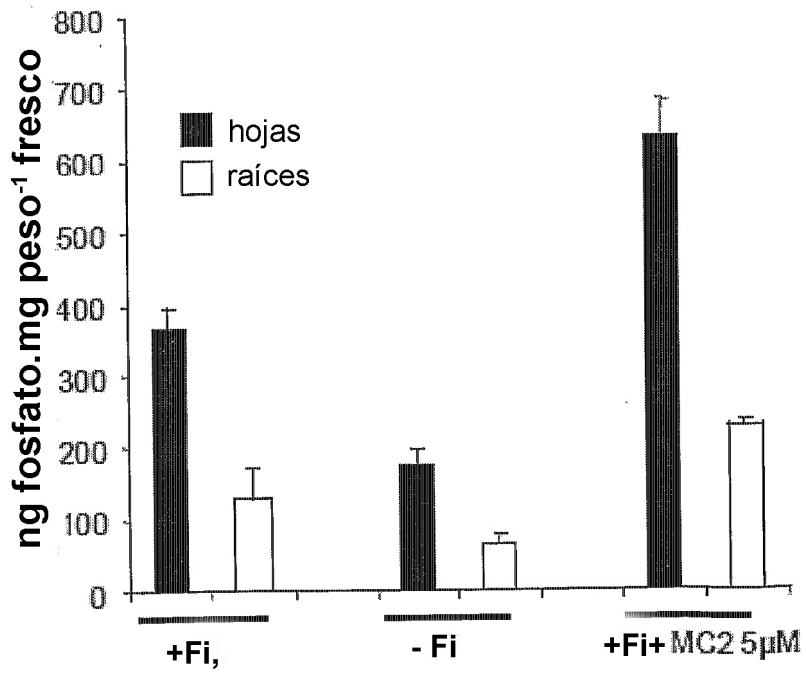


Figura 3

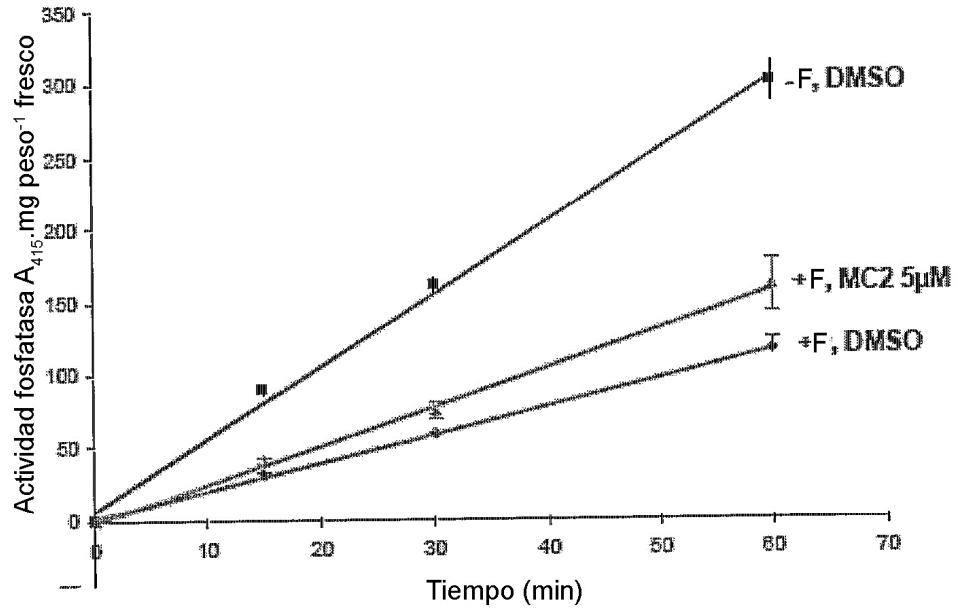


Figura 4

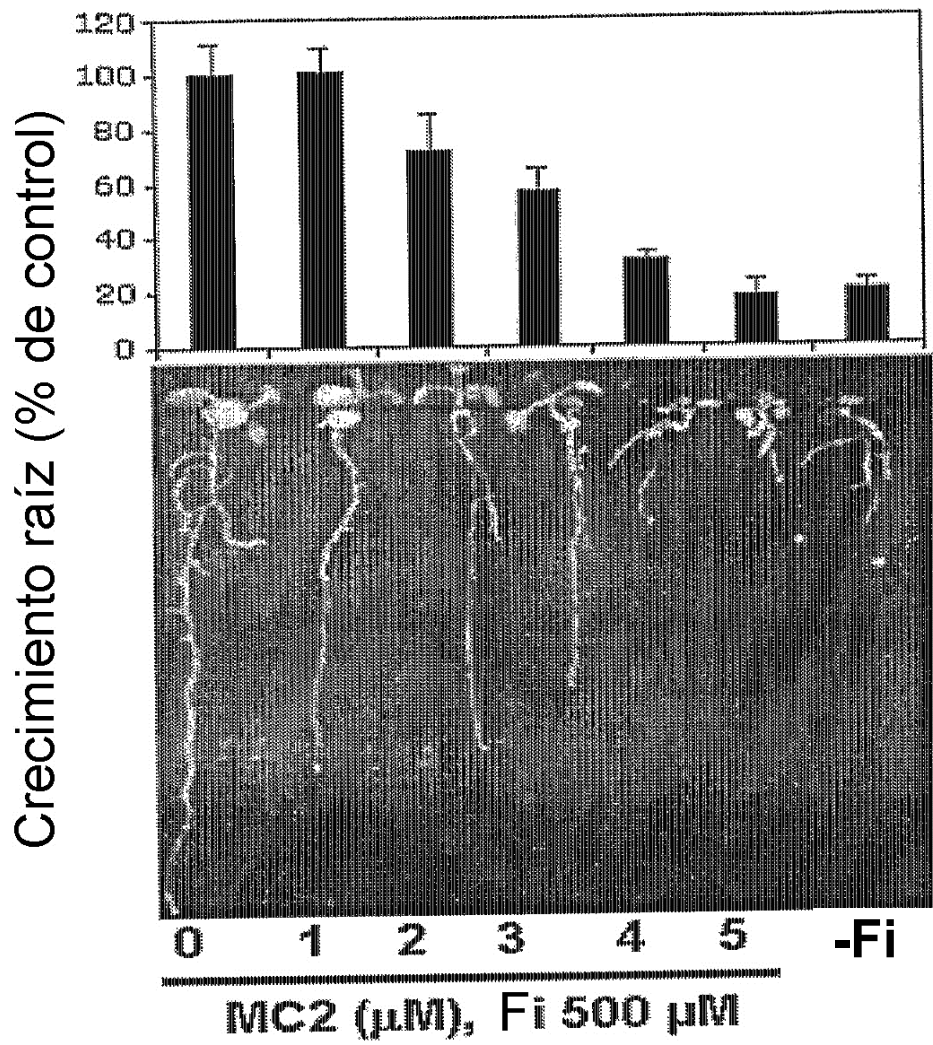


Figura 5

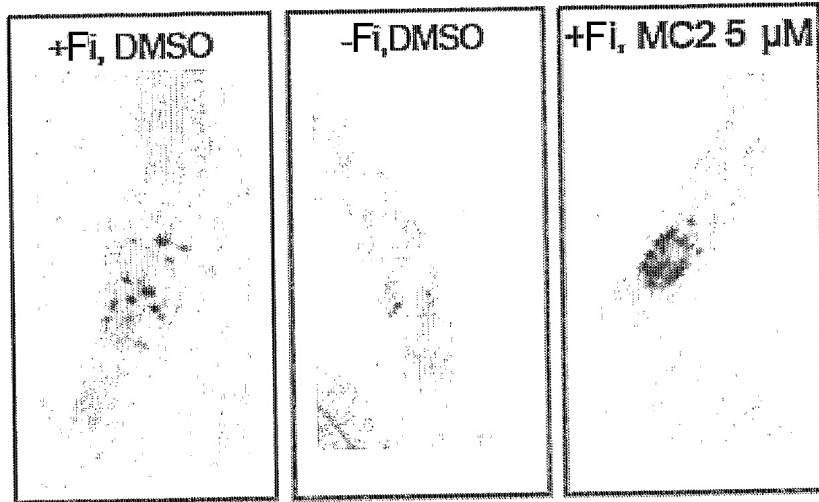


Figura 6

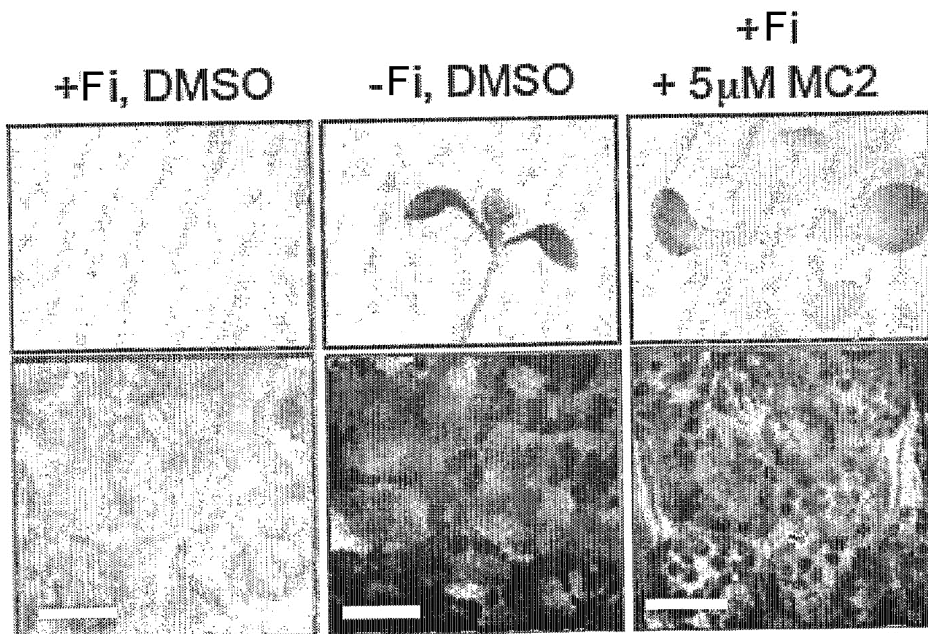


Figura 7

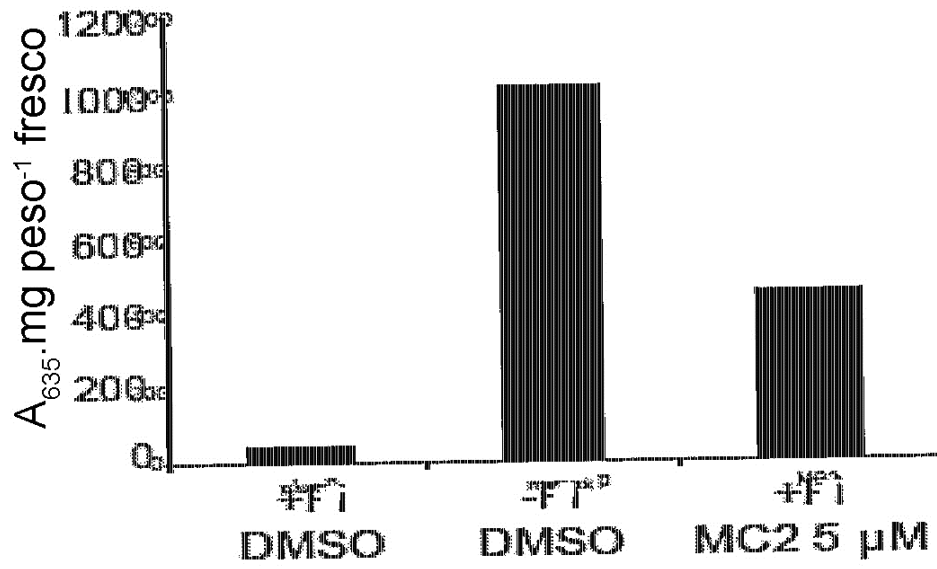


Figura 8

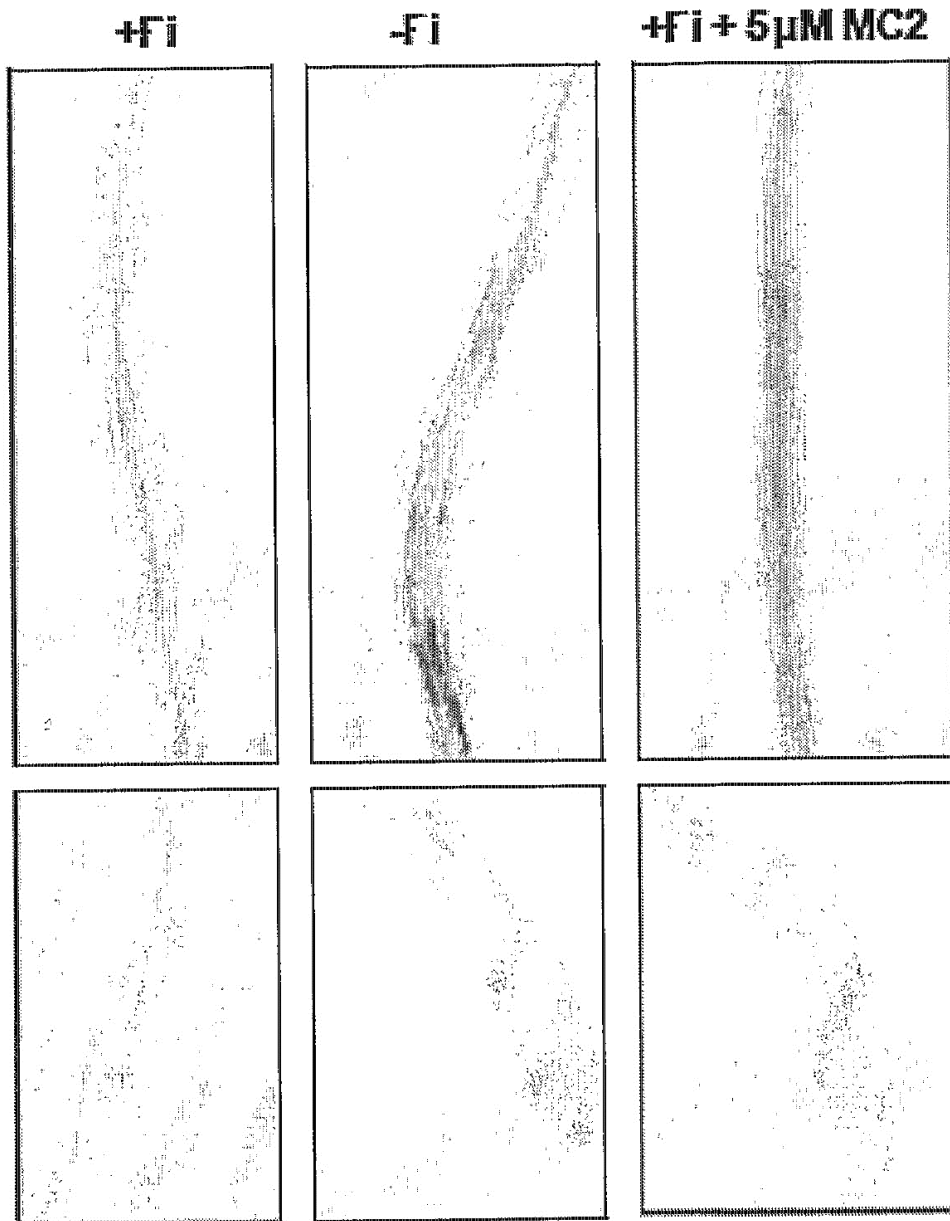


Figura 9

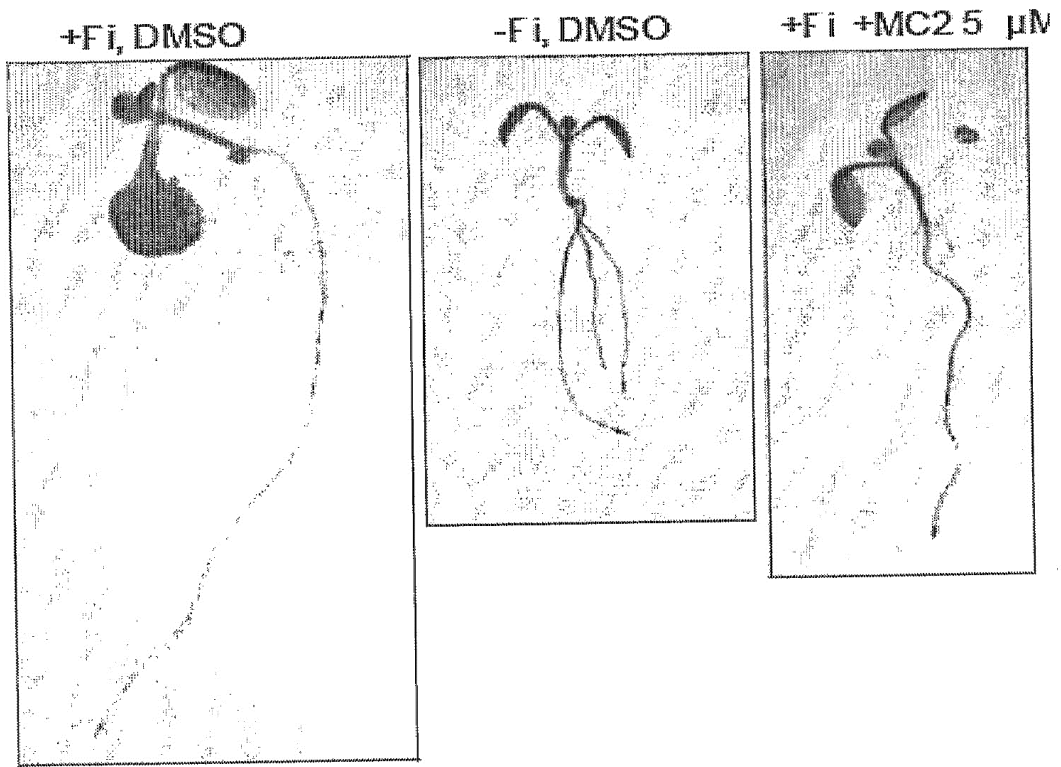


Figura 10

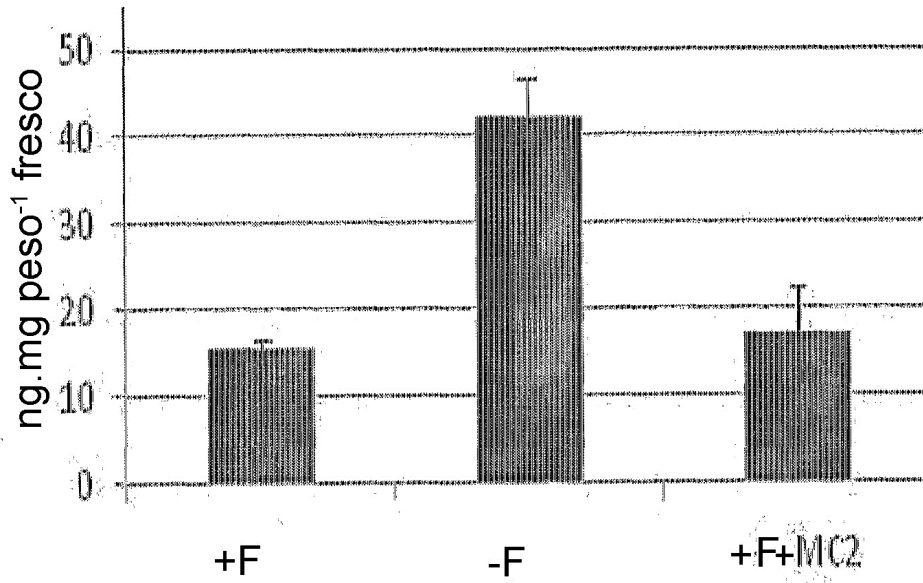


Figura 11

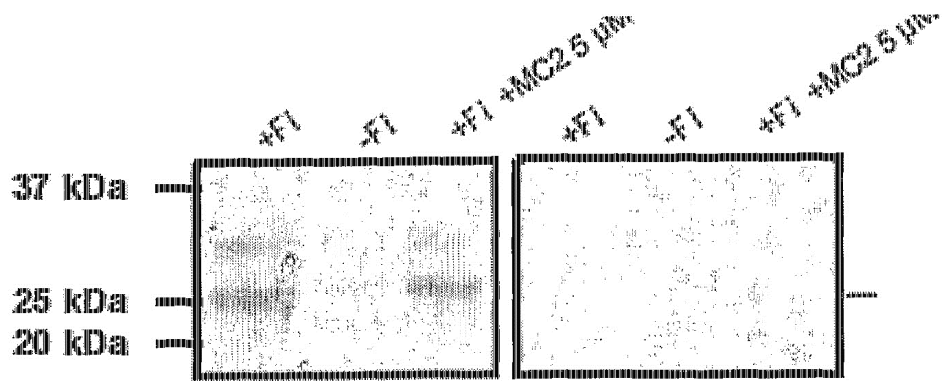


Figura 12

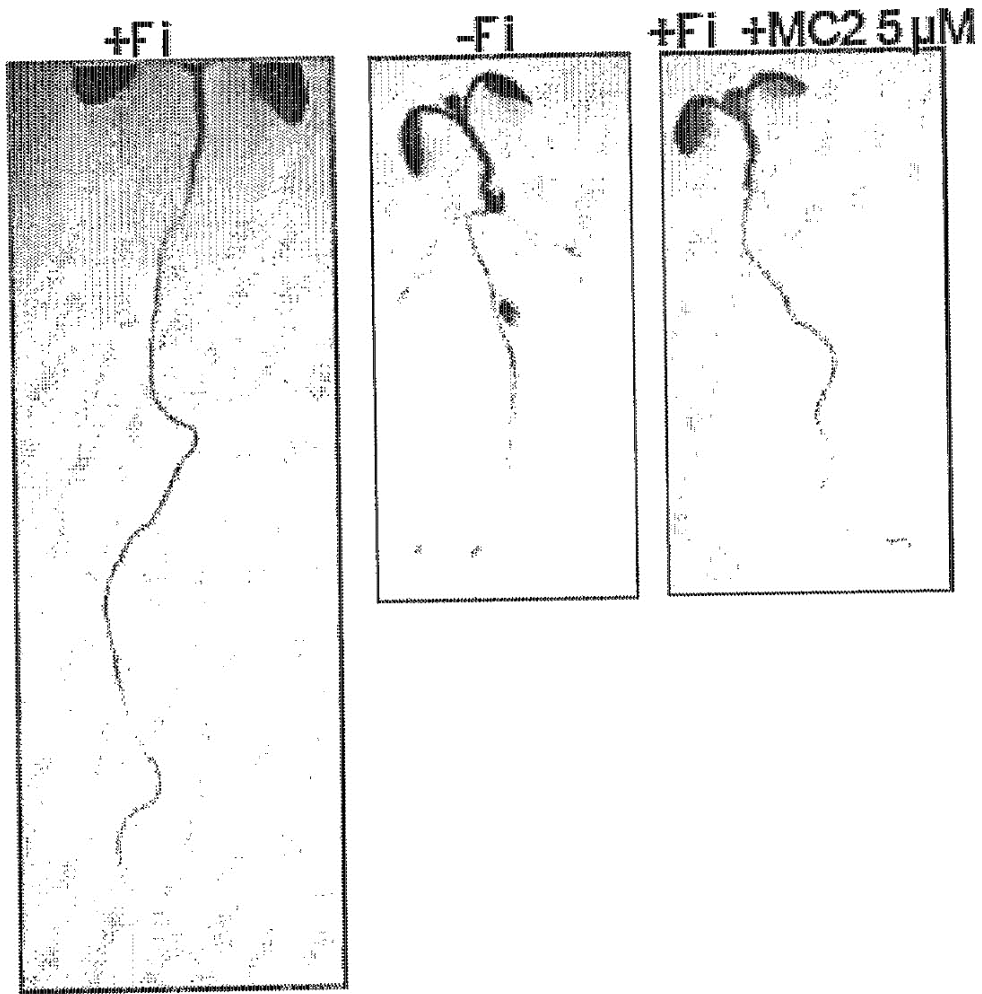


Figura 13

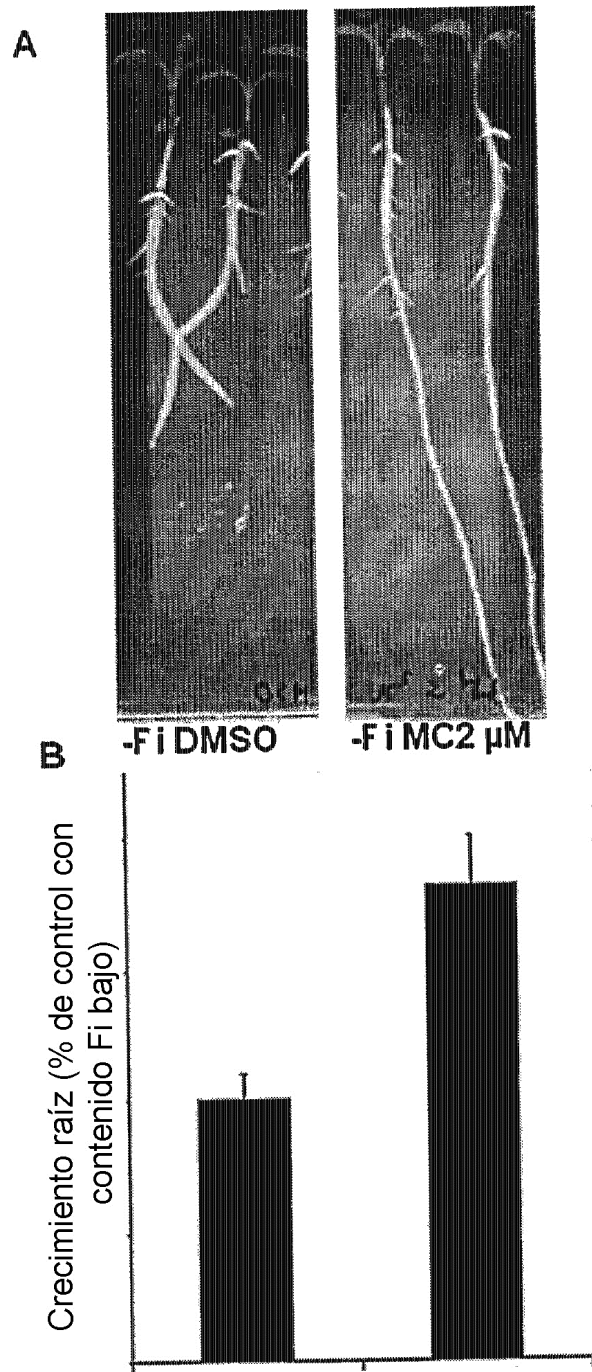


Figura 14