

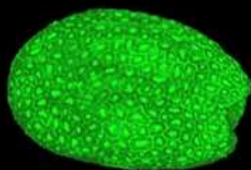


UNIVERSIDAD  
DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA VEGETAL  
CENTRO HISPANO LUSO DE INVESTIGACIONES  
AGRARIAS (CIALE)  
FACULTAD DE BIOLOGÍA



Caracterización bioquímica y funcional de proteínas que  
interaccionan con fosfatasa 2C en germinación y  
respuestas a estrés reguladas por ABA.



Xandra Amada Saavedra Contreras



Diciembre , 2013

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

Departamento de Fisiología Vegetal

Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias

Facultad de Biología



Caracterización bioquímica y funcional de proteínas que  
interaccionan con fosfatasa 2C en germinación y  
respuestas a estrés reguladas por ABA.

**Xandra Amada Saavedra Contreras**

**Diciembre, 2013**

**Dña. BERTA DOPICO RIVELA, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

CERTIFICO:

Que la presente Memoria titulada **“Caracterización bioquímica y funcional de proteínas que interaccionan con fosfatasa 2C en germinación y respuestas a estrés reguladas por ABA”** ha sido realizada en el Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca por la licenciada **D<sup>a</sup>. XANDRA AMADA SAAVEDRA CONTRERAS**, bajo la dirección de la Dra. Dña. M<sup>a</sup> Dolores Rodríguez Martín y del Dr. D. Óscar Lorenzo Sánchez, y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Para que así conste, firmo el presente certificado en Salamanca a 11 de Noviembre de 2013.

Fdo: Dra. Dña Berta Dopico Rivela

**Dña. M<sup>a</sup> DOLORES RODRÍGUEZ MARTÍN**, CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL Y **D. ÓSCAR LORENZO SÁNCHEZ**, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAMOS:

Que la presente Memoria titulada **“Caracterización bioquímica y funcional de proteínas que interaccionan con fosfatasa 2C en germinación y respuestas a estrés reguladas por ABA”** ha sido realizada en el Departamento de Fisiología Vegetal y el Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca, bajo nuestra dirección, por la licenciada **D<sup>a</sup>. XANDRA AMADA SAAVEDRA CONTRERAS** y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Para que así conste, firmamos el presente certificado en Salamanca a 11 de Noviembre de 2013.

Fdo: Dr. D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Dolores Rodríguez Martín

Fdo: Dr. D. Óscar Lorenzo Sánchez

Fdo: Xandra Amada Saavedra Contreras

## AGRADECIMIENTOS

Intentaré en estas líneas transmitir mis sentimientos, pero creo que después de los años transcurridos, los años vividos y compartidos, las palabras ya son vanas. Son muchos a quienes debo agradecer, hoy que la Tesis, aquélla que un día inicié con muchas dudas, ya es una realidad, sé que sola no lo hubiera logrado, regreso a mi país con la maleta llena, llena de ciencia, llena de conocimiento, pero sobre todo repleta de amigos.

Agradecer a mis directores de Tesis Dra. M<sup>a</sup> Dolores Rodríguez Martín y Dr. Oscar Lorenzo Sánchez, porque ustedes fueron quienes me dieron la oportunidad de descubrir este mundo de la Investigación. A ti Loli, por todos los consejos, la paciencia que pusiste en mí, porque siempre preguntaste ¿cómo estaba?, no todos los jefes preguntan eso, eres especial. A ti Oscar, gracias por tus enseñanzas, por el ánimo que siempre pones a las cosas y sé que después de todas los momentos duros que hubieron en el ex Lab5, lo difícil que fue la mudanza al ahora Lab7, ya tenemos el laboratorio que quisimos, me incluyo porque saben?, sé que nunca dejare de ser parte de vuestro laboratorio. Me dio alegría haber compartido con ustedes estos años de mi vida, realmente gracias...

A mi grupo que inicialmente fuimos Lab5 y que aprendí muchas cosas, cada uno de ustedes puso el matiz en mi estancia. A ti Alejandro, pero para mi seguirás siendo "pelanas", nunca olvidaré que fuiste el compañero de las largas tardes extrayendo DNA o de las madrugadas para hacer las PCR, eres grande. Tú María, mi "Chulina", cómplice para hacer bromas, para hacer enrojecer o asustar a Alex, sigue tu sueño, sé que lo alcanzarás. A Abelardo, sí pupilo, aún recuerdo cuando llegaste al laboratorio, avergonzado y asustado, quien diría que hoy eres el "cuasi" jefe, es broma, pero sé que hay algo que no te enseñé, porque la calidad de persona y amigo eso te lo enseñaron tus padres. A Blanquita, mi blanquiñosa, si hubieran muchas como tú sé que el planeta sería mucho mejor. Los Alvaritos: José Luis y Álvaro ambos nos abandonaron, pero bien por ustedes porque se fueron en pos de lo que les agrada y estoy segura que donde estén, siempre lo harán bien. Ahora el laboratorio creció y somos más a Marta, Pablo, Patri,...

Hago extensivo mi agradecimiento a todos los miembros del Departamento de Fisiología Vegetal, a la directora Dra. Berta Dopico, a las Dras. Emilia,

Nieves, Tere y Pepa que me han acogido durante los años de mi permanencia en el departamento. A Charo, la secretaria, por habernos ayudado y orientado en cada trámite que debíamos realizar.

A ti Heli, por tus palabras de ánimo y la sonrisa de todos los días, el departamento sin ti no fue lo mismo, tus consejos siempre fueron llenos de sabiduría propia de la experiencia, gracias Heli.

A los miembros del CIALE, a los grupos de Genética, Fitopatología y Control Biológico, Interacción Mutualista y Palinología y Conservación, con quienes compartimos la mudanza al nuevo centro y aprendimos a solucionar los problemas que surgían.

A los miembros del grupo de Investigación del Dr. Pedro Luis Rodríguez Egea del IBMCP-CSIC, Valencia, a Silvia, Julia y Américo gracias por haberme enseñado la técnica de BiFC.

A ti Roy porque mis sueños fueron tuyos, y siempre haces que el día a día sea mejor "Dios me bendijo cuando te trajo a mi vida" en mi camino no sé si largo o corto siempre estarás allí, cogiendo mi mano. Gracias.

Finalmente, pero en primer lugar de importancia, a mis papás Luis y Ubaldina, porque hoy que soy mamá entiendo el gran amor de los padres, y solo pido a Dios que me dé la sabiduría para conducir y enseñar a Jheriel como lo hicieron ustedes conmigo.

A mis hermanos Luis y Karina, con quienes crecimos convencidos que los sueños son alcanzables cuando uno lo decide así.

A Dios porque en el transcurso de este sueño me dio uno muy grande, me dio a ti Jheriel, cuando puedas leer, quiero que sepas que eres un regalo de Dios, sé que el trajinar en este mundo cada día se hace más difícil pero ten la seguridad que siempre estaremos allí donde tú lo necesites. Además, porque puso en mi camino a todas las personas que hicieron más fácil mi vida lejos de casa y, ahora que culminó este sueño, decirles a todos gracias... y que nunca me olvidare de ninguno de vosotros.

Xandra Amada



**ABREVIATURAS**

## ABREVIATURAS

Las abreviaturas y siglas utilizadas en este trabajo se especifican a continuación. Para los nombres de unidades y símbolos utilizados se ha seguido el Sistema Internacional de Unidades. Las sustancias químicas se rigen según el sistema de nomenclatura de la IUPAC

<b>3-AT</b>	3-aminotriarol	<b>α</b>	alfa
<b>λ</b>	lambda		
<b>aa</b>	aminoácidos	<b>AD</b>	dominio de activación del factor transcripcional GAL4
<b>ABA</b>	ácido abscísico	<b>Amp</b>	ampicilina
<b>aba</b>	mutante deficiente en ABA	<b>ATP</b>	adenosín trifosfato
<b>abi</b>	mutante insensible ABA		
<b>ABRC</b>	Arabidopsis Biological Resource Center		
<b>BSA</b>	seroalbúmina bovina		
<b>C</b>	grados centígrados	<b>cpm</b>	cuentas por minuto
<b>CaMV 35S</b>	promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor	<b>CTAB</b>	bromuro de cetil trimetilamonio
<b>cDNA</b>	DNA complementario	<b>C-terminal</b>	carboxi terminal
<b>Ci</b>	Curios	<b>CTP</b>	citidina trifosfato
<b>Col-0</b>	ecotipo Columbia		
<b>DEPC</b>	dietil pirocarbonato	<b>D.O</b>	densidad óptica (nm)
<b>DMF</b>	N,N-dimetilformamida	<b>DRE</b>	elemento de respuesta a sequía
<b>DMSO</b>	dimetil sulfóxido	<b>DTT</b>	ditiotreitól
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico	<b>EDTA</b>	ácido etilen-diamino-tetraacético
<b>DNA-BD</b>	dominio de unión a DNA del factor transcripcional GAL4		
<b>dNTPs</b>	deoxinucleótidos trifosfato		
<b>GAs</b>	giberelinas	<b>GFP</b>	proteína verde fluorescente
<b>h</b>	horas		
<b>IAA</b>	ácido indolacético		



## ABREVIATURAS

<b>Kan</b>	kanamicina	<b>kDa</b>	kilodalton
<b>kb</b>	kilo pares de bases	<b>kV</b>	kilovoltios
<b>LB</b>	medio de cultivo Luria-erBertani		
<b>Ler</b>	ecotipo Landsberg, portador de la mutación <i>erecta</i>		
<b>M</b>	molar	<b>MOPS</b>	ácido 3 morfolino propano sulfónico
<b>MES</b>	ácido 4-morfolino-etano-sulfónico	<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>Min</b>	minutos	<b>MS</b>	medio de Murashige y Skoog
<b>mM</b>	milimolar		
<b>N-terminal</b>	amino terminal	<b>NASC</b>	Nottingham Arabidopsis Stock Centre
<b>NAD</b>	nicotinamida adenina dinucleótico	<b>NTP</b>	nucleótido trifosfato
<b>NADH</b>	nicotinamida adenina dinucleótico reducido		
<b>P</b>	peso	<b>PP2C</b>	proteín-fosfatasa de tipo 2C
<b>PAGE</b>	electroforesis en geles de poliacrilamida	<b>PYR1-PYL/RCAR</b>	pyrabactin resistance 1-PYR1 like/regulatory componente of ABA receptor
<b>pb</b>	pares de bases		
<b>PCB</b>	paclobutrazol		
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa		
<b>PP</b>	proteín-fosfatasa		
<b>RNA</b>	ácido ribonucleico	<b>rRNA</b>	RNA ribosómico
<b>RNA poli(A)+</b>	RNA mensajero poliadenilado	<b>RT-PCR</b>	transcripción inversa seguida de PCR
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto		
<b>s</b>	segundos	<b>SDS-PAGE</b>	electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
<b>SDS</b>	dodecil sulfato sódico		
<b>TAE</b>	tampón tris-acetato-EDTA	<b>TE</b>	tampón tris-EDTA
<b>TBE</b>	tampón tris-borato-EDTA	<b>Tris</b>	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol

<b>μg</b>	microgramo	<b>μM</b>	micromolar
<b>μl</b>	microlitro	<b>UTR</b>	región no traducida
<b>V</b>	volumen	<b>v/v</b>	relación volumen/volumen
<b>WT</b>	ecotipo silvestre		
<b>w/v</b>	relación peso/volumen		
<b>X-Gal</b>	5-bromo-4-cloro-3- indolil-β-D- galactopiranosido		
<b>YFP</b>	proteína fluorescente	amarilla	

# ÍNDICE

.....	<b>INTRODUCCIÓN</b>
1. LA SEMILLA .....	3
1.1. Embriogénesis.....	4
2. DORMICIÓN DE SEMILLAS.....	6
2.1. Dormición .....	6
2.2. Tipos de dormición .....	8
2.3. Causas de la dormición .....	8
2.4. Expresión génica y metabolismo durante la dormición. ....	10
2.4.1. El control transcripcional .....	10
2.4.2. Expresión génica durante la dormición .....	11
2.5. Eliminación de la dormición .....	12
2.5.1. Tratamientos que eliminan la dormición.....	13
2.5.2. Mecanismos de eliminación de la dormición .....	15
3. GERMINACIÓN. ....	16
4. EL ÁCIDO ABSCÍSICO .....	22
4.1. Efectos fisiológicos del ABA. ....	23
4.2. El ABA en la embriogénesis .....	23
4.3. El ABA en la dormición.....	25
4.4. El ABA en la germinación .....	27
4.5. El ABA en las respuestas a estreses abióticos .....	30
4.6. El ABA en las respuestas a estreses bióticos .....	32
5. MECANISMO DE ACCIÓN DEL ABA TRANSMISIÓN DE SEÑALES.....	33
5.1. Mecanismo general de transmisión de señales .....	34
5.2. Fosforilación/desfosforilación de proteínas.....	37
5.2.1. Proteín-kinasas (PKs).....	38
5.2.2. Proteín-fosfatasas (PPs). ....	40

# ÍNDICE

Proteín –fosfatasas de tipo 2C .....	41
5.3. Factores transcripcionales .....	44
..... <b>ANTECEDENTES Y OBJETIVOS</b>	
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO.....	49
..... <b>MATERIALES Y TÉCNICAS</b>	
1. MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO .....	53
1.1. Semillas .....	53
1.2. Microorganismos .....	53
1.3. Vectores empleados .....	54
2. CONDICIONES DE SIEMBRA,CULTIVO Y TRATAMIENTOS EMPLEADOS .....	55
2.1. Esterilización y estratificación de las semillas .....	55
2.2. Siembra de semillas .....	56
2.2.1. Cultivo in vitro .....	56
2.2.2. Obtención de plántulas .....	57
2.3. Tratamientos de germinación utilizados .....	57
3. MANIPULACIÓN DE MICRORGANISMOS.....	58
3.1. Crecimiento: condiciones y medios de cultivo .....	58
3.2. Conservación de cepas.....	61
3.3. Preparación de células competentes.....	61
3.4. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	62
4. ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....	63
4.1. Extracción y purificación de DNA genómico .....	63
4.2. Extracción y purificación de RNA total.....	64
4.3. Cuantificación de ácidos nucleicos .....	65
4.4. Extracción y purificación de DNA plasmídico.....	66

# ÍNDICE

4.5. Tratamiento y modificación del DNA .....	67
4.5.1. Digestión del DNA con enzimas de restricción .....	67
4.5.2. Ligación: T4 DNA ligasa. ....	68
4.5.3. Ligación : Tecnología Gateway.....	69
4.5.4. Enzimas modificadoras .....	70
4.6. Electroforesis de ácidos nucleicos: separación de fragmentos en geles de agarosa .....	72
4.7. Purificación de fragmentos de DNA .....	74
4.8. Marcaje radiactivo del DNA.....	75
4.9. Transferencia e hibridación de ácidos nucleicos.....	76
4.9.1. Southern blot .....	76
4.9.2. Northern blot .....	77
4.9.3. Hibridación y autorradiografía.....	79
4.10. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	80
4.10.1. Técnica de PCR.....	80
4.10.2. PCR cuantitativa (Q RT PCR).....	82
4.11. Secuenciación del DNA.....	84
5. EXPRESIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS. (BIOMEDAL) .....	84
5.1. Expresión de proteínas en <i>E. coli</i> . ....	84
5.1.1. Construcción de los plásmidos recombinantes y transformación. ....	85
5.2. Purificación de proteínas C-LYTAG .....	86
5.3. Análisis de proteínas por SDS-PAGE. ....	87
5.3.1. Electroforesis de proteínas. ....	87
5.3.2. Detección de las proteínas. ....	88
5.4. Determinación de actividad fosfatasa. ....	89
6. ENSAYOS DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURA (HYBRIGENICS) .....	90
7. OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS.....	91
7.1. Trasformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> por <i>Agrobacterium</i> .....	91
7.1.1. Construcciones para la transformación de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> ..	

# ÍNDICE

.....	91
7.1.2. Preparación de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	92
7.1.3. Transformación de <i>A. tumefaciens</i> .....	93
7.1.4. Preparación de plásmidos de <i>A. tumefaciens</i> .....	93
7.1.5. Infiltración de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> con <i>A. tumefaciens</i> .....	93
7.2. Selección de semillas transgénicas .....	95
7.2.1. Análisis de la segregación del marcador de resistencia a kanamicina a la generación T2 .....	95
7.2.2. Caracterización molecular y fenotípica de las plantas transgénicas .....	96
7.3. Cruzamientos y recolección de semillas .....	98
8. TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA DE CÉLULAS DE EPIDERMIS DE CEBOLLA POR BOMBARDEO DE PARTÍCULAS .....	99
8.1. Preparación de células epidérmicas de cebolla .....	99
8.2. Preparación de microproyectiles de DNA.....	99
8.3. Bombardeo de las células de epidermis de cebolla.....	100
9. COMPLEMENTACIÓN BIMOLECULAR FLUORESCENTE (BiFC).....	101
9.1. Crecimiento de plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	101
9.2. Construcciones realizadas.....	102
9.3. Transformación transitoria por agroinfiltración.....	102
10. ANÁLISIS Y PRESENTACIÓN DE DATOS.....	103
10.1. Fotografía. Autorradiografía.....	103
10.2. Análisis informático.....	104
10.3. Presentación de datos.....	104
10.3.1. Pautas seguidas en la redacción de esta memoria.....	105
.....	<b>RESULTADOS</b>
1. CARACTERIZACIÓN DE PROTEINAS QUE INTERACCIONAN CON LA PROTEÍN-FOSFATASA DE TIPO 2C (FsPP2C1) DE <i>Fagus sylvatica</i> . .....	108

# ÍNDICE

1.1. Ensayos de doble híbrido en levadura. ....	108
1.2. Aislamiento y caracterización del clon <i>PYL8/RCAR3</i> . ....	109
1.2.1. Determinación del tamaño del clon y de su mRNA correspondiente. ....	109
1.2.2. Estudio comparativo del clon <i>PYL8/RCAR3</i> .con otras proteínas ..... 111	
1.2.3. Relación filogenética de <i>PYL8/RCAR3</i> con otras proteínas vegetales. ....	114
1.2.4. Caracterización de la proteína deducida de la secuencia nucleotídica.....	117
1.3. Comprobación de la interacción <i>in planta</i> mediante BiFC. ....	120
1.4. Expresión del clon <i>PYL8/RCAR3</i> . ....	122
1.4.1. Estudio <i>in silico</i> de la expresión del clon <i>PYL8/RCAR3</i> durante la germinación y en respuesta a distintos tratamientos. ....	122
1.5. Expresión y actividad <i>in vitro</i> de las proteínas <i>FsPP2C1</i> y <i>PYL8/RCAR3</i> . ....	126
1.5.1. Expresión <i>in vitro</i> de la proteína. ....	126
1.5.2. Determinación de la actividad proteín-fosfatasa <i>in vitro</i> . ....	127
1.6. Localización subcelular de las proteínas <i>FsPP2C1</i> y <i>PYL8/RCAR3</i> . ....	128
2. ANÁLISIS FUNCIONAL DE <i>PYL8/RCAR3</i> EN LA DORMICIÓN/GERMINACIÓN Y SU PAPEL EN LA SEÑALIZACIÓN DE ABA. ....	129
2.1. Generación de las líneas transgénicas <i>35S:PYL8/RCAR3</i> . ....	129
2.2. Segregación de los transgenes en la progenie. ....	131
2.3. Caraterización molecular del transgén <i>PYL8/RCAR3</i> .....	132
2.4. Caracterización fenotípica de las plantas <i>35S:PYL8/RCAR3</i> . ....	135
2.4.1. Estudio de la germinación en semillas que sobreexpresan <i>35S: PYL8/RCAR3</i> .....	135
2.4.2. Estudio de la dormición en semillas que sobreexpresan <i>35S:PYL8/RCAR3</i> .....	138
2.4.3. Hipersensibilidad al estrés salino y osmótico de <i>35S:PYL8/RCAR3</i> .....	140
2.4.4. Efectos de la sobreexpresión de <i>35S:PYL8/RCAR3</i> en tejidos vegetativos .....	142
2.5. Análisis de la expresión génica en plantas <i>35S:PYL8/RCAR3</i> .....	146
2.6. Análisis de la pérdida de función de <i>PYL8/RCAR3</i> .....	148

# ÍNDICE

2.6.1. Caracterización fenotípica del mutante de pérdida de función .....	149
2.6.2. Caracterización molecular en el mutante de pérdida de función .....	151
3. GENERACIÓN DE DOBLES TRANSGENICAS 35S:PYL8/RCAR3; 35S:FSP2C1 .....	152
.....	<b>DISCUSIÓN</b>
1. DISCUSIÓN GENERAL.....	157
2. EL RECEPTOR DE ABA PYL8/RCAR3 INTERACCIONAN CON FSP2C1 E INHIBEN SU ACTIVIDAD .....	158
3. EL ANALISIS FUNCIONAL DE PYL8/RCAR3 MUESTRA SU PAPEL COMO REGULADOR POSITIVO DE LA SEÑALIZACIÓN DE ABA.....	163
.....	<b>CONCLUSIONES</b>
CONCLUSIONES .....	174
.....	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>
BIBLIOGRAFÍA .....	178





# INTRODUCCIÓN



## 1.- LA SEMILLA.

Las semillas son la unidad de reproducción sexual de las plantas superiores y tienen la función de multiplicar y perpetuar la especie a la que pertenecen. Además, es uno de los elementos más eficaces para que la especie se disperse, tanto en el tiempo como en el espacio. Una vez que la semilla ha completado su desarrollo y ha madurado, se produce la expansión de órganos, la acumulación de proteínas de reserva y la preparación de la semilla para la dormición (Goldberg et al.,1994). El embrión entra en una fase quiescente, condición que se caracteriza por un retraso del metabolismo y crecimiento debido a que el medio ambiente no lo permite. Previamente a la desecación se produce la acumulación de una serie de proteínas cuya función es proteger al embrión durante este proceso (Delseny et al.,2001).

Para que la semilla cumpla con su objetivo es necesario que el embrión se transforme en una plántula que sea capaz de valerse por sí misma y, finalmente, convertirse en una planta adulta. Todo ello comprende una serie de procesos metabólicos y morfogénéticos cuyo resultado final es la germinación de las semillas.

Para que el proceso de germinación, es decir, la recuperación de la actividad biológica por parte de la semilla seca, tenga lugar, es necesario que se den una serie de condiciones ambientales favorables como son: un sustrato húmedo, suficiente disponibilidad de oxígeno que permita la respiración aerobia y una temperatura adecuada para los distintos procesos metabólicos y para el desarrollo de la plántula.

Sin embargo, las semillas de muchas especies son incapaces de germinar, incluso cuando se encuentran en condiciones favorables. Esto es debido a que las semillas se encuentran en estado de dormición, y la semilla se mantendrá en este estado durante un tiempo variable, dependiendo de la especie, hasta que llegado el momento, pierda su dormición y sea capaz de germinar.

En esta introducción se recopilan los conocimientos actuales más relevantes sobre la germinación de semillas, así como el mecanismo de acción y los efectos

del ABA en los procesos de desarrollo y respuesta a estrés, utilizando la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

## 1.1 Embriogénesis

La embriogénesis comprende el conjunto de cambios morfológicos, estructurales y de expresión génica que tienen lugar desde la formación del cigoto hasta que el embrión está diferenciado. (Figura I.1, Goldberg et al., 1994). La embriogénesis, desde el punto de vista morfológico, puede dividirse en los estadios preglobular, globular, transición, corazón, torpedo y embrión maduro. Comprende tres fases principales de desarrollo: 1) la llamada fase temprana, que se caracteriza por una elevada tasa mitótica asociada a un aumento de los niveles de citoquininas; 2) una fase intermedia en que se sintetizan las giberelinas (GA) y auxinas y en que el crecimiento ocurre por expansión celular; 3) La fase de maduración comienza una vez que el embrión y el endospermo han completado su morfogénesis (Wobus et al., 1999a). Esta fase que caracteriza por el cese del crecimiento, disminución el contenido en giberelinas y auxinas y un aumento en los niveles de ácido Abscísico (ABA). El ABA evita la germinación precoz, prepara al embrión para resistir la desecación posterior e induce la dormición (Totterdell y Roberts, 1980; Raz et al., 2001; Rock y Quatrano, 1995). Además, participa en el cese del ciclo celular e induce la expresión de proteínas de reserva (Wang et al., 1998; Finkelstein et al., 2002). En la mayoría de las especies se producen dos picos en la acumulación del ABA. El primero, que es de origen materno, coincide con la acumulación de proteínas de reserva y previene la germinación precoz ó viviparismo. El segundo, que tiene origen embrionario, coincide con la pérdida de agua por parte de la semilla y es esencial para la inducción de la dormición, inhibición de la germinación y adquisición de tolerancia a la desecación gracias a la acumulación de proteínas tipo LEA (LEA: Late Embryogenesis Abundant) y dehidrinas (Busk y Pages, 1998; Finkelstein et al., 2002; Goldberg et al.,1989; Karssen et al., 1983; Raz et al., 2001; Rock y Quatrano,1995).

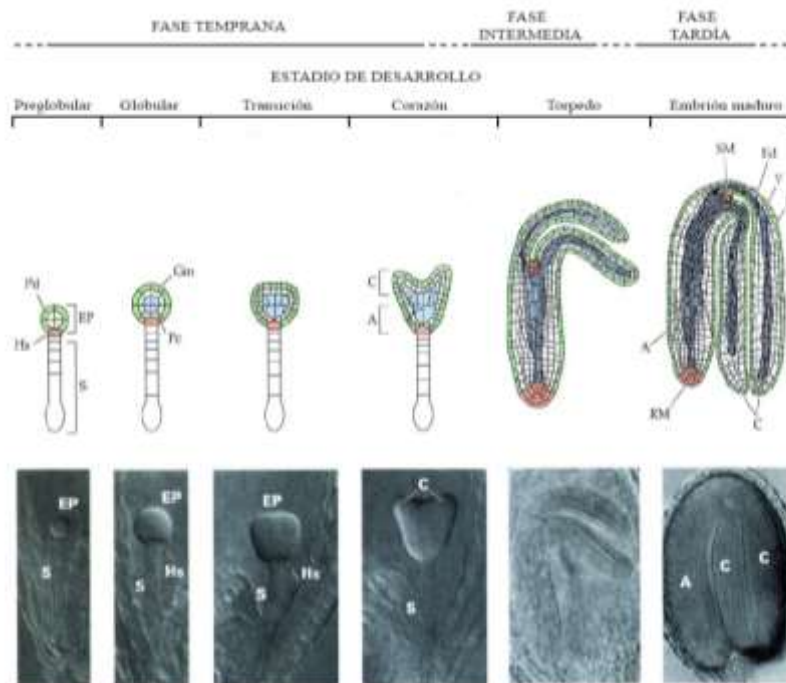
El desarrollo del endospermo comprende cuatro fases: 1) fase de cenocito, 2) fase citocinesis, 3) fase de diferenciación y 4) fase de maduración (Bewley, J.D., 1997).

La maduración de la semilla comienza cuando el embrión y el endospermo han completado su morfogénesis y se caracteriza por el cese del crecimiento, seguido por la síntesis y acumulación de sustancias de reserva. Las fases tempranas y medias de la maduración están reguladas por la acción del ácido abscísico (ABA), sintetizado inicialmente en los tejidos maternos y luego, aunque en menor medida, por el embrión y el endospermo (Nambara et al., 2002). El ABA evita la germinación precoz, prepara al embrión para resistir la desecación e induce la dormición (Torti et al., 1986; Raz et al., 2001; Rock y Quartano., 1995). La transcripción de genes que codifican para las principales proteínas de reserva ocurre principalmente en este período. En la etapa de maduración tardía, los niveles de ABA decaen y comienzan a acumularse proteínas de tipo LEA (Late Embriogenesis Abundant) y dehidrinas, asociadas a los procesos de deshidratación y tolerancia a la desecación (Nambara et al, 2003., Finkelstein et al., 2002, Goldberg et al., 1989).

Durante esta etapa, la acumulación de metabolitos es principalmente bajo la forma de carbohidratos (endospermo) o lípidos (embrión). La maduración no es un proceso obligatorio y si el embrión es extraído de la semilla y el efecto de ABA neutralizado, éste es capaz de germinar y desarrollarse en una plántula normalmente. Además del ABA, ha sido demostrada la síntesis y la acción de Giberelinas durante la maduración de la semilla, y actualmente es ampliamente aceptado el hecho de que la maduración no está regulada solo por ABA, sino por la relación ABA/GA (White et al., 2000).

En *Arabidopsis*, el cigoto tras elongarse se divide asimétricamente dando lugar a dos células hijas de diferente tamaño que seguirán distintos programas de desarrollo. Por un lado, la célula apical (de menor tamaño) sufrirá dos divisiones longitudinales y una transversal para dar lugar a un embrión verdadero de 8 células, en las que las 4 células apicales generarán el meristemo apical y los cotiledones, y las 4 células basales formarán la raíz e hipocotilo contribuirán a la

formación de los cotiledones y el meristemo de la raíz. Por su parte la célula basal (la más grande de las dos células hijas) se dividirá transversalmente para formar una “cadena” de 6 a 9 células denominadas suspensor, que une el embrión al sistema vascular, representando una fuente de hormonas y nutrientes para el embrión en desarrollo. Únicamente, la célula superior del suspensor (hipófisis) contribuye a la formación del embrión, dando lugar a las partes más distales del meristemos de la raíz (Dolan et al., 1993). Una vez que el embrión ha alcanzado la fase de torpedo, se activan los mecanismos de muerte celular programada en el suspensor (Yeung y Meinke, 1993).



**Figura I.1** Estadios de desarrollo del embrión de *A.thaliana*. (EP) Embrión propiamente dicho (S) Suspensor (Pd) Protodermis (Ed) Epidermis (Gm) Meristemo Inferior (P) parénquima de reserva (Pc) Procambium (V) Tejido vascular (Hs) Hipófisis (RM) Meristemos radiculares (A) eje de polaridad (C) cotiledones. Adaptado de Bewley et al., 2000.

## 2.- DORMICIÓN DE SEMILLAS

### 2.1.- Dormición

Una de las adaptaciones más importantes de las plantas es la capacidad de sus semillas para permanecer viables en un estado quiescente durante largos

periodos de tiempo. De esta forma pueden sobrevivir en condiciones adversas y germinar cuando las condiciones del medio sean las más adecuadas. Sin embargo, las semillas de algunas plantas no germinan aunque las condiciones sean favorables. Esta situación se conoce como dormición (Bewley, 1997). Se entiende por dormición el estado en el cual una semilla viable no germina aunque se encuentre en condiciones de humedad, temperatura y concentración de oxígeno idóneas para hacerlo. Este estado es distinto de la condición de quiescencia pues, dentro de la propia semilla, existe un impedimento para que se produzca la germinación.

De ello se deduce, que las semillas pueden mantener su viabilidad durante largos períodos de tiempo, y gracias a ello, las semillas sobreviven en condiciones desfavorables.

Las causas por las que no germinan pueden deberse a la existencia de un periodo cronológicamente regulado de interrupción del crecimiento y de disminución del metabolismo durante el ciclo vital, que también se presenta en otros seres vivos. En las plantas superiores puede existir dormición o interrupción del crecimiento en tejidos meristemáticos, por ejemplo en las yemas de crecimiento de las ramas, así como en las semillas. El establecimiento de la dormición está regulado por factores hereditarios que determinan los mecanismos fisiológicos endógenos de las plantas, los cuales interactúan con factores del ambiente en el que las plantas crecen; esto da lugar, a la larga, a cambios evolutivos en las plantas. Entre las condiciones más importantes del ambiente se encuentran las variaciones climáticas de temperatura y humedad, las variaciones microclimáticas derivadas de aspectos fisiográficos y bióticos, como la calidad espectral de la luz y el termoperíodo, así como las características específicas del lugar a las que las plantas se han adaptado para establecerse y crecer. Las variaciones micro y macroclimáticas, así como las condiciones hormonales y nutricionales de la planta progenitora tienen gran influencia en el establecimiento de la dormición en las semillas durante su desarrollo.

## 2.2.- Tipos de dormición.

Se han utilizado muchos tipos de clasificaciones de la dormición de semillas. Según (Karssen 1982a y b), la clasificación más acertada distingue dos tipos de dormición, dormición primaria y dormición secundaria, y está basada en los factores tanto endógenos como exógenos que controlan la dormición.

La dormición primaria o innata se establece durante el desarrollo y maduración de la semilla. Se presenta en el momento que el embrión deja de crecer y está controlada genéticamente, aunque también influyen aspectos metabólicos (estado hormonal de la semilla, flujo de hormonas desde la planta madre) y factores ambientales (factores edáficos, temperatura y luz) (Bewley y Black, 1994; Gubler et al.,2005).

La dormición secundaria puede ser inducida en las semillas maduras una vez que se han separado de la planta progenitora. Puede aparecer en semillas que no presentaban dormición, o bien en semillas que ya han salido de la dormición primaria, cuando están sujetas a condiciones desfavorables para la germinación. Un agente efectivo es la anaerobiosis, la cual se produce cuando hay un exceso de agua, por atmósferas bajas en oxígeno o por testas poco permeables. A veces las temperaturas altas ocasionan este mismo efecto. Hay ocasiones en que la falta de uno de los requerimientos para germinar induce la dormición, como por ejemplo la ausencia de luz. Este tipo de dormición es muy importante desde el punto de vista ecológico, ya que controla la germinación de las semillas una vez dispersadas en el campo. Sin embargo, hay que recordar que cada especie tiene respuestas particulares.

## 2.3.- Causas de la dormición.

La naturaleza del bloqueo que evita la germinación de las semillas que están en dormición pueden ser debida a dos causas: dormición embrionaria, cuando el control de la dormición se encuentra dentro del embrión; y dormición impuesta



por la cubierta, en la cual la dormición es impuesta por la cubierta o testa de la semilla.

El caso más claro de dormición embrionaria, se da cuando un embrión que se ha extraído de la semilla es incapaz de germinar bajo las condiciones adecuadas. El control de este tipo de dormición lo ejercen por un lado los cotiledones, que inhiben el crecimiento del eje embrionario, y por el otro, sustancias inhibitoras de la germinación como el ácido abscísico. Se han realizado experimentos en donde se "lavan" las semillas quitándoles estas sustancias y se ha comprobado la presencia de estos inhibidores, pues después del lavado sí pueden germinar. En ocasiones el embrión está anatómicamente inmaduro y requiere de un tiempo mayor para completar su desarrollo, como en el caso del *Fraxinus excelsior* (fresno) y del *Pinus sylvestris* (un tipo de pino).

En la dormición impuesta por la cubierta, frecuentemente las estructuras responsables no sólo incluyen a la testa, sino también otros tegumentos que rodean a la semilla como la gluma, palea y lemna en las gramíneas, y endospermo, pericarpio y testa. Las cubiertas seminales pueden causar dormición por diferentes mecanismos (Bewley y Black, 1994): interfieren la entrada de agua y el intercambio de gases, contienen inhibidores químicos, impiden la salida de los inhibidores presentes en el embrión, modifican la luz que llega al embrión y ejercen una constricción mecánica.

La interferencia de la entrada de agua es una de las principales causas de la dormición en las semillas de testa dura. (Se ha comprobado que es necesario perforar la capa externa, incluyendo la cutícula y la capa de células en empalizada. Cuando la perforación llega hasta los tejidos internos se inicia la imbibición). Algo similar ocurre con la entrada de oxígeno. En ambos casos no es necesario eliminar toda la cubierta, pues con que ésta se perfora ya se rompe la dormición. Muchas semillas poseen testas mucilaginosas y se cree que, en algunos casos, este mucílago produce la impermeabilidad. En algunos casos, como el de *Iris* o *Rosa*, la testa contiene sustancias que inhiben la germinación. A veces estos inhibidores están dentro de la semilla y la impermeabilidad de la testa evita que se escapen. La gran mayoría de las semillas que requieren luz

para germinar presentan dormición impuesta por la testa, ya que ésta actúa como un filtro por el cual la luz tiene que atravesar. Las semillas tienen diferentes grosores de testa y diferentes pigmentaciones, lo cual modifica la cantidad y calidad de luz que llega al embrión y afecta a la relación Pr/Pfz necesaria para germinar, la cual depende de la luz roja y luz rojo lejano que llega a la semilla. Finalmente, hay varios casos en los cuales una incisión o perforación de la testa elimina la dormición aunque la cubierta no sea impermeable como en los casos anteriores. En estos casos se ha pensado que las cubiertas externas, duras, ejercen una restricción mecánica al crecimiento del embrión.

## **2.4.- Expresión génica y metabolismo durante la dormición.**

### **2.4.1.- El control transcripcional**

Los organismos eucariotas, y entre ellos las plantas, han desarrollado complejos patrones de expresión génica que varían a lo largo de su ciclo de vida y en respuesta a las señales de su entorno. El control transcripcional es el mecanismo más importante por el cual se regulan los niveles, momento y tejido en que un gen se expresa.

La transcripción de un gen comienza con la formación de un complejo de iniciación por la RNA-polimerasa II y los factores de transcripción en el promotor del gen que se va a transcribir. En primer lugar, se forma lo que se conoce como complejo de pre-iniciación (PIC: Pre Initiation Complex), que consiste en la unión de la RNA-polimerasa II a los factores transcripcionales basales o generales del complejo TFIID, que incluyen la proteína de unión a la caja TATA (TBP: TA-TA-box Binding Protein) así como un número de factores asociados. A este PIC se unen además factores transcripcionales, que interactúan específicamente con los elementos reguladores en *cis* (CRE: Cis-Regulatory Elements) presentes en los promotores de sus genes diana. Estos factores se clasifican en activadores, si incrementan la expresión de un gen, y en represores si la disminuyen. Otra clase de factores transcripcionales son los coactivadores o correpresores, que regulan la transcripción interactuando con el PIC ó con los reguladores específicos que se

unen al DNA. Adicionalmente, se pueden unir factores transcripcionales arquitectónicos (cofactores remodeladores o modificadores de la cromatina) que están involucrados en el empaquetamiento/desempaquetamiento del DNA en nucleosomas o estructuras cromatínicas de orden superior (Martínez, 2002).

Los factores que se unen al DNA suelen estar formados por distintos dominios funcionales responsables de la unión específica a los CREs, de la regulación transcripcional (dominios de activación y represión), de las interacciones proteína-proteína y de la localización subcelular con al menos una señal de localización nuclear (NLS: Nuclear Localization Signal; Liu et al., 1999). Los dominios de unión a DNA están por lo general altamente conservados, lo que ha permitido clasificar a la mayoría de los factores transcripcionales eucariotas en distintas familias. En total, se ha observado que los genes que codifican factores transcripcionales en *Arabidopsis* constituyen aproximadamente un 6% de su genoma, mientras que en otros eucariotas como *Drosophila melanogaster* o *Saccharomyces cerevisiae* están en torno al 3,5 % (Shiu et al., 2005).

#### **2.4.2.- Expresión génica durante la dormición.**

La dormición implica la incapacidad del embrión para comenzar el proceso de germinación, lo que supone que en los embriones falta algún componente esencial del proceso de germinación. Tal componente podría ser una proteína, es decir, el producto de la expresión de un gen. Existen genes que se expresan en semillas durmientes y no en semillas no durmientes. Se ha descrito un clon de cDNA cuyo gen correspondiente se expresaba tanto en embriones durmientes como no durmientes de *Bromus secalinus*, pero desaparecía cuando la semilla germinaba (Goldmark et al., 1992). Por otra parte, en semillas de *Pseudotsuga menziesii* se han observado cambios en la expresión de algunos genes durante el tratamiento frío que produce la eliminación de la dormición (Taylor et al., 1993), y lo mismo ocurre en semillas de *Fagus sylvatica* (Nicolás et al., 1996; 1997a y b; Lorenzo et al., 2001; 2002b; 2003). Puede ser, por tanto, que la dormición requiera la expresión de uno o varios genes, cuyos productos génicos eviten la germinación.

Actualmente una de las líneas de investigación más prometedoras en relación a la expresión génica de la dormición es la de estudiar el papel de la fosforilación y desfosforilación de proteínas por proteínas quinasas y fosfatasa. Las proteínas quinasas actúan muy a menudo en la transducción de señales externas y, por ello, podrían desempeñar un papel importante en el efecto de las condiciones ambientales en la expresión de la dormición.

La manera más tradicional de enfocar la regulación metabólica es comparar el metabolismo de semillas durmientes y no durmientes en las primeras fases después de la imbibición y antes de que comience la emergencia radicular en las semillas no durmientes. La línea conductora de estas investigaciones es la suposición de que las semillas durmientes pueden presentar alguna deficiencia metabólica que es corregida durante la rotura o eliminación de la dormición.

Algunas semillas pueden perder su dormición mientras se encuentran en estado de deshidratación (semilla seca) cuando su actividad metabólica es muy baja. Sin embargo, las semillas durmientes imbibidas presentan una actividad metabólica muy elevada, y en este estado es cuando pueden percibir señales externas (luz, frío, temperaturas alternantes, tratamientos químicos y hormonales) que pueden romper la dormición. Los primeros acontecimientos en este proceso son la percepción del estímulo por el embrión y la inmediata transducción de la señal, que conduce a otros acontecimientos secundarios que pueden implicar cambios metabólicos y hormonales, y que transformarían la semilla durmiente en no durmiente.

### **2.5.- Eliminación de la dormición.**

La transición de la dormición a la germinación en condiciones naturales no está influenciada por un único factor, sino por varios factores tanto endógenos (morfológicos, hormonales o metabólicos) como exógenos o ambientales (humedad, luz, temperatura, etc.) (Hilhorst y Karssen, 1990), que pueden actuar simultáneamente.

Actualmente se han descrito una gran variedad de tratamientos capaces de eliminar la dormición, entre los cuales destacan los factores hormonales y ambientales, la eliminación de cubiertas seminales impermeables y la aplicación de agentes químicos.

### **2.5.1.- Tratamientos que eliminan la dormición.**

Muchas semillas, una vez imbibidas, requieren ser sometidas a temperaturas bajas antes de germinar. A este proceso se le denomina estratificación y en él se llevan a cabo cambios metabólicos en las semillas. El mecanismo por el cual la estratificación induce la salida de la dormición todavía no se ha esclarecido, si bien se ha demostrado que se produce un descenso en los niveles de ABA libre (Dulson et al., 1988) y en la sensibilidad al ABA (Corbineau et al., 2002), y un aumento en la síntesis de giberelinas (Ross y Bradbeer, 1971), así como cambios en los patrones de expresión génica, como los descritos en *Pseudotsuga menziesii* (Taylor et al., 1993) y *Fagus sylvatica* (Nicolás et al., 1996; 1997a y b; 1998; Lorenzo et al., 2001; 2002a y b; 2003; Calvo et al., 2004a y b). Por ejemplo, en las semillas de cerezo estratificadas a 5°C, el eje embrionario incrementa su tamaño, peso seco y número total de células, mientras que las semillas que permanecen a 25°C no muestran estos cambios. En muchos casos, las condiciones que se requieren para que la estratificación funcione se parecen a aquellas a las cuales la semilla está en condiciones naturales, donde las fluctuaciones diarias de temperatura, bajas por la noche y más elevadas de día, son muy efectivas en la rotura de la dormición en diferentes especies (Totterdell y Roberts, 1980).

Numerosas especies, frecuentes entre las rosáceas y las coníferas, han desarrollado la necesidad de permanecer cierto periodo a temperaturas bajas, aunque las necesidades de tiempo y temperatura son específicas para cada especie. En algunos casos las semillas requieren estratificación a temperaturas altas. Especies anuales del desierto de Sonora necesitan un periodo a 50°C para incrementar el porcentaje de germinación. Las temperaturas relativamente altas

pueden acelerar la eliminación de la dormición, probablemente por provocar el reblandecimiento de la cubierta seminal o la activación de ciertas enzimas que permiten la hidratación de la semilla, lo que finalmente trae consigo el desencadenamiento de la germinación (Bewley y Black, 1994).

La luz es otro agente que rompe la dormición. Hay semillas, como las de lechuga, que requieren una exposición breve a luz blanca para poder germinar, mientras que otras necesitan una iluminación intermitente (*Kalanchoe blossfeldiana*) o un fotoperiodo concreto (Bewley y Black, 1994)., y en algunas la luz inhibe la germinación. La luz no sólo afecta al porcentaje total de semillas germinadas sino también a la velocidad de la germinación. Por ejemplo, en las semillas del pasto *Agrostis* el porcentaje final de germinación está directamente relacionado con la intensidad de la luz; a altas intensidades se requiere más tiempo para obtener germinación máxima. Un posible mecanismo de acción de la luz fue propuesto por Toyomasu et al. (1993), según el cual la inducción de la germinación de semillas de lechuga por la luz se basa en la inactivación del ABA controlada por giberelinas.

Otro tratamiento por el cual las semillas pierden su dormición lentamente es el almacenamiento seco o “after ripening”, período que suele durar varios meses a temperatura ambiente desde que son cosechadas, y es un método comúnmente utilizado para la eliminación de la dormición y promover la germinación en muchas especies.

También hay una gran cantidad de agentes químicos que pueden romper la dormición y, aunque sólo unos pocos se encuentran en la semilla de forma natural, su estudio es interesante para comprender el mecanismo de rotura de la dormición. Entre estos compuestos químicos se encuentran anestésicos (relacionados con las membranas), inhibidores respiratorios (cianuro), aceptores de electrones (nitrito, nitrito, azul de metileno), etc.

La acción de las hormonas vegetales se tratará en el apartado siguiente.

## 2.5.2.- Mecanismos de eliminación de la dormición.

Al considerar los mecanismos implicados en la rotura de la dormición hay que tener en cuenta que, tanto en semillas con dormición del embrión como en semillas con dormición impuesta por la cubierta, es el embrión el que se ve afectado y, posiblemente, sólo el eje embrionario, cuyo crecimiento es la culminación del proceso de germinación. Se han propuesto varias hipótesis que tratan de explicar los cambios hormonales y metabólicos necesarios para que germine una semilla durmiente, aunque éstos puedan variar de unas especies a otras.

Hay muchas evidencias de que las hormonas vegetales están implicadas en la regulación de la dormición de semillas, y así, mientras que el ABA promueve la inducción y el mantenimiento de la misma, la aplicación exógena de GAs y etileno produce la eliminación de la dormición, estimulando la germinación de las semillas en algunas especies y sustituyendo los tratamientos que la eliminan (Hilhorst, 1995).

Una hipótesis bastante aceptada es la teoría hormonal de la dormición (Karsen y Lacka, 1986), que atribuye el control de este proceso a la acción conjunta de varias hormonas, inhibidoras como el ABA y promotoras como las giberelinas, citoquininas y etileno. De acuerdo con esta teoría, la dormición es mantenida por inhibidores como el ABA y finalizará sólo cuando el inhibidor desaparece o cuando los promotores lo superan. La relación ABA/GAs parece ser la más importante, como se ha demostrado usando mutantes con distintos grados de deficiencia en ambas hormonas (Léon-Kloosterziel et al., 1996).

En cuanto al posible mecanismo por el que estas hormonas actúan en el mantenimiento y/o eliminación de la dormición, se incluyen tanto síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, como diferentes aspectos del metabolismo respiratorio, tales como intercambio gaseoso, producción de ATP, la ruta de las pentosas fosfato o la ruta alternativa.

## 3.-GERMINACIÓN.

La germinación comprende los procesos que abarcan desde la imbibición de la semilla hasta que se produce la elongación del eje embrionario en su interior, apareciendo como signo más visible de la conclusión del proceso la perforación de las cubiertas por la radícula (Bewley y Black, 1994; Bove et al., 2001). La germinación, se puede definir como el conjunto de procesos metabólicos y morfogenéticos que tienen como resultado la transformación de un embrión en una plántula capaz de autoabastecerse y transformarse en una planta adulta, y depende de las mismas condiciones ambientales de las que depende el crecimiento vegetativo. El comienzo de la germinación está determinado por la combinación de múltiples sucesos metabólicos y celulares, que implican en algunas semillas la superación de la dormición, y que están regulados hormonalmente. Se ha descrito que las fitohormonas GAs y BRs promueven la germinación, mientras que el ABA la inhibe (Bove et al., 2001; Leubner-Metzger, 2001). A medida que la semilla toma agua del medio y se rehidrata, reanuda gradualmente su actividad metabólica, iniciándose la respiración y sintetizando nuevos mRNAs y proteínas (Figura 12; Bove et al., 2001). En el embrión comienza la síntesis de formas activas de GAs que inducen la expresión de numerosas enzimas, que intervienen en el crecimiento de la radícula y en la degradación de las cubiertas de las semillas, lo que facilita su emergencia (Gallardo et al., 2002; Leubner-Metzger, 2001; 2005; Wu y Bradford, 2003).

Baskin y Baskin (2001b) indicaron que la germinación es una de las fases más críticas en el desarrollo de cualquier especie y que cada una de éstas posee un rango específico de factores ambientales que son necesarios para que este proceso tenga éxito; entre éstos, los más importantes son temperatura, luz, pH y humedad del suelo.





**Figura I.2.-**Sucesos metabólicos desencadenados por la rehidratación de la semilla durante la germinación. Adaptado de Bove et al.,2001.

Independientemente del tiempo entre la madurez de la semilla y la reactivación del crecimiento, la germinación se puede caracterizar por su patrón trifásico. La fase I de imbibición, es un proceso físico cuya fuerza directriz está determinada por la diferencia de potencial hídrico entre la semilla y el sustrato que la rodea, la semilla reanuda la actividad metabólica. La activación de las distintas rutas metabólicas es dependiente de la rehidratación. Cuando el contenido de agua supera el 60% de agua, comienza la fase II de activación metabólica. Durante esta fase en la que predominan los procesos catabólicos, se activan las enzimas para la degradación y movilización de las reservas (almacenadas ya sea en el embrión, endospermo o perispermo) hacia el eje embrionario, donde el tejido quiescente se vuelve metabólicamente activo. La fase III de crecimiento, o germinación propiamente dicha, se inicia al producirse división y elongación celular (Bove et al., 2001).

La duración de cada una de estas fases depende de ciertas propiedades de las semillas, como su contenido en compuestos hidratables y la permeabilidad de las cubiertas al agua y al oxígeno. Estas fases también están afectadas por las

condiciones del medio, como el nivel de humedad, las características y composición del sustrato, la temperatura, etc. Otro aspecto interesante es la relación de estas fases con el metabolismo de la semilla. La primera fase se produce tanto en semillas vivas como muertas y, por tanto, es independiente de la actividad metabólica de la semilla. Sin embargo, en las semillas viables, su metabolismo se activa por la hidratación. La segunda fase constituye un período de metabolismo activo previo a la germinación en las semillas viables o de inicio en las semillas muertas. La tercera fase se produce sólo en las semillas que germinan y obviamente se asocia a una fuerte actividad metabólica que comprende el inicio del crecimiento de la plántula y la movilización de las reservas. Por tanto, los factores externos que activan el metabolismo, como la temperatura, tienen un efecto estimulante en la última fase.

En las dos primeras fases de la germinación los procesos son reversibles, a partir de la fase de crecimiento se entra en una situación fisiológica irreversible. La semilla que haya superado la fase de germinación tendrá que pasar a la fase de crecimiento y originar una plántula, o por el contrario morir.

La germinación está afectada por factores internos (intrínsecos) propios de la semilla, como la madurez y viabilidad y factores externos (extrínsecos) que dependen del ambiente como agua, temperatura y gases.

Decimos que una semilla está madura cuando ha alcanzado su completo desarrollo tanto desde el punto de vista morfológico como fisiológico.

La madurez morfológica se consigue cuando las distintas estructuras de la semilla han completado su desarrollo, dándose por finalizada cuando el embrión ha alcanzado su máximo desarrollo. La madurez se suele alcanzar sobre la misma planta, sin embargo, existen algunas especies que diseminan sus semillas antes de que se alcance, como ocurre en las semillas de *Ginkgo biloba* o de muchas orquídeas, que presentan embriones muy rudimentarios, apenas diferenciados.

Aunque la semilla sea morfológicamente madura, muchas de ellas pueden seguir siendo incapaces de germinar porque necesitan experimentar aún una serie de

transformaciones fisiológicas. Lo normal es que requieran la pérdida de sustancias inhibitoras de la germinación o la acumulación de sustancias promotoras. En general, necesitan reajustes en el equilibrio hormonal de la semilla y/o en la sensibilidad de sus tejidos para las distintas sustancias activas.

La viabilidad de las semillas es el período de tiempo durante el cual las semillas conservan su capacidad para germinar. Es un período variable y depende del tipo de semilla y de las condiciones de almacenamiento. Las semillas pierden su viabilidad por causas muy diversas. Podríamos pensar que mueren porque agotan sus reservas nutritivas, pero no es así, sino que conservan la mayor parte de las mismas cuando ya han perdido su capacidad germinativa.

Una semilla será más longeva cuanto menos activo sea su metabolismo. Esto, a su vez, origina una serie de productos tóxicos que, al acumularse en las semillas, producen a la larga efectos letales para el embrión. Para evitar la acumulación de esas sustancias bastará disminuir aún más su metabolismo, con lo cual habremos incrementado la longevidad de la semilla. Ralentizar el metabolismo puede conseguirse bajando la temperatura y/o deshidratando la semilla. Las bajas temperaturas dan lugar a un metabolismo mucho más lento, por lo que las semillas conservadas en esas condiciones viven más tiempo que las conservadas a temperatura ambiente. La deshidratación, también alarga la vida de las semillas, más que si se conservan con su humedad normal. Pero la desecación tiene unos límites; por debajo del 2%-5% de humedad se ve afectada la constitución de la semilla, siendo perjudicial para la misma.

Entre los factores externos que inciden en el proceso de germinación está la humedad, la temperatura y los gases. Para que se inicie la germinación la absorción de agua es el primer paso, y el más importante. La entrada de agua en el interior de la semilla se debe exclusivamente a una diferencia de potencial hídrico entre la semilla y el medio que le rodea. En condiciones normales, este potencial hídrico es menor en las semillas secas que en el medio exterior. Aunque el agua es necesaria para la rehidratación de las semillas, un exceso de la misma actuaría desfavorablemente para la germinación, pues dificultaría la

llegada de oxígeno al embrión. La temperatura es un factor decisivo en el proceso de la germinación, ya que influye sobre las enzimas que regulan la velocidad de las reacciones bioquímicas que ocurren en la semilla después de la rehidratación. La actividad de cada enzima tiene lugar entre un máximo y un mínimo de temperatura, existiendo un óptimo intermedio. Del mismo modo, en el proceso de germinación pueden establecerse unos límites similares. Por ello, las semillas sólo germinan dentro de un cierto margen de temperaturas. Si la temperatura es muy alta o muy baja, la germinación no tiene lugar aunque las demás condiciones sean favorables (Pérez y Martínez, 1994). La mayor parte de las semillas requieren para su germinación un medio suficientemente aireado que permita una adecuada disponibilidad de  $O_2$  y  $CO_2$ . De esta forma el embrión obtiene la energía imprescindible para mantener sus actividades metabólicas (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

Los procesos metabólicos más estudiados relacionados con la germinación han sido la respiración y la movilización de las sustancias de reserva.

Tres rutas respiratorias, glucólisis, ciclo de las pentosas fosfato y ciclo de Krebs, son funcionales en las semillas imbibidas. Estas tres rutas producirán una serie de compuestos intermediarios del metabolismo vegetal, así como considerables cantidades de energía y poder reductor. El objetivo principal del proceso respiratorio es la formación de ATP y pirimidín nucleótidos, necesarios para la intensa actividad metabólica que tiene lugar durante la germinación. La semilla seca muestra una escasa actividad respiratoria, aumentando el consumo de  $O_2$ , después de iniciada la imbibición. A partir de este momento, el proceso respiratorio de las semillas puede dividirse en cuatro fases (Bewley y Black, 1994):

Fase I: Se caracteriza por un rápido incremento en la respiración, que generalmente se produce antes de transcurridas 12h desde el inicio de la imbibición. El aumento en la actividad respiratoria es proporcional al incremento de la hidratación de los tejidos de la semilla. El principal sustrato utilizado en esta fase es, posiblemente, la sacarosa.

Fase II: La actividad respiratoria se estabiliza entre las 12 y 24h desde el inicio de la imbibición. Probablemente las cubiertas seminales, que todavía permanecen intactas, limitan la entrada de O<sub>2</sub>. La eliminación de la testa puede acortar o anular esta fase.

Fase III: Se produce un segundo incremento en la actividad respiratoria, que se asocia a la mayor disponibilidad de O<sub>2</sub>, como consecuencia de la ruptura de la testa producida por la emergencia de la radícula. Otro factor que contribuye a ese aumento es la actividad de las mitocondrias, recientemente sintetizadas en las células del eje embrionario.

Fase IV: En esta última fase tiene lugar una acusada disminución de la respiración, que coincide con la desintegración de los cotiledones, después de que han exportado las reservas almacenadas.

Las semillas contienen cantidades relativamente importantes de reservas alimenticias, que permitirán el crecimiento y el desarrollo de la plántula hasta que ésta sea capaz de alimentarse por sí misma. Estas reservas se encuentran en su mayor parte, formando cuerpos intracelulares que contienen lípidos, proteínas, carbohidratos y compuestos inorgánicos (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

El hidrato de carbono de reserva más extendido en las semillas es el almidón, que se encuentra formando los gránulos de almidón, los cuales pueden adoptar formas características en cada especie (esféricas, poligonales...). En la hidrólisis del almidón, sus componentes, la amilosa y la amilopectina, son hidrolizados por la  $\alpha$ - y  $\beta$ -amilasas para dar glucosa. Los lípidos de reserva predominantes en la semilla son los triglicéridos. En la movilización de los lípidos participan tres tipos de estructuras, como son los cuerpos lipídicos (en los que se produce la degradación de los triglicéridos por parte de las lipasas para producir ácidos grasos y glicerol), los glioxisomas (en los que los ácidos grasos se oxidan hasta succinato) y mitocondrias (donde se produce la conversión de succinato hasta oxalacetato, el cual dará lugar a sacarosa en el citoplasma). Finalmente, la hidrólisis de las proteínas de reserva hasta péptidos y aminoácidos, está

catalizada por proteasas; estos productos resultantes pueden ser empleados para la síntesis de nuevas proteínas o para proporcionar energía mediante la oxidación de su esqueleto carbonado en el citoplasma (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

El endospermo, además de su función como almacén de sustancias de reserva, participa en el control de la germinación a través de la secreción de enzimas relacionadas con procesos de pérdida de rigidez de la pared celular, eliminando la resistencia mecánica de la capa del endospermo que dificulta la emergencia radicular (revisado en Bewley, 1997).

#### **4.- Ácido abscísico.**

El ácido abscísico (ABA) es un sesquiterpeno derivado del ácido mevalónico, con actividad hormonal y que se encuentra en todas las plantas superiores y en todos los tejidos vegetales. Como todas las sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, regula procesos importantes del desarrollo de las plantas como la síntesis de proteínas y lípidos de reserva, la tolerancia a la desecación de la semilla, la adquisición de la dormición, el paso del estadio embrionario al germinativo y del vegetativo al reproductivo; es además responsable del cierre de estomas y media las respuestas fisiológicas frente a diversos estímulos abióticos, como la sequía, el frío o la salinidad, y bióticos como patógenos (Busk y Pages, 1998; Finkelstein et al., 2002). La percepción de esta hormona parece producirse tanto extracelularmente como en el citoplasma celular, existiendo procesos como la represión de la inducción de las  $\alpha$ -amilasas por GA, que sólo ocurre cuando el ABA es extracelularmente percibido (Allan et al., 1994; Anderson et al., 1994; Gilroy y Jones, 1994; Schwartz et al., 1997).

Además, el ABA influye en diversos aspectos del desarrollo vegetal interaccionando con otras fitohormonas como auxinas, citoquininas, giberelinas y etileno (Beaudoin et al., 2000). Para entender cómo el ABA regula estos procesos es muy importante conocer la regulación de su metabolismo así como

los mecanismos por los cuales una variación en su concentración se traduce en una respuesta fisiológica.

#### **4.1. Efectos fisiológicos del ABA.**

El ABA participa en la regulación de muchos aspectos del desarrollo de la planta tales como la embriogénesis, la maduración, la dormición y la germinación de las semillas, principal tema de estudio de esta memoria y al que se dedicarán los siguientes apartados. Además, esta hormona ejerce un papel muy importante en el control de las respuestas frente a estreses ambientales, tanto bióticos (ataque de patógenos y heridas provocadas por insectos) como abióticos (sequía, estreses osmóticos y tolerancia a bajas temperaturas) (revisado en Finkelstein et al., 2002). Ante este tipo de condiciones puede desarrollar una doble función, por un lado, inhibiendo el crecimiento en presencia de estreses (asociado a un incremento en el nivel de ABA), y por otro, promoviendo el desarrollo en ausencia de estreses (asociado a bajos niveles de ABA endógenos). De este modo, el ABA podría funcionar de una u otra manera en función de las condiciones ambientales y de los factores bióticos y abióticos (Cheng et al., 2000).

#### **4.2. El ABA en la embriogénesis.**

El contenido de ABA de las semillas es muy bajo al inicio de la embriogénesis, alcanza un máximo nivel entorno al punto medio del desarrollo y, a continuación, cae poco a poco hasta niveles mínimos en la semilla madura. Durante el desarrollo embrionario, cesa la división celular, las células empiezan a crecer y a acumular sustancias de reserva, y este cambio coincide con un incremento en el contenido de ABA en la semilla. Existen evidencias de que el ABA está involucrado en el cese del ciclo celular a través de la inducción de un inhibidor de kinasas dependiente de ciclinas, el ICK1 (Wang et al., 1998), y en la

inducción de la expresión (o síntesis) de proteínas de reserva (Finkelstein et al., 2002).

En muchas especies se producen dos picos en la acumulación de ABA durante la formación de la semilla. El primer pico es de origen materno (Fig. 1.3), se produce al inicio de la fase de desarrollo de la semilla y es importante para prevenir la germinación precoz (Karssen et al., 1983; Raz et al., 2001), como se comprueba en el mutante *vp1* de maíz deficiente en la síntesis de ABA, que es vivíparo (Robichaud et al., 1980). El segundo pico de acumulación de ABA tiene origen embrionario y es esencial para la inducción de la dormición y la inhibición de la germinación (Karssen et al., 1983). En esta etapa de la embriogénesis, el embrión pierde hasta un 80% de su contenido en agua y se hace tolerante a la desecación, en parte gracias a la síntesis de las llamadas proteínas LEA (*late embryogenesis abundant*).

Las proteínas LEA (Rock y Quatrano, 1995; Delseny et al., 2001) están altamente conservadas en una gran variedad de especies vegetales y tienen la función de proteger a las células (membranas y proteínas) frente a los daños que puede producir la brusca deshidratación que sufren las semillas en las últimas fases de su maduración (Dure et al., 1989).

Existen varios tipos de proteínas LEA, y entre ellas podemos destacar las dehidrinas (DHN), también conocidas como proteínas RAB (*Responsive to ABA*) o LEA II. Estas proteínas, además de en semillas en formación, también se inducen en semillas maduras y plantas enteras en respuesta a diferentes tipos de estrés, como por ejemplo las proteínas RAB21 o RAB16A-C de arroz (Mundy y Chua, 1988; Yamaguchi-Shinozaki et al., 1989) o la proteína RAB18 de *Arabidopsis* (Gosti et al., 1995). En *Arabidopsis* se han clonado numerosas dehidrinas (Gilmour et al., 1991; Welin et al., 1994) que, según los elementos conservados que contengan, se pueden clasificar en dehidrinas tipo K, SK o YSK.

Los compuestos de reserva se acumulan durante las fases tardías de la embriogénesis. Como los niveles de ABA son todavía altos, la hormona podría afectar al transporte de azúcares y aminoácidos, a la síntesis de materiales de reserva, o a ambos procesos.



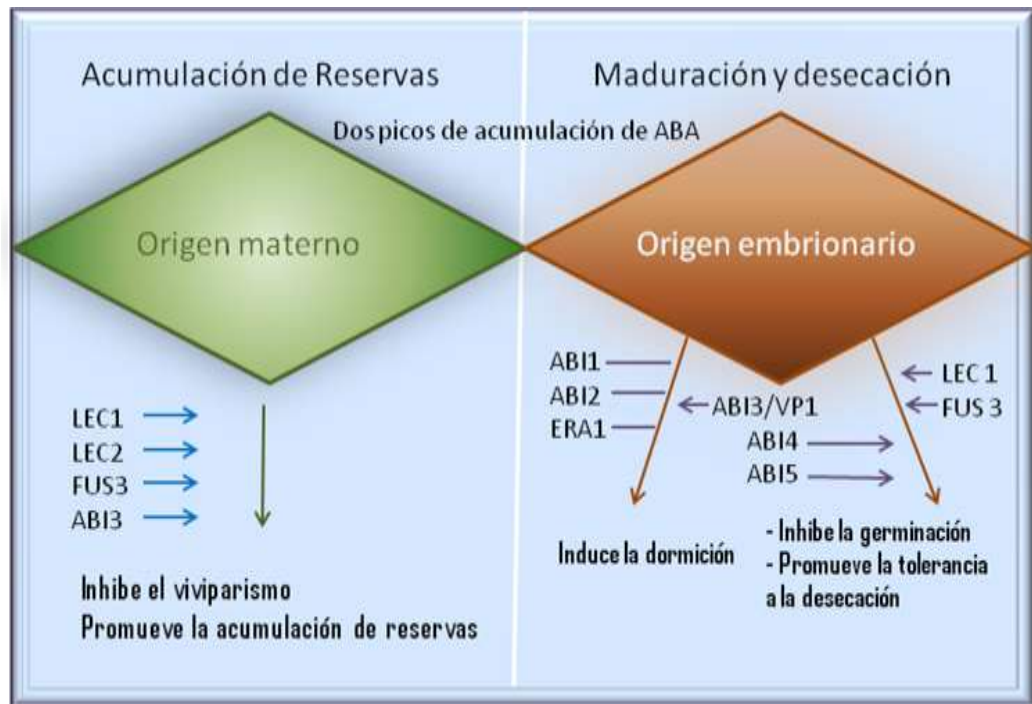
Los estudios en mutantes afectados tanto en la síntesis como en la respuesta a ABA, demostraron que éste no altera el transporte de azúcares, pero parece afectar a la cantidad y composición de las proteínas de reserva en embriones cultivados de muchas especies, y así, algunos mutantes deficientes o insensibles al ABA tienen reducida la acumulación de dichas proteínas. Sin embargo, la síntesis de proteínas de reserva está reducida también en otras semillas mutantes que mantienen altos los niveles de ABA y la respuesta a la hormona, lo que indica que el ABA sólo es una de las distintas señales que controlan la expresión de los genes de proteínas de reserva durante la embriogénesis.

El ABA no sólo regula la acumulación de proteínas de reserva durante la embriogénesis, también puede mantener el embrión maduro en un estado quiescente mientras las condiciones ambientales no sean óptimas para la germinación.

Mediante análisis genéticos se ha demostrado que existen factores de transcripción importantes para la expresión génica específica de la semilla, como ABI3/VP1, ABI4, ABI5, LEC2 y FUS3 (Fig. 1.3) (McCarty et al., 1991; Giraudat et al., 1992; Lotan et al., 1998; Luerksen et al., 1998; López-Molina y Chua, 2000; Roo et al., 2001; Stone et al., 2001). Algunos de ellos regulan la respuesta a ABA (ABI3/VP1, ABI4 y ABI5) y otros regulan principalmente la transición de la embriogénesis a la germinación (LEC1, LEC2, FUS3), aunque esta distinción no es clara, porque ABI3/VP1 también reprime la germinación (Holdsworth et al., 2001). Se han descrito interacciones genéticas entre los mutantes *abi3/vp1*, *abi4* y *abi5*, lo que sugiere que estos 3 factores de transcripción pueden controlar la expresión génica específica de semilla o inducible por ABA mediante la formación de un complejo transcripcional (Finkelstein y Lynch, 2000).

### **4.3.- El ABA en la dormición.**

Hay considerables evidencias de que el Ácido Abscísico (ABA) es un importante regulador positivo de la inducción y mantenimiento de la dormición en las semillas (Kucera et al., 2005, Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006 ).



**Figura 1.3.-** Esquema de las vías de señalización de ABA en el desarrollo de las semillas (Adaptado de Finkelstein et al., 2002).

Las evidencias indican el importante papel del ABA en el desarrollo de la dormición primaria, ya que las semillas de variedades mutantes de *Arabidopsis* deficientes o insensibles al ABA presentan una dormición reducida o no la presentan (Koornneef et al., 1989; Laby et al., 2000; Xiong et al., 2001c). Además, la aplicación a las semillas de fluridona (inhibidor de la síntesis de ABA), que produce una fuerte reducción de los niveles endógenos de la hormona, evita el desarrollo de dormición en distintas especies (Le Page-Degivry y Garello, 1992). También el ABA parece ser responsable de la inducción de la dormición secundaria, ya que embriones aislados o ejes embrionarios de *Chenopodium album*, *Taxus* y manzana pueden convertirse en durmientes mediante la aplicación exógena de ABA (Karszen, 1968; Le Page-Degivry, 1973a y b; Durand et al., 1975). Sin embargo, en otros casos como lechuga, cuyos contenidos en ABA son elevados, esta hormona sólo está involucrada en la inducción de la

dormición secundaria de una manera indirecta, ya que va a inhibir la germinación en la fase en que las semillas son sensibles a factores externos, siendo en este sentido la acción del ABA comparable a otras condiciones inhibitorias de la germinación como pueden ser el estrés osmótico, oscuridad o temperaturas supraóptimas (Berrie y Robertson 1976; Bewley, 1980; Karssen, 1982a).

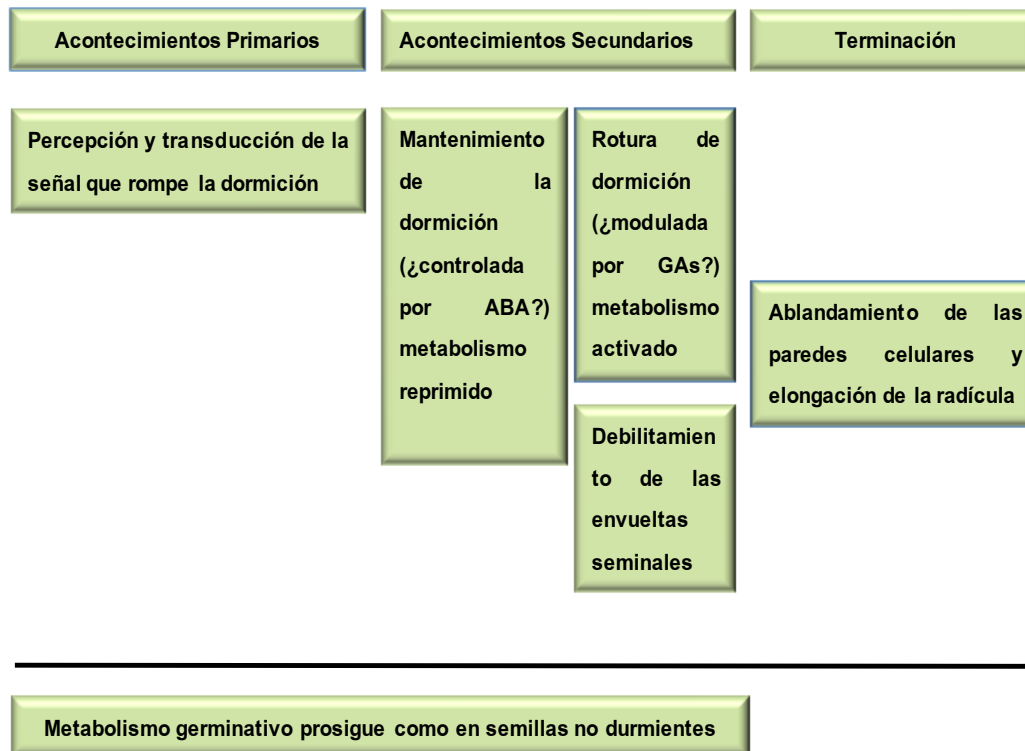
La regulación de la dormición por ABA también implica la inducción de ciertos factores transcripcionales que participan en su control (Fig. I.3), como ABI3/VP1 de *Arabidopsis*, que es un factor de transcripción que induce dormición, mientras que las proteínas ABI1, ABI2 y ERA1 de *Arabidopsis* actúan como reguladores negativos de la dormición (revisado por Finkelstein et al., 2002). Aunque el viviparismo y la dormición son procesos completamente opuestos que afectan al mismo órgano y cuyo resultado será que el embrión germine o no germine, los factores que regulan estos dos procesos son diferentes incluso en la misma especie.

Algunas semillas pueden perder su dormición mientras se encuentran en estado de deshidratación (semilla seca) cuando su actividad metabólica es muy baja. Sin embargo, las semillas durmientes imbibidas presentan una actividad metabólica muy elevada, y en este estado es cuando pueden percibir señales externas (luz, frío, tratamientos químicos y hormonales) que pueden romper la dormición. Los primeros acontecimientos en este proceso (Fig I.4) son la percepción del estímulo por el embrión y la inmediata transducción de la señal que conduce a los acontecimientos secundarios y que pueden implicar cambios metabólicos y hormonales que transformarían la semilla durmiente en no durmiente.

#### **4.4.- El ABA en la germinación.**

La germinación comienza con la toma de agua por la semilla (imbibición), que sólo tendrá lugar cuando las condiciones ambientales sean favorables y se elimine dormición, y termina con la emergencia del eje embrionario en dicotiledóneas o de la radícula en monocotiledóneas y gimnospermas.

# INTRODUCCIÓN



**Figura 1.4.-** Principales acontecimientos asociados con la ruptura de la dormición en semillas Adaptado de Bewley, 1997.

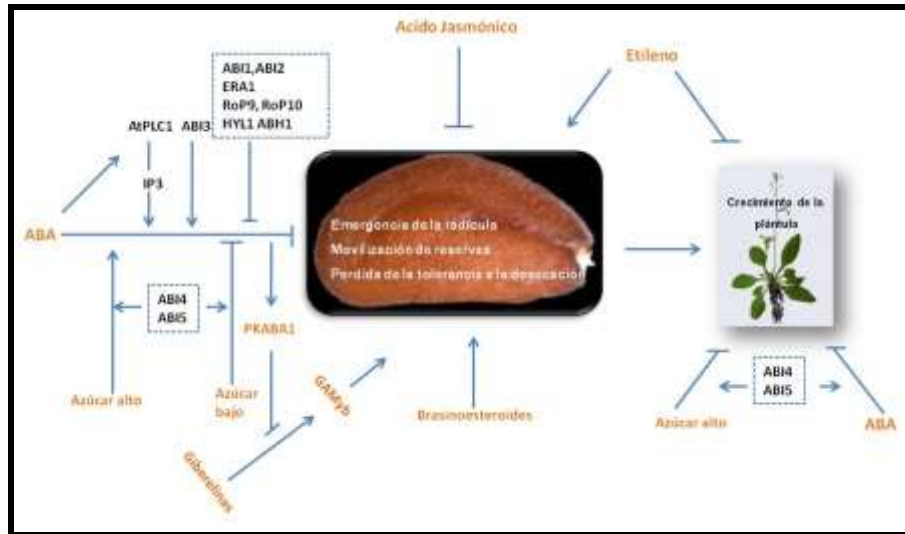
Mientras que el ABA mantiene la dormición, las giberelinas son promotoras de la germinación, al inducir la síntesis de  $\alpha$ -amilasa y de otras enzimas encargadas de movilizar las reservas nutritivas (Jacobsen y Beach, 1985). Según la teoría generalmente aceptada, el balance GAs/ABA es el mecanismo que regula la dormición primaria y germinación de las semillas. Cuando éste es favorable a las GAs y la semilla se expone a unos valores óptimos de ciertas condiciones como el potencial hídrico del suelo, la disponibilidad de oxígeno, o una temperatura adecuada, y se inicia la germinación. En algunas especies, otros estimulantes, como el  $\text{NO}_3^-$  y la percepción por el fitocromo de luz roja, pueden colaborar al comienzo de la germinación.

Hay evidencias que sugieren que el ABA afecta a ciertos procesos relacionados con la membrana (Van Stevenick y Van Stevenick, 1983), inhibiendo la toma de agua durante el crecimiento del embrión por alteración del intercambio iónico  $\text{H}^+/\text{K}^+$  (Schwartz et al., 1994) y afectando a la elongación de la radícula (Aldasoro

et al., 1981). Además, la aplicación exógena de ABA inhibe la germinación de las semillas, impidiendo la síntesis de RNAs y proteínas específicas de la germinación (Skriver et al., 1991). Por otra parte, el ABA induce la síntesis de nuevos mRNAs relacionados con la inhibición de la germinación (Rodríguez et al., 1985; Gómez et al., 1988, Colorado et al., 1991) y con las respuestas a condiciones desfavorables (Colorado et al., 1994, 1995). Todas estas evidencias demuestran la implicación del ABA en la regulación de la expresión génica en semillas y en el bloqueo de la germinación.

En *Arabidopsis* se han descrito dos puntos de control del proceso germinativo de las semillas. El primero se produce en la emergencia radicular y, posteriormente, el crecimiento de la plántula se producirá o no según la disponibilidad de agua en el medio, lo que representa otro punto de control. Si las condiciones no son favorables, el crecimiento queda detenido. El significado biológico de este segundo punto de control es aumentar la supervivencia, porque estas semillas germinadas con el crecimiento detenido presentan una mayor resistencia a la desecación que las plántulas que continúan el proceso. La proteína ABI5 es necesaria para que se produzca este bloqueo de la germinación, siendo el ABA un regulador de su acumulación, estabilidad y actividad (López-Molina et al., 2001) (Fig 1.5).

En la germinación, los efectos del ABA son antagonizados por las giberelinas, el etileno y los brasinoesteroides, mientras que el ácido jasmónico actúa sinérgicamente. Mediante estudios genéticos se han aislado mutaciones que eran capaces de revertir a mutantes deficientes en la vía de las giberelinas que no permitían la germinación, y que resultaron ser mutaciones que causaban deficiencia de ABA (Koornneef et al., 1982). Estudios más recientes han demostrado la interacción de ABA con etileno (Beaudoin et al., 2000) y con brasinoesteroides (Steber y McCourt, 2001) (Fig. 1.5).



**Figura 1.5.-** Esquema de las vías de señalización que interactúan en la germinación mediada por ABA. En naranja se representan los reguladores y en negro algunas de las proteínas señalizadoras que participan en el proceso. Las flechas indican un efecto activador y las barras un efecto inhibitor. (Adaptado de Finkelstein et al., 2002).

#### 4.5. El ABA en respuesta a estreses abióticos.

Los productos proteicos de los genes que se inducen por estrés pueden clasificarse en dos grupos: los que protegen directamente del estrés ambiental y los que intervienen en la regulación de la expresión génica y en la transducción de la señal en respuesta al estrés. Los primeros incluyen proteínas que funcionan protegiendo a las células contra la deshidratación, como por ejemplo las enzimas que sintetizan moléculas osmoprotectoras (osmolitos), proteínas LEA, chaperoninas, proteínas anticongelantes y enzimas detoxificantes. El segundo grupo de productos génicos incluye factores de transcripción, proteín-kinasas, proteín-fosfatasa y enzimas involucradas en el metabolismo de fosfoinosítidos.

El ABA también desempeña un papel crucial en la regulación de la respuesta vegetal al estrés abiótico. A nivel celular puede promover la tolerancia a algunos estreses abióticos como sequía, salinidad y frío (Finkelstein et al., 2002; Nambara y Marion-Poll, 2005).

La síntesis de ABA aumenta en respuesta a sequía, dando lugar al cierre de los estomas y por lo tanto, disminuyendo la intensidad de la transpiración. Los elevados niveles de ABA provocan un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, lo que da lugar a la activación de canales iónicos de membrana (Hamilton et al., 2000; Kohler y Blatt, 2002). Esto conduce a una despolarización de las células guarda, salida de potasio ( $\text{K}^+$ ), pérdida de turgencia y volumen de las células guarda, y finalmente, el cierre de los estomas (Blatt et al., 2000). Adicionalmente, el ABA también genera un aumento en la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y NO, que actúan como intermediarios promoviendo el cierre estomático (Pei et al., 2000; Zhang et al., 2001; García-Mata y Lamattina, 2007; Ribeiro et al., 2009). Por lo que se refiere a los mecanismos moleculares que gobiernan esta respuesta, se ha observado que en periodos de sequía se activan elementos de respuesta a ABA (ABREs) por medio de FTs como los factores de unión a secuencias DRE, y finalmente proteínas b-ZIP conducirán a la expresión de efectores de tolerancia al estrés generado por sequía como las dehidrinas (Beck et al., 2007). En tejidos vegetativos y ante situaciones de bajo potencial hídrico, en la planta se produce un incremento en los niveles de ABA de hasta 40 veces.

Los mecanismos fisiológicos que gobiernan las respuestas de las plantas frente a estrés salino son muy semejantes a los que regulan las respuestas a sequía, sugiriendo, que ambos estreses deben ser percibidos por la planta como una menor presencia de agua (Jakab et al., 2005). Una alta concentración de sal en el sustrato provoca una disminución del potencial hídrico, lo que afecta a la disponibilidad de agua (Hasegawa et al., 2000). Además del choque hiperosmótico y del estrés oxidativo generado (Borsani et al., 2001), también se produce toxicidad y una elevada concentración salina en la solución externa de las células vegetales (Serrano et al., 1999; Rodríguez-Navarro, 2000). En respuesta a estreses osmóticos, muchas especies de plantas acumulan prolina (osmolito protector que secuestra radicales libres y que regula el potencial redox) debido a la activación de la biosíntesis de ABA y a la inactivación de su degradación durante el estrés (Hare et al., 1999).

Por lo que se refiere al estrés generado por frío, se sabe que el proceso de aclimatación a las bajas temperaturas suele ir acompañado de un periodo de crecimiento lento, y a menudo, de dormición. Se ha propuesto que la aclimatación y tolerancia a las bajas temperaturas podría estar mediado por un incremento en los niveles de ABA endógeno (Mohapatra et al., 1988). Hay varias evidencias que respaldan esta hipótesis. Por una parte, el aumento en los niveles de ABA endógeno es mayor en las especies más tolerantes al frío, y por otro lado, la aplicación de ABA exógeno aumenta la tolerancia al frío en planta adulta, en callos de patata y en cultivos celulares de alfalfa (Orr et al., 1985). En este sentido, el estímulo de las bajas temperaturas puede ser sustituido por ABA exógeno, dando lugar a un incremento en la tolerancia a la congelación en muchas especies de plantas (Chen et al., 1983; Palva, 1994). Además, mutantes *aba* y *abi* deficientes e insensibles a ABA, respectivamente no presentan aclimatación a las bajas temperaturas (Heino et al., 1990; Mäntylä et al., 1995). Esto sugiere que el ABA juega un papel muy importante en la aclimatación al frío y demuestra que la ruta de señalización del ABA es necesaria para la tolerancia a la congelación.

Sin embargo, en el medio natural en el que se desarrollan las plantas, los factores ambientales adversos nunca se suelen presentar aislados. Así, por ejemplo, el estrés osmótico causado por sequía en verano está generalmente acompañado de estrés por alta temperatura, y en muchas ocasiones, las bajas temperaturas suelen ir acompañadas de estrés osmótico ante la imposibilidad de tomar y transportar agua. Bajo condiciones de estreses simultáneos, los efectos negativos y las respuestas adaptativas podrían diferir de aquellas que se derivan de estreses aislados. Por lo tanto, es necesario comprender cómo las plantas responden a condiciones de estrés combinadas.

#### **4.6. El ABA en respuestas a estreses bióticos**

Las respuestas de defensa de la planta frente al ataque de microorganismos patógenos son el resultado de una serie de cambios coordinados a nivel celular, regulados por una intrincada red de señalización hormonal. En este punto, el



ABA emerge como un importante regulador de las respuestas frente a estreses bióticos, existiendo en ocasiones una correlación negativa entre los niveles de esta hormona y la resistencia al ataque de algunos patógenos, mientras que en otros casos regula positivamente la activación de este tipo de respuestas (revisado en Ton et al., 2009). Así, se sabe que algunas bacterias usan los estomas como vía de entrada al interior de la planta y en este punto, la regulación del cierre estomático por ABA representa una importante barrera pre-invasiva frente al ataque de algunos patógenos virulentos (Melotto et al., 2006).

Una vez que el invasor ha penetrado en el interior de la planta, el papel del ABA puede variar en función de muchos factores. Así, frente al ataque de algunos tipos de bacterias se observa una mayor deposición de callos en los mutantes insensibles a ABA *abi1-1* y *abi2-1*, lo que pone de manifiesto una regulación negativa del ABA en este tipo de respuesta (Torres-Zabala et al., 2007), aunque también se ha comprobado que esta fitohormona puede estimular la deposición de callosa como respuesta frente al ataque de patógenos como *Plectosphaerella cucumerina* y *Alternaria brassicicola* (Ton y Mauch-Mani, 2004).

### 5.- MECANISMO DE ACCIÓN DEL ABA. TRANSMISIÓN DE SEÑALES.

Las hormonas vegetales forman parte de vías de transducción de señales. Su acción estimula el crecimiento y desarrollo desencadenando la transcripción genética y otras actividades celulares.

Los organismos eucarióticos, y entre ellos las plantas, han desarrollado complejos patrones de expresión génica que varían a lo largo de su ciclo de vida y en respuesta a las señales de su entorno. El control transcripcional es el mecanismo más importante por el cual se regulan los niveles, momento y tejido en que un gen se expresa.

El mecanismo de acción de una hormona se define como la reacción primaria capaz de iniciar una serie de eventos moleculares que, en última instancia, conducen a un efecto fisiológico apreciable. Por tanto, la célula debe estar

programada para responder a las señales hormonales (mensajeros primarios) mediante mecanismos específicos.

### **5.1.- Mecanismo general de transmisión de señales.**

El mecanismo de acción hormonal tiene lugar mediante una conexión estímulo-respuesta, que puede dividirse en 3 fases, la percepción de la señal (mensajero primario) por la célula, la generación y transmisión de la señal (transducción) y finalmente la activación de un cambio bioquímico (respuesta).

El conjunto de estos tres procesos constituye la denominada cadena de percepción y transducción de la señal, que requiere el reconocimiento del mensajero primario por un receptor y la actuación de una serie de moléculas (segundos mensajeros) capaces de transmitir la señal que activará la respuesta. Ya se han identificado algunos de estos elementos que constituyen las rutas de transmisión de señales hormonales mediante aproximaciones genéticas y moleculares, y también se han caracterizado algunos de los genes que los codifican.

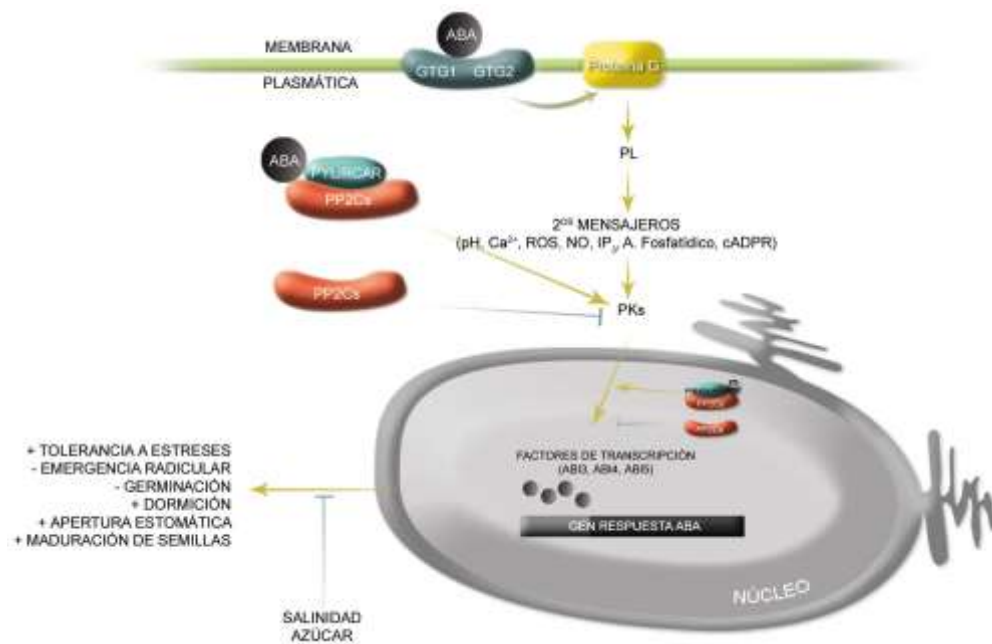
Esta serie de señalización es la vía que utilizan las plantas para responder a todos los estímulos, tanto externos (luz, temperatura, etc.) como internos (hormonas, péptidos, oligosacarinas, etc.), que modulan su desarrollo.

Las propiedades fundamentales de la cadena de transducción son: rapidez, sensibilidad y especificidad. Todas estas propiedades están, a su vez, controladas por la interacción de una red de elementos que actúan de forma positiva o negativa. Por tanto, los sistemas de transmisión de señales no deben ser contemplados como meras cadenas lineales de causa-efecto (revisado por Segura, 2000), sino que son la consecuencia de una compleja red de interacciones entre distintas rutas de señalización. Diversos estímulos provocan una activación asimétrica de estas redes señalizadoras complejas, y el balance final de interacciones entre las mismas es el que determina las respuestas específicas al estímulo inicial (Lorenzo y Solano, 2004).

Análisis bioquímicos, y genéticos, han mostrado que tras la unión del ABA al receptor comienza la cascada de transducción de la señal hormonal, en la que participan diversos componentes como proteínas G, fosfolipasas, segundos mensajeros ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{IP}_3$ ...), proteín-fosfatasa, proteín-kinasas y FTs (Finkelstein et al., 2002; Assmann, 2004). En la figura I.6 tomada de A. Fernández Tesis D, 2010 aparecen representados los componentes implicados en la ruta de señalización del ABA así como su localización intracelular.

Las proteínas G pertenecen a la familia de las GTPasas, diferenciándose dos tipos en plantas: triméricas y monoméricas. Dentro de la primeras, hay que destacar que la pérdida de función de la subunidad  $\alpha$  (GPA1) afecta a la ruta de señalización del ABA y de las auxinas (Ullah et al., 2001; Wang et al., 2001). Por lo que se refiere a las proteínas G monoméricas (denominadas proteínas Rop o ATRACs en Arabidopsis), se conocen 11 miembros y 4 grupos distintos; de ellas, ROP9 y ROP10 regulan negativamente la percepción del ABA durante la germinación y crecimiento de las plantas. En este mismo sentido, ROP2 regula negativamente los efectos del ABA en la semilla (Li et al., 2001).

En cuanto a los segundos mensajeros, se ha observado que tras un tratamiento exógeno con ABA se produce un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  y ácido fosfatídico en la célula. Además, otros segundos mensajeros como las especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico (NO) y fosfolípidos como el fosfatidilinositol 3-fosfato o el inositol-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ), están implicados en la regulación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fan et al., 2004; Israelsson et al., 2006). El pH es otro factor que podría actuar como segundo mensajero en la señalización del ABA. En concreto, se sabe que participa en el cierre estomático de las células guarda mediado por ABA a través de un descenso en los niveles de  $\text{K}^+$  citosólico, provocado por un incremento en la actividad del canal de salida de  $\text{K}^+$  (GORK) y una disminución en su entrada (Grabov y Blatt, 1998).



**Figura 1.6.-** Receptores e intermediarios de la señalización del ácido abscísico (ABA). El ABA se une a los receptores (GTG1/GTG2, PYR1/PYL-RCAR), poniendo en funcionamiento un intrincado mecanismo de señalización, en el que participan proteínas G, fosfolipasas (PL) y segundos mensajeros que interaccionan con proteín-kinasas (PKs) y proteín-fosfatasa de tipo 2C (PP2Cs), que a su vez modifican FTs, activando o reprimiendo genes de respuesta a ABA. Tomada de A Fernández Tesis D, 2010.

Después de la actuación de los segundos mensajeros, interviene una compleja red de reguladores positivos y negativos, principalmente proteín-kinasas y proteín-fosfatasa, así como un gran número de FTs. Estos dos últimos componentes moleculares se estudiarán en mayor profundidad en los apartados 5.2.1 y 5.2.2 de esta introducción, respectivamente.

Diferentes investigaciones han revelado la conexión entre las PP2Cs y las proteín-kinasas (PK), particularmente con SnRK2 y SnRK3. Así, se ha observado que SnRK2 participa en el cierre estomático regulando la expresión de genes inducidos por ABA y en las respuestas a estrés durante la germinación (Yoshida et al., 2002, 2006; Fujii et al., 2007). El descubrimiento de OST1 (*Open stomata 1*)/SRK2E/SnRK2.6, como un

elemento clave en la apertura estomática en respuesta a ABA y que interacciona directamente con la proteína ABI1, puso de manifiesto una compleja conexión entre PP2C y SnRK2. Para que se produzca la activación de esta kinasa, es necesaria la fosforilación de algunos residuos de Ser/Thr, sugiriendo que otras kinasas podrían actuar aguas arriba de SnRK2 en la señalización del ABA. Por otro lado, puesto que otros residuos aminoacídicos podrían ser autofosforilados (Belin et al., 2006), y que algunos estímulos gobernarían esta autofosforilación, se cree que las PP2Cs podrían regular la fosforilación de estos residuos (Figura I.5). En otros estudios donde se analizó el triple mutante *knockout* en las tres proteínas que integran la subclase III de la familia SnRK2 (SnRK2D, SnRK2E y SnRK2I), se pudo comprobar como la inactivación de estas proteína-kinasas conducía a fenotipos de insensibilidad a ABA y ausencia de actividad ABA-kinasa, lo que indica que las SnRK2s desarrollan un papel fundamental en las respuestas mediadas por ABA (Umezawa et al., 2009).

En los últimos años, se han encontrado evidencias de la implicación del ABA en el metabolismo del RNA. Alteraciones en los componentes que participan en el procesamiento del RNA, incluido el transporte desde el núcleo hasta el citoplasma y su degradación, dan lugar a cambios en las respuestas a ABA. Así, modificaciones en el complejo CBC (*Cap Binding Complex*) de unión al extremo 5' del RNA, dan lugar a fenotipos de hipersensibilidad a ABA (Hugouvieux et al., 2001; Papp et al., 2004). También se ha comprobado que el ABA modula la expresión de los genes más abundantes, y para ejercer los cambios en su expresión, podría requerir de una regulación muy exhaustiva del procesamiento del RNA (Nemhauser et al., 2006). Por lo tanto, defectos en el funcionamiento de la expresión génica o en la regulación post-transcripcional podrían alterar las respuestas a ABA.

### **5.2.- Fosforilación/desfosforilación de proteínas.**

Después de la actuación de los segundos mensajeros, interviene una compleja red de reguladores positivos y negativos, principalmente proteína-kinasas y fosfatasas, así como un gran número de factores de transcripción.

La fosforilación/desfosforilación de proteínas reguladoras y enzimas es el principal mecanismo de transmisión de señales hormonales y ambientales desde

el exterior al interior celular, por el que se regulan numerosos procesos del crecimiento, el metabolismo y la diferenciación, tanto en animales como en plantas (Huber et al., 1994; Trewavas y Malho, 1997). En plantas, esta fosforilación proteica ha sido implicada en respuestas a muchas señales, incluyendo luz, hormonas o ataques de patógenos, entre otras (Trewavas, 2002). En el caso de las hormonas vegetales, desempeña un papel fundamental en la percepción y transmisión de la señal del etileno (Chang et al., 1993; Ecker, 1995; Bleecker y Kende, 2000) y del ABA (Campalans et al., 1999; Iten et al., 1999). También se ha demostrado que es un mecanismo muy importante en la regulación de la dormición de semillas (Trewavas, 1988; Iten et al., 1999; Lu et al., 2002).

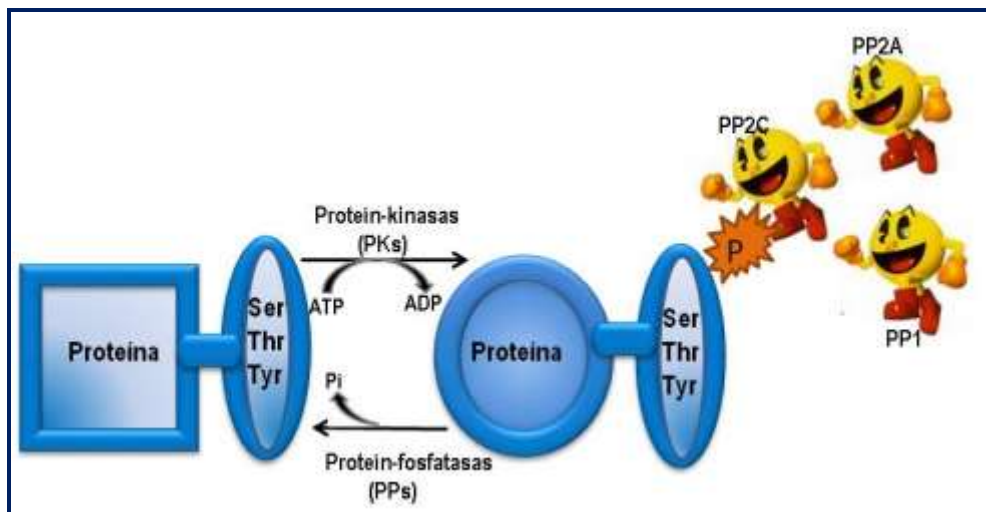
La fosforilación y desfosforilación de proteínas es un proceso reversible catalizado por proteín-kinasas (PKs) y proteín-fosfatasas (PPs) (Figura 1.6). Supone una modificación postraducciona común a muchas moléculas de proteínas y puede ser considerada como un mecanismo de activación/inactivación en la regulación de distintas actividades celulares. Esta transferencia o eliminación del grupo fosfato puede tener profundos efectos en la estructura y en las propiedades funcionales de las proteínas. Así, la fosforilación puede regular la actividad enzimática por provocar cambios alostéricos que bloquean directamente el acceso a los sitios activos (Johnson y O'Reilly, 1996), regular la interacción entre proteínas que funcionan en forma de complejo (Pawson, 1995), o ser necesarias para la especificidad de actuación en un sitio específico de la célula, por lo cual tiene una gran importancia en la regulación de muchos procesos celulares, entre ellos, procesos metabólicos, progresión del ciclo celular, transporte iónico, control del desarrollo y respuestas a estreses.

### **5.2.1.- Proteín-kinasas (PKs).**

Las proteín kinasas catalizan la transferencia del grupo  $\gamma$ -fosfato desde el ATP a determinados de modificación covalente ocurre normalmente en residuos de serina, treonina y tirosina, aunque también se ha descrito fosforilación de

## INTRODUCCIÓN

residuos de histidina, por lo que este tipo de proteínas se ha clasificado en serina/treonina proteína kinasas, tirosina proteína kinasas o histidina proteína kinasas, pero además, algunas de ellas poseen una actividad dual, tanto serina/treonina como tirosina proteína quinasa. aminoácidos de otras proteínas. Normalmente presentan una especificidad por el sustrato mayor que las proteínas fosfatasa. En eucariotas, este tipo



**Figura 1.7.-** Mecanismo básico de fosforilación/ desfosforilación de proteínas.

Las proteínas kinasas son una de las mayores familias proteicas en eucariotas, representando cerca del 2% de los genes (Stone y Walter, 1995). Tienen un dominio catalítico muy conservado de entre 250 y 300 nucleótidos, que adopta estructuras similares cuando están activas, sin embargo, las estructuras cristalinas de las kinasas inactivas han revelado una plasticidad destacable en el dominio quinasa, que permite la adopción de distintas conformaciones en respuesta a las interacciones con otras proteínas o dominios reguladores específicos (Huse y Kuriyan, 2002).

Las proteínas kinasas participan en la mayoría de las rutas de señalización, donde la regulación de su actividad catalítica es crucial para el desarrollo y mantenimiento de los organismos eucarióticos, adquiriendo especial importancia en las

respuestas de las plantas a estímulos externos, como los diferentes estreses bióticos y abióticos (Peck, 2003).

Se han descrito diversas PKs inducidas por ABA que parecen estar relacionadas con algunos de los procesos del desarrollo en los que participa esta hormona. Una de las primeras fue la denominada PKABA1, aislada de embriones de trigo (Anderberg y Walter-Simmons, 1992), regulada a nivel transcripcional por ABA, estrés térmico, hídrico y salino (Holappa y Walter-Simmons, 1995). Esta PK actúa fosforilando un factor de transcripción tipo bZIP (TaABF) de trigo (Johnson et al., 2002), dando lugar a la represión de genes inducidos por GAs y a la activación de genes inducidos por ABA (Gómez-Cadenas et al., 1999; 2001). Por otra parte, se han caracterizado otras proteínas similares a PKABA1 en diferentes especies como *Arabidopsis* (ASK1 y ASK2) (Park et al., 1993), soja (SPK-3 y SPK-4) (Yoon et al., 1997), trigo (TaPK3) (Holappa y Walker-Simmons, 1998) o tabaco (WAPK) (Lee et al., 1998), que tienen en común la presencia de una serie de aminoácidos ácidos en el extremo carboxi-terminal, lo que puede implicarlas en las respuestas al estrés ambiental.

Finalmente, se ha observado que algunos miembros de la familia de serina/treonina proteín kinasas como CDPK (proteín kinasas dependientes de calcio), MAPK (proteín kinasas dependientes de nitrógeno) y SnRK (proteín kinasas relacionadas con SNF1) interaccionan *in vitro* con varios factores de transcripción tipo bZIP, como AREB/ABF/ABI5 (Choi et al., 2005; Kobayashi et al., 2005; Furihata et al., 2006; Chae et al., 2007; Fujii et al., 2007). La fosforilación de estos factores de transcripción se correlaciona con su actividad y la mayoría de las proteín kinasas que participan en estos procesos son reguladores positivos tanto del ruta de señalización del ABA como de la dormición (Fujii et al., 2007).

### **5.2.2.- Proteín-fosfatasas (PPs).**

Las otras enzimas implicadas en la fosforilación reversible de proteínas son las proteín-fosfatasas, que catalizan la liberación del grupo fosfato en residuos de serina, treonina y tirosina y restauran la proteína a su estado original



desfosforilado (Figura 1.7). Constituyen un complejo grupo de proteínas, altamente conservadas a lo largo de la evolución, que muestran diversidad estructural y funcional, y regulan diversas funciones celulares relacionadas con el metabolismo y con el control del ciclo celular.

Según los residuos que desfosforilan, existen dos tipos principales, serina/treonina proteín-fosfatasas (PPs) y tirosina proteín-fosfatasas (PTPs), y otro tipo aún muy poco estudiado en plantas, histidina proteín-fosfatasas (PHP) (Figura 1.8). En algunos casos, se ha demostrado una especificidad dual serina/treonina y tirosina proteín-fosfatasas, al igual que ocurre con las proteín-kinasas.

Las serina/treonina proteín-fosfatasas (PPs) se clasifican según su especificidad por el sustrato, sus requerimientos iónicos y su sensibilidad a distintos inhibidores, en fosfatasas PP1, PP2A, PP2B y PP2C.

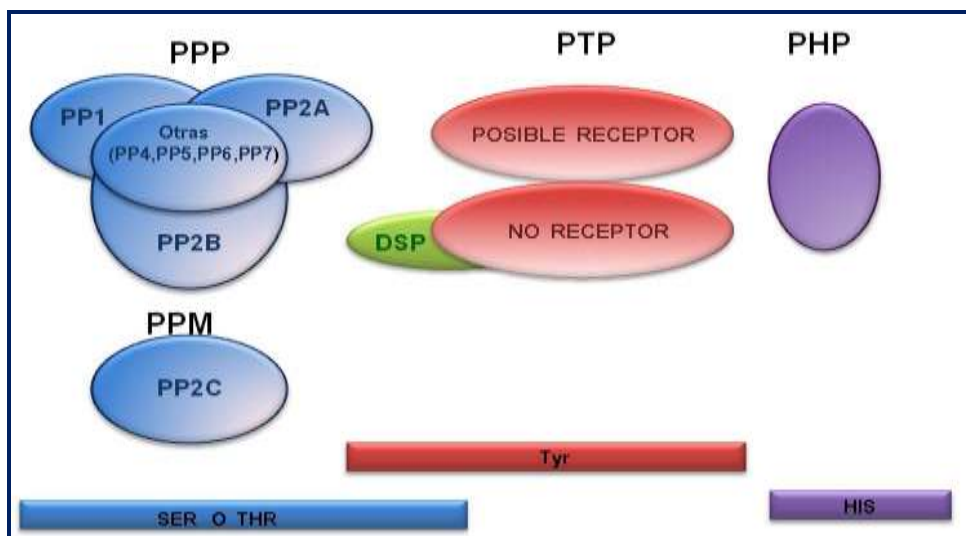
Por su relación filogenética, las PP1, PP2A y PP2B se agrupan bajo el nombre genérico de PPPs y comparten una región catalítica común de unos 280 aminoácidos, mientras que las PP2Cs y las PTPs presentan muy poca relación con ellas (Cohen, 1997). Las PPPs son las enzimas conocidas mejor conservadas a lo largo de la evolución (Orgad et al., 1990). Las PP1 y 2A se diferencian del resto de proteín-fosfatasas por su preferencia por la fosforilasa kinasa como sustrato y porque no necesitan de cationes divalentes para ser activas, lo que si ocurre con las PP2B y PP2C, que requieren  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  respectivamente (Guo y Roux, 1996). A su vez, las PP1 se van a diferenciar de las PP2A por su distinta sensibilidad a determinados inhibidores. Las PP1 son aproximadamente 10 veces más sensibles al ácido okadaico que las PP2A, la cantaridina inhibe sólo a las PP2A y las PP2C son insensibles a estos inhibidores, son dependientes de  $\text{Mg}^{2+}$  y se incluyen dentro de la familia PPM.

### **Proteín-fosfatasas de tipo 2C.**

Las proteín-fosfatasas proporcionan reversibilidad a los mecanismos de fosforregulación, gobernando de este modo un amplio espectro de procesos en

Arabidopsis como el transporte de auxinas y la señalización del ABA (Wang et al., 2007).

Mientras que en otros seres vivos el número de PP2Cs es muy reducido (en humanos únicamente se ha identificado 15, 10 en mosca, 8 en lombriz y 7 en levaduras), en Arabidopsis se han identificado 76 genes que codifican PP2Cs. Esta elevada diversidad podría poner de manifiesto una mayor variedad funcional de las PP2Cs en plantas que en otros organismos eucariotas.



**Figura 1.8.** Familias de proteín-fosfatasa. PPP, fosfoproteín-fosfatasa; PPM proteín-fosfatasa dependiente de metales iónicos; PTP tirosina proteín-fosfatasa; DSP fosfatasa dual específica; PHP histidina proteín-fosfatasa.

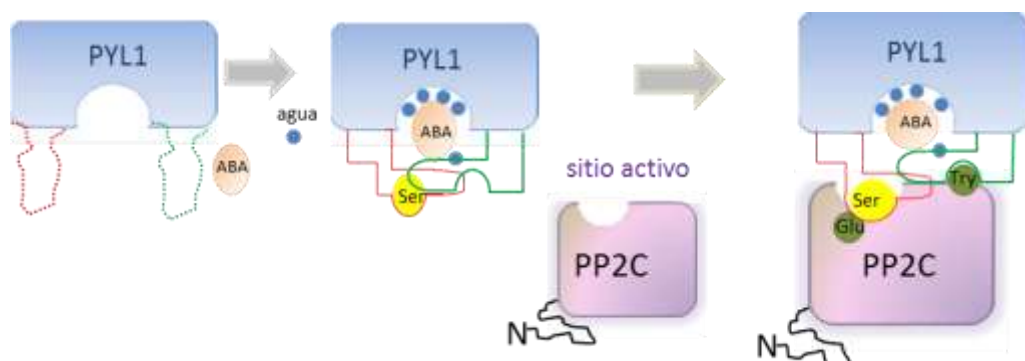
Una de las características más importantes de las PP2Cs es la presencia de 11 subdominios dentro del dominio catalítico. A pesar de que dicho dominio puede presentarse tanto en el extremo carboxi-terminal (C-terminal) como en el extremo amino-terminal (N-terminal), en la mayoría de las PP2Cs (44 de 76) se encuentra localizado en el extremo C-terminal de la proteína. Todo ello podría influir tanto en la regulación funcional de la proteína como en la especificidad por su sustrato.

En *Arabidopsis* las 76 PP2Cs se clasifican en 10 grupos (A-J). Dentro del grupo A se encuentran proteín-fosfatasas implicadas en la regulación de la ruta de señalización del ABA tales como ABI1, ABI2, HAB1 (*Homology to ABI1 and ABI2*) y AtPP2CA. Diversos análisis genéticos han revelado que todas ellas actúan como reguladores negativos de esta ruta de señalización, interaccionando e inhibiendo a las proteín-kinasas SnRK2s (Park et al., 2009). Así, mutantes de pérdida de función de estos genes muestran fenotipos similares de hipersensibilidad a ABA, mientras que mutaciones dominantes hipermórficas provocadas por sustituciones equivalentes de glicina (G) por aspártico (D) en el dominio catalítico de la proteína (ABI1<sup>G180D</sup>, ABI2<sup>G168D</sup>, HAB1<sup>G246D</sup>), provocan fenotipos de insensibilidad en diversas respuestas mediadas por ABA (Koornneef et al., 1984; Robert et al., 2006).

A pesar de conocerse la función represora de algunas de las PP2Cs en la ruta de señalización del ABA, se desconocía el mecanismo mediante el cual se llevaba a cabo esta regulación. Sin embargo, trabajos publicados revelan como se produce este control, describiendo la superfamilia de 14 proteínas denominadas PYR1/PYL-RCAR con capacidad de unión al ABA (Ma et al., 2009; Park et al., 2009). Tales proteínas actúan como receptores, interaccionando con las PP2Cs e inhibiendo su función represora de una manera dependiente ABA. Otros estudios adicionales realizados con esta familia de proteínas han logrado establecer un modelo de señalización de la ruta del ABA *in vitro*, en la que participarían los receptores (PYR1/PYL-RCAR), proteín-fosfatasas (PP2Cs), proteín-kinasas (SnRKs) y factores transcripcionales (ABFs/AREBs) (Fujii et al., 2009; Umezawa et al., 2009). En presencia de ABA Las proteínas PYR1/PYL-RCAR (PYR1 y PYL2) son capaces de revertir los efectos represores de las PP2Cs (ABI1, ABI2 y HAB1), inhibiendo la interacción entre las PP2Cs y las SnRKs (SnRK2.2, SnRK2.3 y SnRK2.6), de modo que las proteín-kinasas podrían fosforilar los factores transcripcionales ABFs induciendo la expresión de genes de respuesta a ABA tales como *RD29B* (*Responsive to Dehydration 29B*) (Fujii et al, 2009; Nakashima et al., 2009; Umezawa et al., 2009) (Figura 1.5). Sin embargo, mutaciones dominantes en el dominio catalítico de las PP2Cs, tales como *abi1-1* o *abi2-1*,

impiden que se produzca la unión entre las proteínas PYR1/PYL-RCAR y las PP2Cs, de modo que estas últimas desfosforilan constitutivamente a las SnRKs, generando fenotipos de insensibilidad a ABA.

También se ha establecido el modo de interacción entre ABA y estos receptores. El ABA provoca cambios conformacionales en las proteínas PYR1/PYL/RCAR, permitiendo su unión con las PP2Cs a través del centro activo de éstas, inhibiendo de este modo su actividad fosfatasa (Melcher et al., 2009; Miyazano et al., 2009; Yin et al., 2009). En presencia de la hormona, se produce el cierre de dos dominios  $\beta$ -loop altamente conservados presentes en las proteínas receptoras y que actúan como “puerta de entrada” para el ligando, provocando la formación de un punto de unión con las PP2Cs (*gate-latch interface*) (Melcher et al., 2009).



**Figura I.9.** Modelo esquemático de la interacción entre PYL/RCAR –ABA-PP2C. Modelo adaptado de Ken-Ichi.M., et al 2009.

### 5.3. Factores transcripcionales.

Del mismo modo que ocurre en otras rutas de señalización, las respuestas a ABA conducen a cambios en la expresión génica. Los elementos reguladores responsables de estos cambios han sido identificados a través de aproximaciones genéticas y bioquímicas, identificándose diferentes clases de factores *trans* implicados en la regulación transcripcional de la respuesta a ABA, entre los que se encuentran

proteínas bZIP (*Leucine Zipper Basic*), proteínas con dominio B3, AP2/EREBP, MYC/MYB y proteínas con homeodominio junto a una cremallera de leucina (HD-Zip) (Finkelstein et al., 2002). Las secuencias reguladoras más comunes que confieren especificidad de respuesta a ABA son los elementos de respuesta a ABA G-box (ABRE, *ABA-Responsive Element*) reconocidos por factores transcripcionales de la familia b-ZIP, secuencias ricas en GC presentes en elementos de respuesta a sequía (DRE, *Dehydration-Responsive Element*) y CEs (*Coupled Elements*) reconocidos por proteínas de la familia APETALA2 (AP2) o elementos RY/Sph a los que se unen proteínas con dominio B3. Además, muchos genes regulados por ABA contienen lugares de unión para FTs de la familia MYB y MYC. De igual forma, miembros específicos de las familias de proteínas HD-ZIP (*Homeodomain-leucine zipper*), NAC (*No apical meristem/Ataf/CupShaped cotyledons*), WRKY, bHLH (*Non MYC basic helix-loop-helix*) y dedos de Zn también participan en algunas respuestas a ABA.

Se han encontrado 81 genes que codifican FTs bZIP (aunque probablemente gran parte de ellos no estén implicados en la señalización del ABA), entre los que se encuentra *ABI5* (*ABA insensitive 5*) (Finkelstein y Lynch, 2000; Uno et al., 2000) relacionado con la regulación de la germinación, crecimiento vegetativo y respuestas a sequía mediadas por ABA. La familia B3 incluye los FTs *ABI3/VP1* (*ABA insensitive 3/Viviparous1*), implicados en la regulación de genes inducidos por ABA (como *RAB18*) y en las respuestas a ABA relacionadas con la maduración de semillas y crecimiento de la raíz (Nakamura et al., 2001), y finalmente, los FTs *FUS3* (*Fusca 3*) y *LEC2* (*Leafy cotyledon 2*) que participan también en el desarrollo de las semillas (revisado en Suzuki y McCarty, 2008). Dentro de la familia AP2/EREBP cabe destacar la proteína *ABI4* (*ABA insensitive 4*) necesaria para que se produzca la respuesta a ABA. El mutante *abi4* presenta insensibilidad a ABA y es resistente a concentraciones elevadas de azúcar y sal durante la germinación de semillas (Soderman et al., 2000). Se han encontrado dos proteínas pertenecientes a las familias MYB y MYC (*AtMYB2* y *AtMYC2*, respectivamente) implicadas en el control de las respuestas a estrés hídrico reguladas por ABA (Abe et al., 2003; Lorenzo et al., 2004). También se han identificado varios genes con dominio NAC como *ANAC019*, *ANAC055*, *ANAC072* y *ATAF1* inducidos por sequía, salinidad y ABA, y cuyos productos génicos se unen a

secuencias específicas de genes de respuesta a estreses como *ERD1* (Tran et al., 2004; Lu et al., 2007).

Los genes regulados por ABA presentan secuencias reguladoras para varios FTs y las respuestas a ABA generalmente dependen de la presencia de al menos una secuencia ABRE y CE. Además, algunas familias de FTs como los NAC son capaces de formar dímeros entre sí para llevar a cabo la regulación transcripcional de los genes de respuesta a ABA, mientras que otros miembros específicos de distintas familias como los bZIPs y factores con dominio B3, así como los factores bZIPs y DREBs, presentan interacciones sinérgicas o forman parte de un complejo transcripcional (Nakamura et al., 2001; Takasaki et al., 2010).



## **ANTECEDENTES Y OBJETIVOS**

## ANTECEDENTES Y OBJETIVOS



Existen numerosas evidencias de que el ácido abscísico (ABA) está implicado en el control de un amplio rango de procesos fisiológicos esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta, siendo una de sus principales funciones la regulación de los procesos de desarrollo, dormición y posterior germinación de las semillas (McCarty, 1995; Quatrano, 1983).

Los eventos de fosforilación/desfosforización de proteínas juegan un papel crucial en la señalización de esta hormona, implicando una compleja red de kinasas y fosfatasas. Las proteínas-fosfatasas de tipo 2C (PP2C) pertenecen al grupo de serina /treonina proteínas-fosfatasas que se han relacionado con las respuestas a estrés en hongos y animales, y en plantas, además, con la señalización del (ABA).

Durante los últimos años se han identificado diversos reguladores negativos de la ruta de señalización del ABA, entre los que destacan las PP2Cs, como ABI1, ABI2, PP2CA y HAB1 descritas en *Arabidopsis* (Gosti et al., 1999; Merlot et al., 2001; Sáez et al., 2004) y FsPP2C1 en *Fagus sylvatica* (González-García et al., 2003).

El análisis funcional mediante la sobreexpresión en *Arabidopsis* de la FsPP2C1 aislada de *Fagus sylvatica* (Lorenzo et al., 2001) ha demostrado la importancia de esta PP2C en la señalización del ABA en ambas especies y la conservación de esta ruta de señalización en dos especies vegetales tan alejadas evolutivamente (González-García et al., 2003).

En estudios previos sobre la FsPP2C1 de haya, se utilizaron las herramientas genéticas disponibles en *Arabidopsis*, obteniendo plantas transgénicas que sobreexpresan la región codificante de *FsPP2C1*, mediante las cuales se comprobó que las líneas que expresan el transgén, presentan semillas con una reducida dormición e insensibilidad al ABA en la germinación, similar a la de los mutantes *abi* (insensibles al ABA). Además, la sobreexpresión de *FsPP2C1* reprime la expresión de genes inducibles por ABA (González-García et al., 2003).

### OBJETIVOS

El objetivo principal será identificar y caracterizar proteínas que interactúen con PPs de tipo 2C (PP2C- IP) dado que existen muy pocos datos disponibles de posibles sustratos, activadores e inhibidores de este tipo de fosfatasa.

Para ello se seguirán los objetivos concretos que se detallan a continuación:

1° Análisis de las interacciones proteína-proteína. Para completar la caracterización molecular y bioquímica de FsPP2C1, se analizarán las interacciones directas de la proteína completa con posibles sustratos u otras proteínas reguladoras, mediante la técnica de doble híbrido en levadura. Del mismo modo, se comprobará su interacción “in planta” mediante complementación bimolecular fluorescente (BiFC).

2° Expresar los clones de las proteínas seleccionadas en *E. coli* como proteínas de fusión, para determinar su funcionalidad como sustratos o modificadores de la actividad de la proteína-fosfatasa FsPP2C1.

3° Estudios de expresión y localización subcelular de los clones seleccionados.

4° Análisis funcional del clon seleccionado en la regulación de la dormición, germinación y otras respuestas mediadas por ABA, mediante la obtención de plantas sobreexpresoras y de pérdida de función en *Arabidopsis*.

5° Caracterización fenotípica y molecular en las plantas de ganancia y pérdida de función en la dormición, germinación y respuestas a estrés.

La memoria que se expone a continuación, recoge el material, instrumentación y metodología empleados y los resultados obtenidos junto con la discusión de los mismos.



# **MATERIALES Y TÉCNICAS**



## 1.- MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO.

### 1.1.- Semillas.

En la realización de este trabajo se han utilizado semillas de los ecotipos Columbia y Enkheim de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, Ein2-5), que forman parte de la colección del Arabidopsis Information Service, que tiene su origen en las estirpes de *Arabidopsis thaliana* recolectadas por F. Laibach desde principios de siglo pasado y que era conocida como “la colección estándar de razas naturales de Laibach”. Dicha colección fue mantenida en el Instituto de Agronomía y Cultivos Vegetales de Gottigen (Alemania), donde fue progresivamente ampliada mediante donaciones de otros investigadores (Röbbelen, 1965). Su custodia y mantenimiento fueron realizados a partir de 1975 por A. R. Kranz en el Botanical Institute de la Universidad Johann Wolfgang Goethe de Frankfurt en Alemania (Kranz, 1976), estando actualmente depositada y distribuída por otros centros como el NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre) o el ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center). Además, hemos utilizado semillas mutantes insensibles al ABA como *abi1-1* y al etileno como *ein2-5* (que nos sirvieron como controles en los experimentos de germinación, sensibilidad al ABA y al etileno, respectivamente, y pérdida de humedad), semillas mutantes por inserción de T-DNA para el gen *PYL8/RCAR3* utilizadas en el análisis de pérdida de función, así como tres líneas transgénicas sobreexpresoras del gen *FsP2C1*. Obtenidas mediante la expresión constitutiva bajo el control del promotor 35S (*35S:F5P2C1*; González-García et al., 2003).

### 1.2.- Microorganismos.

En este trabajo se han utilizado los microorganismos *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*, cuyas cepas bacterianas y características más relevantes se detallan en la tabla M.1

**Tabla M.1.- Cepas de *Escherichia coli* y estirpe de *Agrobacterium tumefaciens*.**

Cepa	Referencia/origen	Uso
DH5α ( <i>E. coli</i> )	Hanahan 1983	Transformación de bacterias.
DB3 ( <i>E. coli</i> )	Invitrogen	Transformación de bacterias.
TOP 10 F' ( <i>E. coli</i> )	Invitrogen	Transformación de bacterias sistema Gateway.
C58C1 ( <i>A. tumefaciens</i> )	Deblaere et al., 1985	Transformación de plantas.

### 1.3.-Vectores empleados.

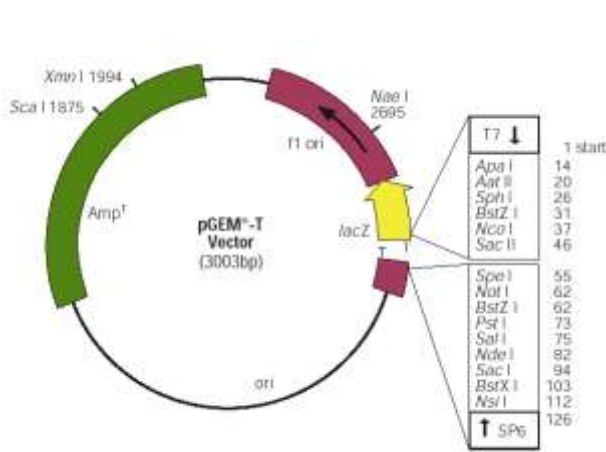
Los vectores utilizados en este trabajo, junto con sus características más destacables y el mapa correspondiente, se detallan en la tabla M.2 y en la figura M.1

**Tabla M.2.- Plásmidos.**

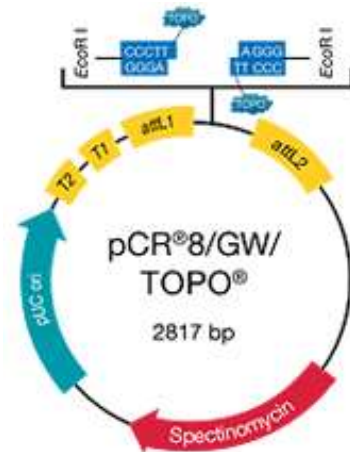
Plásmido	Resistencia	Utilización	Referencia
pGEM <sup>®</sup> -T	Amp <sup>r</sup>	Clonación directa de productos de PCR y posterior secuenciación.	Promega
pALEX2 a,b y c	Amp <sup>r</sup>	Expresión en <i>E. coli</i> .	Biomedal
pCR8 <sup>®</sup> /GW/TOPO	Spec <sup>r</sup>	Clonación directa de productos de PCR, plásmido de entrada sistema Gateway	Invitrogen <sup>™</sup>
pBIN 121	Kan <sup>r</sup>	Construcciones para la transformación de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	Bevan, 1984
pMDC43	Kan <sup>r</sup> , Hyg <sup>r</sup>	Complementación Bimolecular Fluorescente y transformación transitoria	Invitrogen <sup>™</sup>

# MATERIALES Y TÉCNICAS

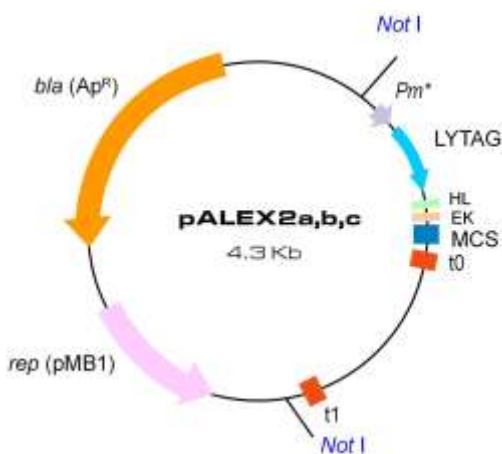
**A)** El vector pGEM-T, contiene un sitio de clonación específico para productos de PCR con una adenina libre en los extremos 3'.



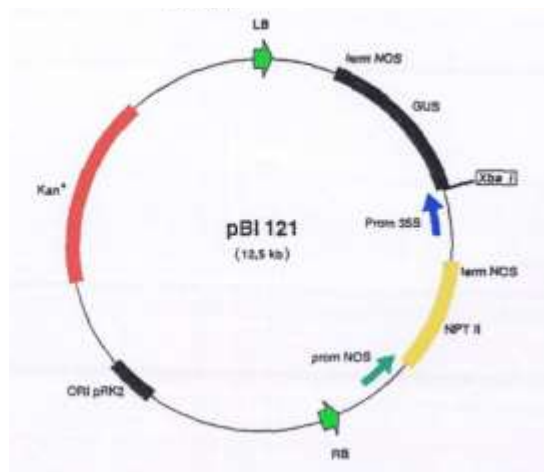
**B)** El vector de entrada (pCR8<sup>®</sup>/GW/TOPO), permite la clonación directa de productos de PCR.



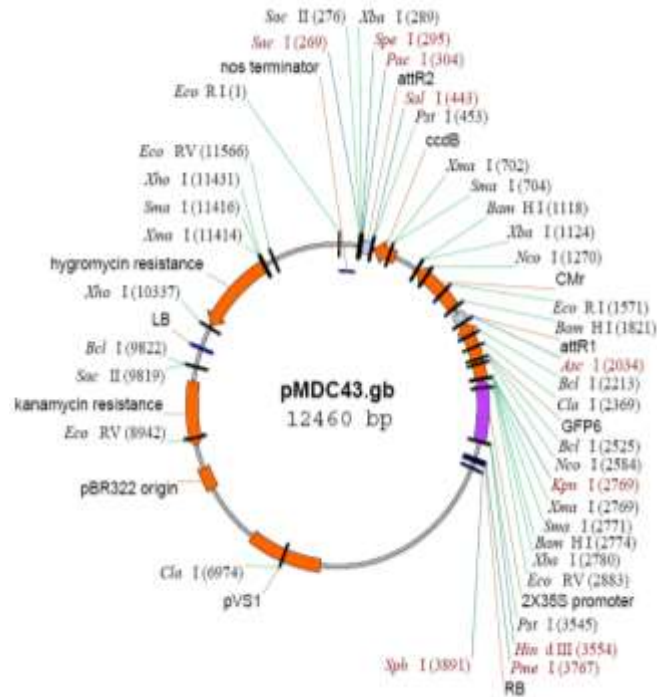
**C)** Para la expresión de proteínas en *E. coli* se emplearon los vectores pALEX2a,b,c que están diseñados para ser utilizado con el sistema CASCADE<sup>™</sup> para la expresión y purificación de proteínas, incorporan una hélice alfa polipeptídica cuya secuencia actúa como un elemento entre el espaciamiento del dominio de unión a colina y la proteína de interés.



**D)** Se han empleado plásmidos binarios como pBIN121, que aporta el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), contiene el gen *NPTII* que confiere resistencia a la kanamicina, fusionado al promotor y al terminador de la nopalina sintetasa (*pnos* y *nos*), incluido en el T-DNA (Bevan, 1984). Se utilizó para la obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, mediante transformación con *Agrobacterium*.



E) Por su parte, el vector pMDC43 aporta el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) con el “enhancer” duplicado (2x35S), el sitio de clonación múltiple y la secuencia de poliadenilación del CaMV, [CaMV poli (A)+], fusionado en fase y un terminador Nos (nopalina sintetasa). Se utilizó para la transformación transitoria y BiFC.



**Figura M.1** Mapa de los vectores de replicación en *E. coli* **A)** pGEM-T **B)** PCR8/GW/TOPO **C)** pALEX2a,b,c y de los vectores binarios **D)** pBIN121 y **(E)** pMDC43.

## 2.- CONDICIONES DE SIEMBRA, CULTIVO Y TRATAMIENTOS EMPLEADOS

### 2.1.-Esterilización y estratificación de las semillas.

Para la esterilización de semillas se siguieron los siguientes pasos:

- \* Depositar las semillas en tubos eppendorf de 1,5 ml.
- \* Añadir la solución de esterilización.
- \* Durante 5 min. se agitan en vórtex, culminado los 5 min. se desecha la solución.
- \* Realizar tres lavados consecutivos con 1 ml de agua estéril.
- \* Añadir aproximadamente 1 ml de agua estéril o agarosa al 0,15%.

#### Solución de esterilización

Lejía comercial (hipoclorito sódico) al 75% (v/v) y Tritón X-100 al 0.01%.



Puesto que las semillas de Arabidopsis presentan dormición, finalizada la esterilización se mantuvieron 3 días a 4°C en oscuridad, para favorecer la eliminación de la dormición, esta etapa es necesaria si se quiere sincronizar la germinación.

### **2.2.-Siembra de semillas.**

#### **2.2.1.-Cultivo in vitro**

Preparación de medio de crecimiento MS comercializado por Duchefa (Murashige y Skoog, 1962). Para 1 litro de medio:

- \* En un vaso de precipitados añadir aproximadamente 500 ml de agua Milli Q.
- \* Añadir 4,9 g de MS comercial (Duchefa).
- \* Colocar en agitación con barra magnética.
- \* Añadir 20 gr de glucosa.
- \* Ajustar el pH a 5,7 con KOH 2M.
- \* Adicionar 10 gr de agar bacteriológico (Pronadisa) y poner en agitación durante unos min.
- \* Retirar la barra magnética y completar hasta 1 litro con agua Milli Q.
- \* Autoclavar durante 1 hora a 120°C
- \* Atemperar a 50-55°C y plaquear en placas estériles bajo cabina de flujo laminar.

#### **Siembra**

Las semillas esterilizadas se sembraron con micropipeta, siempre haciendo uso de una campana de flujo laminar y en condiciones estériles. Las placas ya sembradas se sellaron con esparadrapo Micropore Scotch 3M, tras lo cual se mantuvieron en cabinas con temperatura constante de 25°C, bajo condiciones de fotoperiodo de día largo 16h (80-100  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ) de luz y 8 h de oscuridad durante 8-10 días. En este caso la luz fue suministrada por tubos fluorescentes de tipo GroLux 36W.

## 2.2.2.- Obtención de plántulas.

Las plántulas de *Arabidopsis thaliana*, destinadas a completar su ciclo biológico y producir semillas (Figura M.2) fueron transplantadas con aproximadamente 10 días de edad, en bandejas de plástico con 50 alveolos, cada uno de ellos de 5 x 5 cm con tierra (Sustrato Universal, EMUPA) y vermiculita (Termita®, Asfaltex) en una proporción 3:1. Las plántulas completaban su desarrollo en cámaras de luz o fitotrones, manteniéndose cubiertas con plástico durante los 4-5 primeros días, con el fin de mantener niveles altos de humedad. Las condiciones de crecimiento fueron de día largo, con 16 horas de luz ( $80-100 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ) y 8 horas de oscuridad, a una temperatura de 22 °C y una humedad relativa del 50-60%.

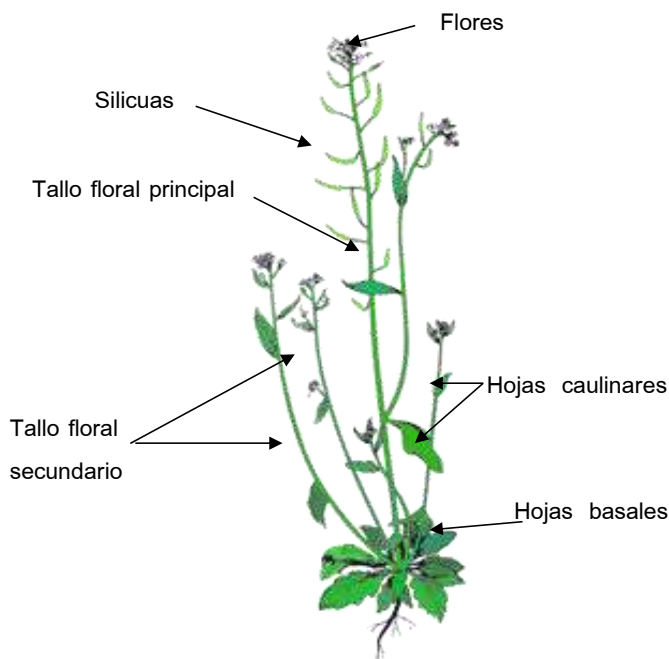


Figura M.2 Plántula de *Arabidopsis* y sus partes

## 2.3.- Tratamientos de germinación utilizados.

Para caracterizar fenotípicamente las líneas transgénicas y mutantes, se utilizaron diferentes concentraciones de hormonas y otros compuestos, añadiendo éstos a medio MS, las concentraciones se indican en la tabla M.3. Todas las concentraciones utilizadas en semillas de haya habían sido probadas y optimizadas previamente (González-García et al., 2003; Lorenzo et al., 2004).

**Tabla M.3. Tratamientos y concentraciones empleadas en la germinación de *Arabidopsis*.**

Tratamiento	Concentraciones	Uso
Ácido abscísico (ABA)	0,5; 0,7; 0,8; 1; 3; 5; 10 $\mu$ M	Grado de sensibilidad a distintas concentraciones de la hormona.
Paclobutrazol (PCB)	1, 10 $\mu$ M	Inhibidor de la síntesis de giberelinas.
Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC)	10 $\mu$ M	Precursor del etileno, Análisis de expresión génica.
Manitol	100, 125, 150mM	Agente osmótico que provoca estrés hídrico e inhibe la germinación a altas concentraciones.
Cloruro sódico (NaCl)	150, 200, 250mM	Compuesto que provoca estrés hídrico y salino e inhibe la germinación a altas concentraciones.

### 3.- MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS.

#### 3.1.- Crecimiento: condiciones y medios de cultivo.

Las cepas de *Escherichia coli* que se emplearon en las transformaciones fueron DH5 $\alpha$ , DB3 y TOP 10F'. Para la transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum* se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1.

Los cultivos líquidos de bacterias de *E. coli* y *A. tumefaciens* se crecieron normalmente a 37°C, y 28°C, respectivamente. Los cultivos en medio líquido se mantuvieron en agitación constante (225 rpm) en agitador orbital con temperatura controlada y las placas con medio sólido se incubaron toda la noche en estufa a 37°C y de dos a tres días a 28°C, respectivamente.

Los distintos tipos de medios empleados en la propagación de las cepas fueron los siguientes (Sambrook et al., 1989):

## **Medio Luria-Bertani (LB)**

Este medio es de uso más generalizado. Fue utilizado en todas las manipulaciones de *E. coli* y *A. tumefaciens*. Para un litro su composición es la siguiente:

Bacto-Triptona (1%)	10gr
Extracto de Levadura (0,5%)	5gr
NaCl (1%)	10gr
Agua MilliQ hasta	1l

El pH se ajustó a 7,2 con NaOH y a continuación se autoclavó durante 20 minutos a 121°C. Para cultivos en placas se añadieron 15g/l de bacto-agar (1,5%-2%).

## **Medio SOB**

Para preparar medio SOC necesitamos medio SOB, el cual contenía, por litro:

Bacto-Triptona (2%)	20gr
Extracto de Levadura (0,5%)	5gr
NaCl(0,5%)	5gr
KCl *	10ml
Agua MilliQ hasta	1l

\*Preparamos un stock de KCl (M=74,56) a 250mM(1,8g en 100ml) y se ajusta el pH a 7 con KOH.

## **Medio SOC** (Hanahan et al., 1991)

Se utiliza como medio para la transformación y la recuperación de células de las cepas *E. coli*. y *A. tumefaciens*.

Se trata del medio SOB suplementado con 20mM glucosa filtrada, se recomienda almacenar a 4°C, para evitar su contaminación.

Todos los medios fueron preparados con agua destilada y se esterizaron en autoclave 20 min a 120°C, manteniéndolos a 4°C hasta su utilización.

Cualquier cepa debe ser sometida a selección para mantener un vector plasmídico. La selección más habitual en organismos procariotas, es la selección de plásmidos con resistencia a algún antibiótico, mediante su adición al mismo cultivo. Dado que los antibióticos no pueden ser autoclavados es aconsejable preparar una disolución madre esterilizada por filtración, a partir de la cual se podrá añadir un pequeño volumen en el medio de cultivo ya autoclavado.

### **Ampicilina (Amp) (50 µg/ml).**

La solución madre se preparó a 25mg/ml en agua destilada. Una vez disuelta, se esterilizó por filtración con filtros de 0,45 µm (Allet), se alicuotó en tubos eppendorf estériles y se guardó a -20°C. La concentración final de ampicilina empleada en los medios de cultivos fue de 50 µg/ml.

### **Kanamicina (50 µg/ml)**

La solución stock se preparó a 25mg/ml en agua destilada. Una vez disuelta, se esterilizó por filtración con filtros de 0,45 µm (Allet), se alicuotó en tubos eppendorf estériles y se guardó a -20°C. La concentración final de rifampicina empleada en los medios de cultivos fue de 50 µg/ml

### **Rifampicina (50 µg/ml)**

Es un antibiótico muy tóxico y fotosensible. La solución de rifampicina se preparó en DMSO a una concentración stock de 50mg/ml. La rifampicina se utilizó en cultivos de *Agrobacterium* para evitar contaminaciones con *E. coli*. La concentración final utilizada fue (50 µg/ml)

### **Spectinomicina (50 µg/ml)**

La solución stock se preparó a 100mg/ml en agua destilada. Una vez disuelta, se esterilizó por filtración con filtros de 0,45 µm (Allet), se alicuotó en tubos eppendorf estériles y se guardó a -20°C. La concentración final de spectomicina empleada en los medios de cultivos fue de 50 µg/ml.

## 3.2.- Conservación de cepas.

Las cepas bacterianas de uso continuo se mantuvieron a corto plazo en placas de agar a 4°C (no más de un mes). La conservación a largo plazo se hizo por congelación rápida en nitrógeno líquido de cultivos crecidos hasta la fase logarítmica tardía, se añadió glicerol estéril hasta una concentración final del 30% (v/v), se agitó fuertemente en el vórtex para asegurar la adecuada conservación y los tubos eppendorf se almacenaron a una temperatura de -70°C, donde son viables durante varios años.

## 3.3.- Preparación de células competentes.

Para la preparación de células competentes DH5 $\alpha$  se ha modificado el protocolo utilizado por Inoue et al., (1990). Se inicia a partir de un glicerinado de la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ , mediante triple estría se sembró una placa con LB y se incubó a 37°C durante toda la noche.

- \* Inocular 5-7 colonias aisladas en 250 ml de medio SOC.
- \* Incubar en agitación a 37°C hasta alcanzar una  $A_{600} = 0.6$ .
- \* Colocar el cultivo en hielo durante 10 min.
- \* Centrifugar a 3000 rpm a 4°C durante 10 min.
- \* Descartar el sobrenadante y resuspender las células en 80 ml de tampón TB frío.
- \* Incubar en hielo durante 10 min.
- \* Centrifugar a 3.000 rpm a 4°C durante 10 min.
- \* Eliminar el sobrenadante, tratando de eliminar totalmente los restos del tampón.
- \* Resuspender en 20 ml de TB frío agitando manualmente. Por último, a la mezcla de células se le añadió DMSO a una concentración final del 7% y se separaron alícuotas de 100  $\mu$ l en tubos eppendorf estériles sobre hielo seco, guardándose a -80°C donde pueden conservarse al menos durante un año.

### **Tampón TB**

10 mM PIPES, 15 mM CaCl<sub>2</sub> y 250 mM KCl, se ajusta el pH a 6.7 con KOH.

Para la preparación de células competentes DB3:

- \* Inocular desde una placa 3ml de LB.
- \* Incubar en agitación a 37°C durante toda la noche.
- \* Incubar un cultivo de 100ml con 1ml de cultivo saturado.
- \* Seguir el crecimiento y recoger cuando  $A_{600} = 0,4$ .
- \* Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado con 50ml de la solución de lavado (50mM  $\text{CaCl}_2$ ).
- \* Centrifugar.
- \* Eliminar el sobrenadante y resuspender en un volumen final de 1ml (solución 10% glicerol y 50mM  $\text{CaCl}_2$ ).
- \* Alicuotear en 100 $\mu$ l.
- \* Conservar a -70°C

### 3.4.- Transformación de células competentes de *E. coli*.

Esta técnica permite la captación de DNA mediante la permeabilización de las membranas provocada por el choque térmico. Con esta técnica la eficacia de la transformación aumenta considerablemente, obteniendo entre  $10^9$ - $10^{10}$  transformantes/ $\mu$ g de DNA.

- \* Añadir 2 $\mu$ l de DNA de la ligación o plásmido a 50  $\mu$ l de células competentes en un eppendorf.
- \* Incubar en hielo durante 30 min.
- \* Realizar el choque térmico (heat-shock) 50 seg a 42°C seguido de 2 min en hielo.
- \* Añadir 950  $\mu$ l de medio SOC (previamente calentado a 37°C).
- \* Incubar a 37°C durante 1 hora en agitación horizontal a 225 rpm.
- \* Centrifugar a 13.000 rpm durante 45 seg
- \* Eliminar 750 $\mu$ l de medio y resuspender las células en los 250 $\mu$ l restantes.
- \* Plaquear en LB con el antibiótico correspondiente para la selección de colonias, en dos diluciones (50 y 200 $\mu$ l).

- \* Sellar con parafilm.
- \* Incubar las placas en estufa a 37°C toda la noche.
- \* Almacenar a 4°C para detener el crecimiento.

## 4.- ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

### 4.1.- Extracción y purificación de DNA genómico.

Para la extracción de DNA genómico de *Arabidopsis* se utilizó una adaptación del protocolo de McKinney et al., (1995). Con material de partida se emplearon 50 mg de tejido verde de plántulas de *Arabidopsis* crecidas en MS diez días, previamente congelado en nitrógeno líquido y siguiendo la siguiente secuencia:

- \* Disgregar el tejido utilizando bolas de vidrio de 425-600 microns (Sigma) empleando el homogenizador Silamat S5 (Ivoclar Vivadent, Madrid) durante 15 seg
- \* Homogeneizar la muestra con 500 µl de tampón CTAB 3x agitando en el Silamat S5 durante 5 seg
- \* Incubar a 65°C durante 30 min.
- \* Añadir 500 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y agitar en vórtex.
- \* Centrifugar 10 min a 14.000 rpm y recoger el sobrenadante.
- \* Añadir 500 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1).
- \* Centrifugar 10 min a 14.000 rpm y recoger el sobrenadante.
- \* Añadir 1 ml de etanol 100% y 150 µl de acetato de sodio 3M pH 5.2 para precipitar el DNA. Dejar precipitando al menos 1 hora a temperatura ambiente.
- \* Centrifugar 10 min a 14.000 rpm.
- \* Descartar el sobrenadante y secar el precipitado durante 3 min a temperatura ambiente.
- \* Disolver el precipitado en 50 µl de agua estéril. Resuspender a 4°C durante toda la noche.
- \* Tratar con 0.5 µl de RNasa pancreática libre de DNasa (10 µg/ml) para eliminar restos de RNA e incubar 30 min a 37°C.



\* Verificar la calidad y la cantidad de DNA por electroforesis.

\* Almacenar la muestra a -20°C.

### **Tampón CTAB 3x**

CTAB 3% (w/v), 100mM Tris-HCl pH 8.0, 20mM EDTA, NaCl 1.4M y  $\beta$ -mercaptoetanol 1% (v/v).

## **4.2.- Extracción y purificación de RNA total.**

Para la extracción de RNA de *Arabidopsis*, como material de partida se utilizó tejido verde previamente congelado en nitrógeno líquido y una cantidad aproximada de 100 mg.

Los pasos seguidos para la extracción de RNA fueron los siguientes:

\* Introducir en un tubo eppendorf de 1.5 ml una cantidad aproximada de 100 mg de material vegetal junto con 100  $\mu$ l de bolas de vidrio de 425-600 microns (Sigma).

\* Disgregar el tejido durante 20 seg en el SILAMAT S5, con la precaución que el material no se descongele.

Para mayor cantidad de muestras a procesar, utilizar el FASTPREP®-24.

\* Añadir 1 ml de Tri Reagent (Ambion).

\* Agitar durante 10 seg en el Silamat S5.

\* Incubar a temperatura ambiente durante 5 min. para permitir la disociación de los complejos nucleoproteicos.

\* Centrifugar 15 min a 13.400 rpm a una temperatura de 4°C.

\* Pasar el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo.

\* Añadir 200  $\mu$ l de cloroformo e incubar 10 min a temperatura ambiente.

\* Centrifugar 15 min a 13.400 rpm a una temperatura de 4°C.

- \* Pasar la fase acuosa (que contendrá el RNA) a un tubo eppendorf nuevo. La interfase y la fase orgánica contendrán DNA y proteínas.
- \* Añadir 500 µl de isopropanol (2-propanol) por cada ml de Tri Reagent.
- \* Mezclar 10 seg en vórtex.
- \* Incubar al menos 1 hora a temperatura ambiente.
- \* Centrifugar 8 min a 13.400 rpm a una temperatura de 4°C.
- \* Descartar el sobrenadante.
- \* Añadir 1 ml de etanol 75% conservado a -20°C. Agitar en vórtex para lavar el precipitado.
- \* Centrifugar 5 min a 9.000 rpm a una temperatura de 4°C.
- \* Descartar el sobrenadante.
- \* Centrifugar a máxima velocidad y eliminar pipeteando el etanol restante.
- \* Secar el precipitado 5 min a temperatura ambiente.
- \* Disolver el precipitado en 40 µl de agua tratada con DEPC (0.4 ml/l).
- \* Incubar 10 min a 60°C.
- \* Resuspender a 4°C durante toda la noche.
- \* Centrifugar durante 10 min a 13.400 rpm.
- \* Pasar el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo.
- \* Conservar la muestra a -70°C.

### **4.3.-Cuantificación de ácidos nucleicos.**

La concentración de ácidos nucleicos se realizó por espectrofotetría midiendo la densidad óptica en el espectrofotómetro (Shimadzu UV-1603) y en el nanodrop ND-1000 (Agilent Technologies) que proporciona la concentración de DNA o RNA (µg/ml) de la muestra. Los cálculos se llevarón a cabo considerando que una unidad de densidad óptica (D.O.)  $A_{260}$  equivale a 50µg/ml de DNA y a 40 µg/ml de RNA. Para determinar la pureza de la muestra, se midió la D.O. a 235 nm y 280 nm con el fin de calcular la concentración de azúcares y proteínas, respectivamente.

### 4.4.- Extracción y purificación de DNA plasmídico.

El aislamiento rápido y a pequeña escala de DNA plasmídico a partir de *E. coli* se realizó con el “Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega), con el que se consiguen muestras de gran calidad. La técnica se basa en la descrita por Birnboim y Doly (1979) o de lisis alcalina y retención del DNA plasmídico en una resina de cloruro de guanidina. Para la extracción se procedió a los siguientes pasos:

- \* Partiendo de un cultivo inoculado (apartado 3.1, M y T), centrifugar a 3000 rpm durante 15 min para precipitar las células.
- \* Descartar el sobrenadante
- \* Añadir 250µl de “Cell Resuspension solution” y transferir a tubos eppendorf de 1.5 ml.
- \* Añadir 250 µl de “Cell Lysis Solution”. Invertir los tubos 4 veces (nunca vórtex) e incubar aproximadamente 1- 5 min.
- \* Añadir 10 µl de “Alkaline Proteasa Solution” y mezclar invirtiendo el tubo. Incubar 5 min a temperatura ambiente.
- \* Añadir 350 µl de “Wizard Plus SV Neutralization Solution” y mezclar invirtiendo inmediatamente.,
- \* Centrifugar a 14.000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente.
- \* Transferir la cantidad que tenemos a una columna de decantación.
- \* Centrifugar 1 min.
- \* Añadir 750 µl de “Column Wash Solution”, previamente diluido con etanol al 95%.
- \* Centrifugar a la máxima velocidad 1 min, eliminar el líquido decantado.
- \* Repetir el proceso de lavado con 250 µl de la solución.
- \* Centrifugar a velocidad máxima 1 min, si quedase algo de líquido en la columna centrifugar 1 min más.
- \* Transferir la columna a un tubo nuevo.
- \* Eluir añadiendo a la columna 100 µl de “Nucleasa Free Water” e incubar 1 min.

\* Almacenar a -20°C.

Para la extracción y purificación a mayor escala y plásmidos de bajo número de copia se utilizó el Kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN). Las células crecidas en agitación se dispensan en tubos de centrifuga.

\* Centrifugar a 3000 rpm durante 15 min. Precipitar las células y descartar el sobrenadante.

\* Resuspender el pellet en 250µl de "Resuspension solution" y transferir a tubos eppendorf de 1.5 ml.

\* Añadir 250 µl de "Lysis Solution". Invertir los tubos 4 veces e incubar aproximadamente 1- 5 min.

\* Añadir 350 µl de "Neutralization Solution" y mezclar invirtiendo inmediatamente.

\* Centrifugar a 13.000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente.

\* Transferir la cantidad obtenida a una columna de decantación.

\* Centrifugar de 30 a 60 seg

\* Lavar las columnas añadiendo 500 µl del tampón "PB", descartar el líquido por centrifugación entre 30 y 60 seg

\* Lavar las columnas añadiendo 750 µl del tampón "PE", centrifugar 60 seg

\* Descartar el sobrenadante y centrifugar 1 min, para eliminar totalmente el tampón de lavado.

\* Transferir la columna a un tubo nuevo.

\* Eluir añadiendo a la columna 50 µl de "Elution buffer" e incubar 1 min.

\* Almacenar a -20°C.

Nota: para plásmidos de bajo número de copia se utiliza doble cantidad de los tampones: Resuspension solution, Lysis solution, Neutralization Solution.

#### **4.5.- Tratamiento y modificación del DNA.**

##### **4.5.1.- Digestión del DNA con enzimas de restricción.**

La digestión con enzimas de restricción de un plásmido nos permitirá tanto la liberación del inserto o fragmento de DNA clonado en dicho plásmido, así como

su posterior clonación dirigida en otros vectores ya sean de expresión o bien, de transcripción *in vitro*, etc.

Una unidad de enzima es la cantidad necesaria de para digerir 1 µg de DNA durante 1 hora a 37°C, en el tampón apropiado para cada enzima (Sambrook et al., 1989).

De forma general, se ha digerido con 2-3 U de enzima por µg de DNA en un volumen final de reacción de 20 µl. Las enzimas empleadas (Roche) hidrolizan las moléculas del DNA en secuencias nucleotídicas específicas y los tampones apropiados para cada reacción se muestran en la tabla M.4.

**Tabla M.4. Enzimas de restricción utilizadas con los correspondientes tampones.**

Enzimas	A	B	L	M	H
<i>Acc</i> I	100	0-10	10-25.	0-10	0-10
<i>Apa</i> I	100	10-25.	50-75	50-75	0-10
<i>Bam</i> HI	100	100	75-100	100	25-50
<i>Nco</i> I	50-75	50-75	50-75	50-75	100
<i>Nde</i> I	25-50	75-100	10-25.	50-75	100
<i>Not</i> I	10-25.	50-75	0-10	25-50	100
<i>Pst</i> I	25-50	25-50	10-25.	25-50	100
<i>Sac</i> I	100	0-10	100	50-75	0-10
<i>Sma</i> I	100	0-10	0-10	0-10	0-10
<i>Spe</i> I	75-100	75-100	75-100	100	100
<i>Sph</i> I	50-75	75-100	25-50	100	75-100
<i>Xba</i> I	100	75-100	75-100	75-100	100
<i>Xho</i> I	25-50	75-100	10-25.	25-50	100

#### 4.5.2.- Ligación: T4 DNA ligasa.

La construcción de moléculas recombinantes obtenidas por inserción de fragmentos de DNA en vectores plasmídicos apropiados, se realizó utilizando la DNA ligasa del fago T4 (Roche), enzima que cataliza la formación de enlaces

fosfodiéster entre moléculas que presentan extremos tanto cohesivos como romos. La cantidad de inserto y de vector que se requieren para la reacción se calcula según la ecuación (Sambrook, 1989):

### **Ligación de extremos cohesivos.**

$[\text{ng inserto}/\text{Kb inserto}] = 3x [\text{ng plásmido} / \text{Kb plásmido}]$

### **Ligación de extremos romos.**

$[\text{ng inserto}/\text{Kb inserto}] = 5x [\text{ng plásmido} / \text{Kb plásmido}]$

A la cantidad de inserto y vector estimados se añade el volumen necesario de tampón T4 DNA ligasa 10X y de 0,1-0,5 U de enzima T4 DNA ligasa por  $\mu\text{l}$  de reacción. La reacción de ligación normalmente se realizó con 200ng de DNA en un volumen final de 10  $\mu\text{l}$ . Las reacciones se mantuvieron a 14-16°C o/n. Con el producto de la ligación se transformó *E. coli*, y para la selección de colonias portadoras de plásmidos recombinantes se plaqueó en medio suplementado con antibióticos.

### **4.5.3.- Ligación: tecnología GATEWAY.**

La tecnología GATEWAY es un método universal de clonación que se aprovecha de los sitios específicos de recombinación attL1 y attL2 y attR1 y attR2 proporcionando una rápida y eficaz ligación entre vectores plasmidicos diferentes.

Para la clonación de productos de PCR en el vector pCR8<sup>®</sup>/GW/TOPO (Invitrogen) el proceso de ligación no requiere la presencia de DNA ligasa y puede llevarse a cabo en 5 min con una elevada eficiencia. Esto es gracias a la actividad de la DNA topoisomerasa I que tiene conjugada el vector en el extremo 3' OH (Shuman, 1994).

### **Clonación del producto de PCR en el vector de entrada.**

\*Amplificar el fragmento de DNA por PCR (utilizar Expand High Fidelity PCR System).

\*Comprobar en un gel el tamaño e integridad del producto (si en el gel aparece más de un producto, aislar bandas y purificar el producto de interés para evitar clonar un producto no deseado).

- \* Añadir 4µl del producto PCR en un tubo eppendorf de 1,5 ml.
- \* Añadir 1 µl de "Salt solution" (NaCl 1,2M; MgCl<sub>2</sub> 0,06M).
- \* Incluir 0,7 µl del vector (pCR8<sup>®</sup>/GW/TOPO).
- \* Mezclar todos los componentes de la reacción incubar 15 min a temperatura ambiente.
- \* Mantener en hielo y proceder a la transformación de células competentes *E. coli*, cepa DB3(Apartado 3.4).
- \* El clon puede insertarse en ambas orientaciones (puesto que hay adeninas en ambos extremos). Seleccionar la orientación correcta mediante análisis de restricción.

### **Transferencia del gen de interés desde el vector de entrada pCR8<sup>®</sup>/GW/TOPO al de destino.**

- \* Añadir 1-7 µl del vector de entrada (50-100ng) con nuestro gen de interés en un tubo.
- \* Añadir 1 µl del vector destino (50-100ng).
- \* Poner en hielo la LR Clonasa Mix II durante 2 min. y mezclar en vórtex.
- \* Añadir 2 µl de LR Clonasa Mix II a cada reacción y mezclar bien.
- \* Incubar la reacción a 25°C durante 3-4 horas.
- \* Añadir 1 µl de proteinasa K para terminar la reacción.
- \* Mezclar en vórtex brevemente.
- \* Incubar las muestras a 37°C durante 10 min.
- \* Transformar células competentes de *E. coli*, cepa DH5α a partir de la reacción con la LR Clonasa Mix.

#### **4.5.4.- Enzimas modificadoras.**

Otros experimentos de modificación de las moléculas de DNA se realizaron utilizando diversas enzimas que copian la cadena de DNA (polimerasas) y que se detallan a continuación:

Transcriptasas inversas como AMV (Roche) y SuperScript™ II (derivada de M-MLV RT, Gibco BRL), necesarias para la síntesis de la primera cadena de cDNA a partir del RNA. La transcripción inversa se realizó a partir de 1 µg de RNA obtenido de plántulas, utilizando el “1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis kit for RT-PCR (AMV)” (Roche), a partir del iniciador oligo-p(dT)<sub>15</sub>, o bien con iniciadores específicos en lugares concretos de la secuencia.

\* Preparar la siguiente mezcla para llevar a cabo la reacción (calcular el número de reacciones considerando una más).

<u>Reactivos</u>	<u>x Muestra</u>	
Tampón 10x	2 µl	
(Tris-HCl 100µM, KCl 500µM pH 8,3)		
25mM MgCl <sub>2</sub>	4 µl	
dNTPs(10mM)	2 µl	
Oligo- p(dT) <sub>15</sub>	2 µl	
Inhibidor de RNAasa	1 µl	
AMV Transcriptasa reversa	0,8 µl	
Agua estéril	7,2 µl	En un Eppendorf
RNA (muestra)	1 µl	

\* La muestra de RNA con agua estéril se desnaturaliza previamente a 65°C durante 15 min y se mantiene en hielo 5 min.

\* Añadir a cada muestra 11,8 µl del mix.

\* Incubar con la enzima AMV durante 10 min a 25 °C.

\* Poner en hielo hasta que el termomixer llegue a la temperatura de 42°C

\* Incubar 1 hora a 42°C.

\* Desnaturalizar la Transcriptasa reversa a 99°C durante 5 min y en hielo durante 5 min.

\* El cDNA resultante se almacenó a -20°C hasta su utilización posterior en el marcaje radiactivo (apartado 4.8) o como molde en las reacciones de PCR (apartado 4.10).



- Fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (Roche), utilizada para el marcaje radiactivo de fragmentos de DNA (apartado 4.8).
- Taq DNA polimerasa (Roche), enzima aislada de *Thermus aquaticus* y fundamental en la técnica de PCR (apartado 4.10).

#### **4.6.- Electroforesis de ácidos nucleicos: separación de fragmentos en geles de agarosa.**

La separación de los fragmentos de DNA y RNA se realizó por electroforesis en geles de agarosa a una concentración 1-2% (w/v), en función del tamaño de los fragmentos que se deseaban separar. En la preparación de los geles y el desarrollo de las electroforesis se siguieron los procedimientos convencionales descritos por Sambrook et al. (1989).

Para las electroforesis de DNA, los geles se prepararon de la siguiente manera:

- \* Mezclar 1.2 g de agarosa en 100 ml de tampón TBE 1X.
- \* Llevar la mezcla hasta ebullición en el microondas.
- \* Añadir a la mezcla 10 µl de bromuro de etidio como agente intercalante (10 mg/ml) para visualizar los fragmentos de DNA.
- \* Distribuir la mezcla en el molde para geles y solidificar a temperatura ambiente.

Las muestras se prepararon y se cargaron en el gel del siguiente modo:

- \* Añadir a las muestras el tampón de muestra (Loading Buffer) LB 10x.
- \* Centrifugar 5 seg a máxima velocidad.
- \* Cubrir el gel completamente con tampón de electroforesis TBE 1x.
- \* Cargar las muestras en los pocillos del gel.
- \* Aplicar una diferencia de potencial de 70-90 V durante 40 min.
- \* Visualizar los fragmentos de DNA en un transiluminador con luz ultravioleta ("UVP BioDoc-It™ Imaging System").

Como marcador de peso molecular se empleó DNA del fago Lambda digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* (Sigma), que permite la diferenciación de fragmentos de DNA con pesos moleculares que oscilan entre 21 y 0.5 kb.

## **LB 10x**

Tris-HCl 1M pH 8.0, glicerol 60%, azul de bromofenol 0.25%, xylene cyanol 0.25%.

## **Tampón TBE 1x**

Tris/Ácido bórico 1M, EDTA 20mM.

Los distintos tipos de RNA fueron separados en geles de agarosa al 1.6% que se elaboraron de la siguiente manera:

- \* Mezclar 1.8 gr de agarosa en 112.5 ml de agua milli Q.
- \* Calentar la mezcla hasta ebullición en el microondas.
- \* Añadir 15 ml de tampón MEN 10x y 28 ml de formaldehído al 37% (v/v) como agente desnaturizante, para evitar la formación de estructuras secundarias.
- \* Dispensar la mezcla en el molde para geles y solidificar a temperatura ambiente.

Para correr el gel de RNA las muestras de RNA total (10 µg) (apartado 4.2) fueron desnaturizadas previamente como se indica a continuación:

- \* Tomar el volumen de muestra necesario para obtener una cantidad de 10 µg y completar hasta alcanzar un volumen final de 20 µl con agua destilada estéril en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
- \* Añadir 31.3 µl de tampón de carga (LB Northern).
- \* Desnaturizar la muestra incubando a 55°C durante 15 min, seguidos de otros 5 min en hielo.

Para cargar la muestra en el gel se siguieron los siguientes pasos:

- \* Añadir a la cubeta tampón MEN 1x, observando que éste no cubra totalmente al gel.
- \* Cargar 10 µl de LB 1:10 en uno de los pocillos del gel, para visualizar el frente de corrido.
- \* Cargar las muestras en los pocillos del gel y llenarlos con el propio tampón MEN 1X.

- \* Correr el gel a 55V durante 5 min para que la muestra penetre en el gel.
- \* Cubrir el gel completamente con tampón de electroforesis MEN 1x.
- \* Incrementar la diferencia de potencial a 70V durante 2 horas.

## **LB Northern**

Formamida 20 µl, MEN 10x 5 µl, Formaldehído 6 µl, Bromuro de etidio 0.3 µl.

## **MEN 10x**

MOPS 200mM, Acetato de sodio 50mM, EDTA 10 mM pH 7.

## **4.7.- Purificación de fragmentos de DNA.**

Cuando fue necesario aislar determinados fragmentos de DNA para su posterior uso y caracterización se utilizó el “GeneClean Turbo Nucleic Acid Purification kit” (Bio 101 Systems, USA), siguiendo las especificaciones del fabricante:

- \* Cortar el fragmento de interés del gel de agarosa con un bisturí estéril.
- \* Introducir el trozo de agarosa en un tubo eppendorf de 1.5 ml y añadir 100 µl de “GeneClean Turbo Salt” por cada 0.1 g de gel de agarosa.
- \* Incubar a 55°C durante 5 min, incrementar el tiempo de incubación hasta que el gel de agarosa este completamente diluido.
- \* Transferir menos de 600 µl a una columna “GeneClean Turbo Cartridge” con el colector y centrifugar 5 seg a 13.300 rpm.
- \* Descartar el sobrenadante y lavar el precipitado con 500 µl de “Turbo Wash” (solución de lavado).
- \* Centrifugar a 13.300 rpm durante 5 seg y descartar el sobrenadante.
- \* Repetir el lavado y centrifugar a 13.300 rpm durante 4 min para eliminar cualquier resto de solución de lavado.
- \* Colocar la columna en un tubo nuevo colector, ya marcado.
- \* Añadir 30 µl de “Turbo Elution” e incubar 5 min a temperatura ambiente.
- \* Centrifugar a 13.300 rpm durante 1 min y obtener el eluido que contiene el DNA.

\* Conservar el DNA a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

\* Para comprobar la cantidad de DNA se pueden correr 2  $\mu\text{l}$  en un gel de agarosa

.

#### 4.8.- Marcaje radiactivo del DNA.

El marcaje radiactivo de las sondas de DNA utilizadas en las hibridaciones tipo Northern y Southern se realizó mediante el kit comercial “*Rediprime II Random Prime Labelling System*” (Amersham Biosciences).

Como isótopo radiactivo para marcar el DNA se utilizó  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ . El nucleótido marcado radioactivamente fue la citosina  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP de 3000 Ci/mmol, y para la síntesis de la cadena complementaria del DNA se empleó el fragmento *Klenow* de la enzima DNA polimerasa I .

Este tipo de marcaje está optimizado para cantidades de DNA muy pequeñas (25-75 ng) y permite obtener sondas con actividades específicas muy altas ( $1.8 \times 10^9$  dpm/mg), por lo que es muy útil para detectar genes de copia única en hibridaciones de Southern blot.

Para el marcaje radiactivo se siguieron las instrucciones del suministrador (Amersham Biosciences):

\* Descongelar todos los componentes del Kit en hielo, exceptuando la enzima *Klenow* que ha de estar a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de ser añadida a la mezcla de reacción.

\* Diluir el DNA (2.5-25 ng) que queremos marcar en un volumen final de 45  $\mu\text{l}$  de tampón TE.

\* Desnaturalizar el DNA molde por incubación a  $95\text{-}100^{\circ}\text{C}$  en un baño durante 5 min y rápidamente transferirlo a hielo durante 5 min.

\* Centrifugar 5-10 seg a máxima velocidad.

\* Añadir el DNA desnaturalizado al tubo con la reacción de marcaje que contiene dATP, dGTP, dTTP, tampón, la enzima *Klenow* libre de exonucleasa y oligonucleótidos al azar.

\* Añadir 5 µl de citosina marcada radioactivamente [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (3000 Ci/mmol) (Amersham) al tubo que contiene la reacción de marcaje y mezclar pipeteando.

\* Incubar a 37°C durante 1 hora.

\* Parar la reacción añadiendo 0.5 µl de EDTA 0.5M y 50 µl de tampón TE.

Antes de utilizar la sonda en las reacciones de hibridación se elimina el exceso de nucleótidos marcados radiactivamente no incorporados en la sonda, usando las columnas "Mini Quick Spin DNA" (Roche), para su purificación. Para ello, se resuspende la resina de la columna por vórtex y tras romper la parte inferior de la misma, se coloca en un tubo eppendorf y se centrifuga 1 minuto a 3.000 rpm, para eliminar el exceso de tampón.

\* Aplicar la muestra en el centro de la columna y centrifugar a 3.000 rpm. Medir la relación de radiactividad sonda: columna ( $\geq$  2:1).

\* Desnaturalizar la sonda sometiéndola a un baño de agua hirviendo durante 5 min., seguido de otros 5 min. en hielo.

## **TE Buffer**

Tris-HCl 10mM pH 8,0, EDTA 1mM.

## **4.9.- Transferencia e hibridación de ácidos nucleicos.**

### **4.9.1.- Southern blot.**

Esta técnica (Southern, 1975) permite la identificación y el análisis de secuencias específicas de DNA mediante el uso de electroforesis en geles de agarosa e hibridación utilizando sondas específicas. Para analizar una muestra de DNA (10µg) ésta debe ser previamente digerida con enzimas de restricción y separada por electroforesis en gel de agarosa (Apartado 4.6). Una vez terminada la electroforesis, los fragmentos de DNA se transfieren (o blotting) a un filtro o membrana de nylon (Hybond-N™, Amersham). La movilización de los ácidos nucleicos desde el gel hasta la membrana se consigue por capilaridad, con un tampón adecuado, ascendiendo verticalmente a través de una pila de papel absorbente compactado a presión. Una vez finalizada la transferencia se inmoviliza el DNA a la membrana utilizando el crosslinker UV Stratalinker™1800

(Stratagene), en la membrana está representada una copia exacta del patrón de bandas presente en el gel (Brown, 1993).

La secuencia para realizar la transferencia es la siguiente:

- \* Colocar una placa de vidrio limpia sobre una cubeta que contenga la solución de transferencia (NaOH 2M).

- \* Extender en la placa una tira de papel Whatman 3MM empapado en la solución de transferencia que sobresalga de la placa y esté en permanente contacto con la solución de transferencia. Debe ser de mayor tamaño que el gel.

- \* Colocar uno sobre otro y en el orden siguiente:

- \* Es muy importante que no haya burbujas de aire entre el gel y la membrana.

- \* Gel cubriendo el resto de la tira de papel Whatman con plástico para evitar el contacto con los papeles absorbentes.

- \* Membrana nylon (Hybond-N™, Amersham) del mismo tamaño que el gel.

- \* 3 papeles Whatman 3MM del tamaño del gel.

- \* Pila de papeles absorbentes de 10 – 15 cm de grosor.

- \* Placa de vidrio.

- \* Peso de 0,5-1 Kg.

- \* Dejar transferir durante toda la noche.

- \* Fijar los ácidos nucleicos a la membrana exponiendo 2 min en un Stratalinker (UV) 1800 (Stratagene). La correcta transferencia del DNA se comprobó en un transiluminador de luz UV. En estas condiciones, el filtro puede ser usado para la hibridación con una sonda radiactiva (Apartado 4.9.3).

### **4.9.2.- Northern blot.**

Es una técnica muy similar al Southern blot que permite la identificación de secuencias específicas de RNA. Mediante esta técnica se pueden transferir por capilaridad RNAs desde el gel a una membrana de nylon (Hybond-N™, Amersham).

El Northern permite detectar qué genes son transcritos en determinadas condiciones, así como la expresión de diferentes genes.

Para evitar que el RNA se degrade es necesario trabajar con material libre de RNasas y guantes. Se pueden analizar hasta 30 µg de RNA, aunque entre 10-15 µg son suficientes para detectar RNAs abundantes.

Culminada la electroforesis, se debe comprobar si las cargas son adecuadas, por lo que se visualiza el gel en el transiluminador "UVP BioDoc-It™ Imaging System" y se procede a la transferencia en la membrana de nylon. La secuencia para realizar la transferencia es la siguiente:

- \* Añadir SSC 20x a la cubeta de transferencia.
- \* Colocar en la cubeta una placa de cristal.
- \* Colocar una mecha de papel de filtro (Whatman 3MM) encima de la placa de cristal y empaparla con SSC 20x.
- \* Eliminar las burbujas de aire que hayan quedado atrapadas con la ayuda de una pipeta de vidrio estéril.
- \* Disponer el gel con la cara de la transferencia en contacto con la mecha evitando la formación de burbujas.
- \* Colocar una membrana de nylon (Hybond-N, Amersham) de las mismas dimensiones que el gel y eliminar las burbujas que hayan quedado atrapadas entre la membrana y el gel.
- \* Colocar tres papeles Whatman 3MM sobre el gel.
- \* Emplear una pila de papeles absorbentes de 10 – 15 cm de grosor.
- \* Disponer en la parte superior una placa de vidrio y un peso para compactar el sistema y facilitar la transferencia.
- \* Mantener la transferencia durante 16-18 horas cambiando el papel absorbente a intervalos de 8 horas.
- \* Una vez finalizada la transferencia, fijar el RNA al filtro utilizando un "Stratalinker" (UV) 1800 (Stratagene).

### **SSC 20x**

NaCl 3M, Citrato sódico 0.3M pH 7-8.

### 4.9.3.- Hibridación y autorradiografía.

Una vez completado el marcaje radiactivo del DNA, se procedió realizar la hibridación mediante la técnica de Church y Gilbert (1984):

- \* Previamente calentar el horno de hibridación a 65°C.
- \* Mezclar en una botella de hibridación 4 ml de tampón fosfato pH 7,2, 9 ml de agua milli Q estéril y 7 ml de SDS 20%.
- \* Calentar en el horno de hibridación a 65°C durante 15 min.
- \* Añadir a la botella de hibridación 40 µl de EDTA 0.5M pH 8.
- \* Poner el filtro dentro de la botella para prehibridar el filtro durante 1-2 horas a 65°C.
- \* Añadir la sonda radiactiva desnaturalizada a la botella de hibridación evitando que la sonda toque la membrana.
- \* Hibridar a 65°C durante 16 horas.

Una vez transcurrido el tiempo de hibridación, se elimina el exceso de radiactividad de la membrana:

- \* Precalear las soluciones de lavado SSC 2x; SDS 1% y SSC 0.5x; SDS 1% a 65°C.
- \* Recoger la sonda en un tubo *falcon* para su reutilización y conservar a -20°C en una urna de metacrilato.
- \* Realizar un primer lavado en el horno de hibridación, con la solución SSC 2x; SDS 1% a 65°C durante 15 min.
- \* Realizar un segundo lavado del filtro con la solución SSC 0.5x; SDS 1% a 65°C en el horno de hibridación durante 10 min.
- \* Comprobar el nivel de radiactividad del filtro y si es necesario repetir el último lavado.
- \* Cubrir el filtro con una película plástica y exponer en una placa de imagen Bas-IP 2040S (20x40 cm) Fujifilm durante 24-48 horas.
- \* Revelar la placa de imagen en un analizador de bioimágenes (“Bio-imagin analyzer” Bas 1500, Fujifilm).



## 4.10.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

### 4.10.1.- Técnica de PCR.

Ideada por el científico Kary Mullis a mediados de los 80 y más conocida como PCR (*Polymerase Chain Reaction*), la reacción en cadena de la polimerasa ha cambiado el curso de las ciencias biológicas y biomédicas más que cualquier otra técnica inventada durante el siglo XX. El gran éxito científico de la PCR reside en que permite obtener *in vitro* un gran número de copias de fragmentos específicos de DNA, basándose en un principio muy sencillo: la utilización de mecanismos similares a los empleados por la propia célula en la replicación del DNA durante la división celular.

La reacción en cadena de la polimerasa consiste en la repetición cíclica de tres etapas (Watson et al., 1992):

#### **Desnaturalización del DNA bicatenario**

Presente en la muestra para separar las dos cadenas, mediante la aplicación de temperaturas superiores a 90°C.

#### **Unión específica de los primer** (oligonucleótidos sintéticos)

A las cadenas sencillas mediante complementariedad de bases. La temperatura a la que se realiza esta unión ( $T_a$ , *annealing temperature*) es muy importante para controlar la especificidad de la reacción. La  $T_a$  depende de la composición de bases y del tamaño de los primers. Se suelen emplear dos primer que se unen cada uno a una cadena diferente delimitando la secuencia diana que se pretende amplificar. La selección de dichos cebadores constituye uno de los puntos más críticos del ensayo de PCR.

#### **Extensión de la cadena de DNA a copiar**

A partir de los primers, utilizando los nucleótidos presentes en la solución. y las cadenas de DNA de la muestra.

La polimerasa empleada inicialmente, procedente de *Escherichia coli*, se desnaturalizaba cuando se sometía a temperaturas superiores a 90°C durante la

primera etapa de cada ciclo y por lo tanto, había que reponerla al inicio de cada fase de extensión. En la actualidad, sin embargo, se utilizan enzimas termoestables como la *Taq* polimerasa, procedente del microorganismo termófilo *Thermus aquaticus* y cuya extensión la lleva a cabo la enzima DNA polimerasa, que inicia su actividad tras reconocer la unión de los primer.

Después de cada ciclo se obtiene como resultado la duplicación de la secuencia de DNA diana delimitada por la pareja de primer específicos. Dado que las nuevas copias también sirven como patrones en los subsiguientes ciclos, la cantidad de DNA generado se incrementa exponencialmente. De este modo, al final de  $n$  ciclos el número de copias de DNA por cada molécula será de  $2^n$ .

## PROCEDIMIENTO.

Se prepara la mezcla en las siguientes proporciones:

Tampon 10X	5 $\mu$ l
Oligonucleótico sentido (100 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Oligonucleótico antisentido (100 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
dNTPs (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Taq Polimerasa o "Expand High Fidelity"(Roche) (5U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O destilada estéril	39 $\mu$ l
Total	48 $\mu$ l

Al DNA problema o a amplificar se le agrega la mezcla

Mezcla	48 $\mu$ l
DNA problema ( $\leq 1\mu$ g)	2 $\mu$ l +
Total	50 $\mu$ l

Colocar las muestras en el termociclador (Mastercycler Gradient Eppendorf) e introducir la información de los ciclos.

Las condiciones de temperatura y tiempos se detallan a continuación. La temperatura de anillamiento se calculó con el programa Oligo 4.05, dependiendo de la longitud y composición de los oligonucleótidos empleados en la reacción de PCR. El tiempo de extensión aproximado fue de 1 min por cada kb de longitud del fragmento de DNA a amplificar:

94°C	3 min	DESNATURALIZACIÓN INICIAL	
94°C	30 seg	DESNATURALIZACIÓN	} 30-40 ciclos
52-61°C	30 min	ANILLAMIENTO	
72°C	1-2 min	ELONGACIÓN	
72°C	7 min	ELONGACIÓN FINAL	
4°C	∞		

#### 4.10.2.- PCR Cuantitativa (Q RT-PCR).

Esta técnica, fundamentada en la PCR convencional, se basa en la detección y cuantificación simultánea de la fluorescencia emitida por los productos de PCR acumulados durante el proceso de amplificación. La fluorescencia se cuantifica mediante el valor *ct* (cycle treshold) definido como el número de ciclos requeridos para que la señal de fluorescencia sobrepase el nivel umbral. Permite analizar cambios en la expresión de un gen en una muestra en relación a otra muestra de referencia, que generalmente contiene genes de expresión invariable (denominados genes “housekeeping”), tales como el gen *ACTINA8*, utilizado en el presente trabajo. Esta modificación del proceso tradicional de PCR, amplifica secuencias de RNA (Apartado 4.5.4) que previamente son convertidos a cDNA por acción de la enzima transcriptasa reversa Paralelamente, se ha de realizar una curva patrón en las mismas condiciones, empleando la sonda de un gen de expresión invariable para conocer la cantidad total de cDNA que se está amplificando.

Los análisis de expresión génica realizados mediante Q RT-PCR se llevaron a cabo empleando cDNA sintetizado a partir de 1 µg de RNA (apartado 4.2). Los oligonucleótidos se diseñaron en el programa Primer Express 1.0 (Applied Biosystems), usando como control cebadores específicos del gen ACTINA8.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en el termociclador ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA), empleando el kit Brilliant Green PCR MasterMix (Stratagene), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para llevar a cabo la reacción de amplificación, el cDNA fue diluido 25 veces. La concentración óptima de cada pareja de oligonucleótidos utilizados se determinó mediante un perfil de disociación previo, que simultáneamente permitió conocer si la amplificación era debida a la formación de dímeros entre ellos. Cada reacción se repitió por triplicado para obtener de este modo el valor de desviación estándar, siguiendo los pasos que se detallan a continuación:

- \* Añadir la combinación óptima de oligonucleótidos para que queden a una concentración final de 0,2 µM.
- \* Añadir 5 µl de una dilución 1:25 de las muestras de cDNA a cada pocillo.
- \* Preparar la mezcla de reacción y añadir 20 µl a cada pocillo.
- \* Centrifugar 10 seg a máxima velocidad.

### **Mezcla de reacción 20 µl**

Brilliant™ SYBR® Green I QPCR master mix 12 µl (SureStart Taq DNA polimerasa, tampón, mezcla de nucleótidos y SYBR Green), oligonucleótidos sentido y antisentido (0,2 µM), 0,375 µl ROX 300 nM, H<sub>2</sub>O estéril hasta 20 µl.

Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

50°C 2 minutos

95°C 10 minutos

95°C 15 segundos

60°C 1 minuto

} 40 ciclos

72°C 50 segundos

4°C ∞

Las curvas de amplificación se obtuvieron empleando el programa Prism 7000 SDS.

#### **4.11.- Secuenciación del DNA.**

La determinación de la secuencia de nucleótidos de los clones de cDNA se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca, que posee un secuenciador automático ABI 377 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Inc.) y utiliza el “dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” con la enzima AmpliTaq DNA polimerasa FS (Perkin Elmer).

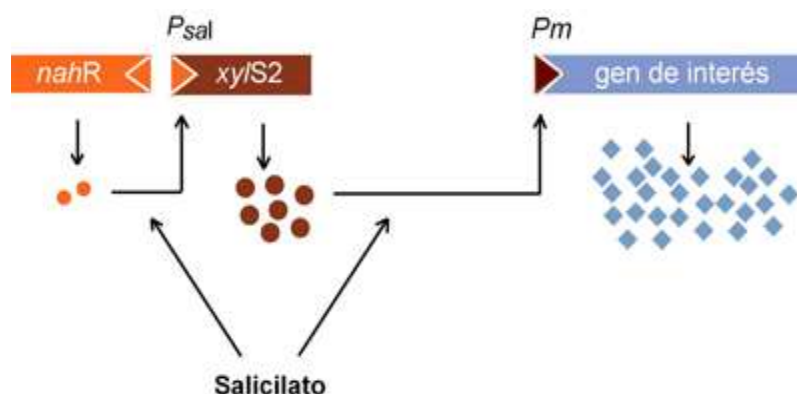
Las muestras se prepararon mezclando 500-600 ng de DNA de doble cadena con 3 pmol del oligonucleótido correspondiente hasta un volumen final de 8 µl. Los iniciadores utilizados fueron “M13 (-20) universal primer”, “reverse primer” y promotor T7. Además de los específicos para cada clon, que se detallan en los apartados correspondientes.

#### **5.- EXPRESIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.**

##### **5.1.- Expresión de proteínas en *E. coli*.**

La expresión controlada de los clones de cDNA como proteínas de fusión en *E. coli* se realizó utilizando el vector pALEX2b que está diseñado para ser utilizado con el sistema CASCADE™ para la expresión y purificación de proteínas.

CASCADE™ es un sistema bacteriano de expresión de proteínas altamente regulado y con una gran capacidad. El sistema utiliza circuitos de regulación en cascada para amplificar la expresión génica cuando está inducido, manteniendo un nivel basal de expresión muy bajo cuando no lo está.



**Figura M.3** Esquema de la expresión de proteínas en *E. coli*. (Empresa Biomedal).

### 5.1.1 Construcción de los plásmidos recombinantes y transformación.

La región codificante del clon aislado, correspondiente a la proteína PYL8/RCAR3, se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos siguientes:

IPF3: 5'-GGATCC**ATG**GGAAGCTAACGGGATTGA -3' (sitio *Bam*H I subrayado y codón de iniciación de la transcripción en negrita), y

IPR2: 5'-CCCGGG**TTCT**TACTCCTTTGATCTTT-3' (sitio *Sma*I subrayado y codón de paro en negrita),

La región codificante del clon aislado, correspondiente a la proteína FsPP2C1 se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos siguientes:

FsPP2C1F: 5'-GTCGAC**ATG**GCTGGGATTTGCTGTGG -3' (sitio ACC I subrayado y codón de iniciación de la transcripción en negrita), y

FsPP2C1R 5'-CCCGGG**ACT**ATTGTTGATT-3' (sitio *Sma*I subrayado y codón de paro en negrita), los cuales habían sido diseñados incorporando lugares de restricción que facilitaron su clonación. Todos los oligonucleótidos fueron

los cuales habían sido diseñados incorporando lugares de restricción que facilitaron los siguientes pasos de clonación. Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados y suministrados por Isogen, Inc.

Las condiciones de la reacción de PCR fueron: 5 min a 94 °C, 30 ciclos a 94 °C (1 min), 55 °C (1 min) y 72 °C (3 min) y finalizando con 10 min a 72 °C. A continuación, el producto amplificado fue purificado, como se ha detallado

anteriormente, y comprobado en gel de agarosa. El fragmento se ligó directamente al vector pGEM-T y el inserto fue liberado mediante digestión con las enzimas de restricción adecuadas.

Posteriormente, este inserto se subclonó, en fase de lectura, en el vector de expresión pALEX2b linearizado previamente con las mismas enzimas de restricción. El plásmido recombinante generado se denominó pALEX2b-IP. Por último, la secuencia fue verificada para evitar posibles errores cometidos por la Taq polimerasa.

## 5.2 Purificación de las Proteínas C-LYTAG.

El sistema C-LYTAG para la purificación de proteínas de fusión en *E. coli* está basado en una versión reducida del tag de purificación por cromatografía de afinidad C-LYTAG. C-LYTAG interacciona específicamente con la resina LYTRAP, un soporte cromatográfico de la Empresa Biomedal.

El nuevo tag incorpora una secuencia polipeptídica estructurada en alfa-hélice que actúa como elemento espaciador entre el dominio de unión a colina y la proteína de interés, reduciendo la posible interferencia estructural entre ambas regiones y facilitando, si es necesaria, la separación del tag mediante digestión con enteroquinasa, al favorecer el acceso de esta endopeptidasa a su diana de corte.

Previamente las proteínas han sido expresadas en *recA-1 (E. coli)* y transformadas con el plásmido pALEX conteniendo las distintas construcciones.

### **Procedimiento:**

- \* Las bacterias se crecen en medio LB en presencia de ampicilina y kanamicina.
- \* La inducción se hace con 2mM de salicilato (Figura M3).
- \* La solubilización de las proteínas se realiza en tampón fosfato 20mM a pH 7 y NaCl 1,5M.
- \* La resina equilibrada en el mencionado tampón se incuba con el extracto de proteínas solubilizadas durante 5 min.
- \* La resina se lava con 15 ml de tampón fosfato 20mM a pH 7.

\*La proteína recombinante se eluye con buffer fosfato 20mM a pH 7 y 250 mM de colina. Cada fracción de 1ml obtenida, se chequea en geles desnaturalizantes de SDS-PAGE al 16%.

Para la determinación de la concentración de proteínas en las diferentes muestras se utiliza el método de Bradford (1976) (Bio-Rad). En cada determinación se prepara una recta patrón de concentración, tomando como proteína de referencia la albúmina.

### 5.3.- Análisis de proteínas por SDS-PAGE.

#### 5.3.1.- Electroforesis de proteínas.

La técnica seguida para la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS fue la descrita por Laemmli (1970), con algunas modificaciones. Se utilizó un equipo *Miniprotean II* (Bio-Rad) con espaciadores de 1 mm y la electroforesis se llevó a cabo a 180-200 voltios.

Reactivos	Gel separador (12%)	Gel concentrante (5%)
Acrilamida/bis-acrilamida (28.2/0.8%)	4 ml	1.3 ml
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.7	2,5 ml	----
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	----	2,5 ml
SDS 10%	100 µl	100 µl
Agua Milli Q	3.3 ml	6.1 ml
PSA 10%	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl

#### Tampón de corrido

glicina 382 mM, Tris base 49 mM y SDS 0,1%.

#### Tampón de la muestra



Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8,  $\beta$ -mercaptoetanol 5%, SDS 2%, glicerol 10% y azul de bromofenol 0.00125%.

### 5.3.2.- Detección de las proteínas.

\* Una vez finalizada la electroforesis se utiliza el método Fairlanks de tinción rápida. En este método se emplean un total de 4 soluciones:

\* 1<sup>a</sup> solución: isopropanol al 25%, ácido acético al 10% y azul de coomassie 0,05%.

\* 2<sup>a</sup> solución: isopropanol al 10%, y ácido acético al 10%, 0,005% de azul Coomassie.

\* 3<sup>a</sup> solución: ácido acético al 10% y azul de Coomassie 0,002%.

\* 4<sup>a</sup> solución: ácido acético al 10%.

\* Introducir el gel en un recipiente con la 1<sup>a</sup> solución. Luego se calienta en el microondas a máxima potencia durante 2 min (hasta ebullición).

\* Dejar enfriar en agitación a temperatura ambiente durante 5 min.

\* Retirar esta solución y lavar con agua.

\* Añadir la 2<sup>a</sup> solución. Se vuelve a calentar en el microondas hasta ebullición.

\* Retirar la solución y lavar.

\* Añadir la 3<sup>a</sup> solución, se calienta en el microondas y se deja enfriar.

\* Lavar con agua y añadir la 4<sup>a</sup> solución, nuevamente se calienta en el microondas. Con esta solución en frío se puede dejar de 15 min hasta toda la noche. En el recipiente también se incluye una esponja con el fin de retirar los restos de colorante para desteñir por completo el gel. Una vez finalizado el proceso de tinción, el gel se seca a vacío entre papel celofán (Bio-Rad).

Los tamaños de las proteínas separadas por SDS-PAGE se determinaron por comparación con marcadores de bajo rango de peso molecular ("SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range", Bio-Rad).

### 5.4.- Determinación de la actividad fosfatasa.

La determinación de la actividad fosfatasa se realizó mediante ensayos de fluorescencia, para los que se utilizó el kit “Sensolyte FDP Protein Phosphatase Assay kit” (ANASPEC). Este ensayo se basa en la hidrólisis del sustrato fluorogénico FDP (3,6- fluorescein diphosphate) que provoca una reacción de fluorescencia.

El tampón de ensayo para PP2C que se utilizó es el siguiente:

- \* 50mM Tris-HCl pH 7.5
- \* 0,1mM EDTA
- \* 0,5mM DTT
- \* 60mM MgCl<sub>2</sub>

Añadir a la solución FDP (3,6- fluorescein diphosphate) 250 µl de DMSO.

Preparar una solución stock para el número de muestras necesarias. Para 100 muestras:

Componente	Volumen
FDP (3,6- fluorescein diphosphate)	50 µl
Tampón de ensayo	4,95 ml
1M DTT	15 µl
<b>Total</b>	<b>5ml</b>

	Proteínas	1	2	3	4	5	6	7
	FsPP2C1	-	-	40ng	40ng	40ng	40ng	40ng
Repetición 1	PYL8/RCAR3	-	50ng	-	10ng	25ng	50ng	100ng

\* En placas de Elisa de 96 pocillos, añadir 25 µl de FsPP2C1 a los pocillos correspondientes y posteriormente según se ha indicado previamente la proteína PYL8/RCAR3.

\* Añadir 50 µl de la solución stock.

\* Agitar la placa durante 30 seg

\* Iniciar la lectura:

Ex/Em =  $485\pm 20$  /  $528\pm 20$ nm, es necesario hacer la lectura cinética cada 10 min a lo largo de 60 min. Se utilizó el lector de placas TECAN ULTRA EVOLUTION.

### 6.- ENSAYOS DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURA

Este ensayo de doble híbrido en levadura se emplea para la detección de la interacción entre dos proteínas, basándose en que algunos factores transcripcionales constan de 2 dominios imprescindibles para que se produzca la transcripción del gen al que regulan. Este es el caso del factor transcripcional GAL4 de levadura, que consta de un extremo N-terminal que se une al DNA (binding domain, BD) y un extremo C-terminal (activation domain, AD) necesario para que se produzca la transcripción del gen reportador LACZ (Young, K, 1998). FSP2C1 fue fusionado al dominio de unión a DNA GAL4 (DNA-BD), mientras que los genes provenientes de la librería (presa), están fusionados al dominio activador GAL4 (AD). La interacción entre el cebo y la presa dentro de una levadura permite la aproximación del dominio activador y de unión a DNA causando la reconstitución del factor transcripcional GAL4.

El análisis del doble híbrido en *Arabidopsis* se realizó al azar, el cebo se transformó en la cepa de levadura Y187 con 10 millones de fragmentos individuales. Para una mayor eficiencia de acoplamiento se utilizó el método específico (Legrain et al., 1998, 2000, 2002). La búsqueda se realizó primero a pequeña escala para adaptar la presión selectiva a la propiedad intrínseca de la "carnada". Se encontró también que la concentración óptima de  $100\mu\text{M}$  de 3-amino triazol, concentración que servirá para reducir colonias de fondo. A continuación se realizó la búsqueda a gran escala en condiciones que aseguren un número de 50 millones de interacciones probadas en el fin de cubrir 5 veces la complejidad primaria de la levadura (Rain et al., 2001). Para evaluar la fiabilidad de cada interacción se aplicó una puntuación biológica (PBS) (Formstecher et al., 2005), que se basa en dos diferentes niveles de análisis. En

primer lugar, una puntuación local toma en cuenta la redundancia y la independencia de los fragmentos de presa, así como las distribuciones de los marcos de lectura y codones de paro en los fragmentos de superposición. En segundo lugar, una puntuación global tiene en cuenta las interacciones que se encuentran (Rain et al., 2001 ; Wojcik et al., 2002).

### **7.- OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS.**

#### **7.1.- Transformación de *Arabidopsis thaliana* por *Agrobacterium*.**

##### **7.1.1.- Construcciones para la transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana*.**

El gen utilizado en la generación de plantas transgénicas fue *PYL8/RCAR3*. Este gen se empleó para la transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* por medio de *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando el vector binario pBI 121 (Bevan, 1984)(Figura M.1).

El T-DNA de este vector contiene el gen delator *GUS* ( $\beta$ -glucuronidasa) bajo el control del promotor 35S, y el gen *NPTII* (neomicina fosfotransferasa II) que confiere resistencia a kanamicina. La bacteria *Agrobacterium tumefaciens* introducirá en las células vegetales la construcción preparada dentro del fragmento de T-DNA, que se encuentra entre las zonas denominadas LB y RB del plásmido pBI 121.

En primer lugar, se realizó la ligación en el vector pGEM-T (Apartado 4.5.2) y la transformación de células competentes de *E.coli* cepa DH5 $\alpha$  (Apartado 3.4). La presencia y orientación del inserto se comprobó por digestión utilizando las enzimas de restricción *BamH* I y *Sma* I.

A continuación se llevó a cabo la construcción pBIN121 *PYL8/RCAR3*. Para ello, se digirió el vector pBIN121 con las enzimas de restricción *BamH* I y *Sma* I. Se realizó la ligación a una relación molar 1:3. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células competentes de la cepa *E.coli* DH5 $\alpha$  y los transformantes se seleccionaron en placas de LB conteniendo 50 $\mu$ g/ml de kanamicina.

## 7.1.2.- Preparación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*.

*Agrobacterium tumefaciens* es una bacteria gram negativa que tiene la capacidad de infectar diferentes especies de plantas. La cepa de *A. tumefaciens* utilizada en nuestros experimentos fue la C58C1, que contiene el plásmido Ti desarmado pGV2260 (Deblaere et al., 1985). Dentro del plásmido Ti se encuentra el T-DNA que contiene la construcción de interés, logrando que el fragmento se integre en el genoma de la planta por un proceso de transferencia. La bacteria se pone en contacto con las flores de *Arabidopsis* y se procede a dar un golpe de vacío. En este periodo de contacto, la bacteria transfiere al tejido el T-DNA del plásmido Ti, que se integra en el material genético de sus células, transcribiéndose más tarde como si fuera un gen propio de la planta.

Para la obtención de células competentes de esta cepa de *Agrobacterium* se realizaron los siguientes pasos:

- \* Obtener un cultivo saturado de células en 10 ml de LB líquido suplementado con rifampicina (0.14 mg/ml).
- \* Incubar a 28°C durante 2-3 días.
- \* Con 1 ml del cultivo saturado incubar 100 ml de LB.
- \* Incubar a 28°C durante una noche hasta que la D.O. a 600 nm sea de 0,5-1,0.
- \* Recoger las células por centrifugación a 3.000 rpm durante 20 min y a 4°C.
- \* Lavar dos veces con agua Milli Q estéril a 4°C.
- \* Resuspender las células obtenidas en 4 ml de glicerol al 10% a 4°C.
- \* La suspensión se dividió en fracciones de 0.4 ml, que se almacenaron a -80°C.

## 7.1.3.- Transformación de *A. tumefaciens* mediante choque térmico.

Estas células competentes se transformaron con las construcciones pBI121-PYL8/RCAR3 mediante choque térmico. Para ello, se realizó el siguiente procedimiento:

- \* Poner en un eppendorf 200µl de células competentes.

- \* Añadir 100-500ng de la construcción pBI121-PYL8/RCAR3.
- \* Congelar en nitrógeno líquido durante 5 min.
- \* Descongelar en un baño a 37°C durante 25 min.
- \* Añadir 1ml de LB a cada muestra.
- \* Incubar 1 hora a 28°C con agitación (200 rpm)
- \* Luego para seleccionar los transformantes se plaquea la muestra en LB sólido suplementado con rifampicina (50 µg/ml) y kanamicina(50 µg/ml).
- \* Incubar a 28°C.

### **7.1.4.- Preparación de plásmidos de *A. tumefaciens*.**

Para confirmar si las colonias de *A. tumefaciens* contenían la construcción deseada, se realizó una extracción de los plásmidos. Para ello:

- \* Seleccionar 10 colonias y se inocularon en matraces de 10 ml de LB suplementado con rifampicina y kanamicina.
- \* Incubar a 28°C en agitación (200 rpm) durante una noche. Posteriormente se purifica el plásmido siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.4.

### **7.1.5.- Infiltración de plantas de *Arabidopsis thaliana* con *A. tumefaciens*.**

La transformación de *Arabidopsis* por medio de *A. tumefaciens* se realizó por el método de infiltración *in planta* (Clough y Bent, 1998). La transformación de plantas enteras no requiere regeneración de tejidos *in vitro*, lo que evita la variación somaclonal, y además, se reduce el tiempo requerido para obtener individuos transformados.

- \* Poner un preinóculo de 10 ml de *A. tumefaciens* con la construcción en LB+ rifampicina (50 µg/ml) + kanamicina (50 µg/ml).
- \* Inocular con 5-10 ml del preinoculo 500 ml de LB+ rifampicina (50 µg/ml) + kanamicina (50 µg/ml).
- \* Incubar toda la noche a 28°C en agitación.
- \* Centrifugar a 3000 rpm durante 15 min a 4°C.

\* Resuspender el pellet en 200 ml de medio MS + 5% sacarosa y disolver suavemente (usar el menor vortex posible).

\* Añadir 44 µl de la citoquinina BAP (50 µg/ml).

\* Añadir 60 µl del detergente Silwet L-77 al 0.02% (v/v).

Las plantas de *A. thaliana* (ecotipo Col-0) que iban a ser infiltradas, se crecieron en macetas (10-15 semillas por maceta) en las condiciones ya descritas (Apartado 2.2.2). Para la inoculación de las plantas con *A. tumefaciens*, se tuvo en cuenta que las flores se encontraran en su mayoría cerradas.

Para la infiltración al vacío se realizó el siguiente procedimiento:

\* Colocar 200 ml de la suspensión de *A. tumefaciens* en un recipiente de plástico.

\* Introducir en la campana de vacío.

\* Colocar sobre el recipiente en posición invertida la maceta con las plantas en floración, de modo que la parte aérea de la planta quede sumergida en la suspensión.

\* Aplicar dos pulsos de vacío de 5 min.

\* Después del vacío dejar secar la planta sobre papel filtro, para eliminar el exceso de suspensión.

\* Introducir la planta en una bolsa cerrada y dejarla en un fitotrón (16h luz, 8h oscuridad) al menos 2 días.

\* Quitar la bolsa y regar periódicamente hasta la aparición de silicuas.

### 7.2.- Selección de semillas transgénicas.

Cuando las silicuas de las plantas transformadas (T0) estuvieron maduras se recogieron las semillas y se guardaron al menos una semana. Para la selección de los transformantes primarios (T1), las semillas procedentes de plantas individuales se esterilizaron, se sembraron en placas petri de 15 cm de diámetro con medio de selección con Kanamicina. Después de 7- 10 días desde la siembra los transformantes eran claramente identificables por su color verde y sus raíces

desarrolladas (Fig M.4); en ese momento se trasplantaron a alveolos y se trasladaron a un fitotrón para su cultivo.

### 7.2.1.- Análisis de la segregación del marcador de resistencia a kanamicina en la generación T2.

Las plántulas T1 se transfirieron a macetas con tierra y se dejaron crecer hasta la producción de semillas. Las semillas de estas plantas (generación T2) se recolectaron y se sembraron en placas de MS con kanamicina, donde se estudió la segregación de la resistencia a kanamicina de dichas semillas (Fig. M.4).

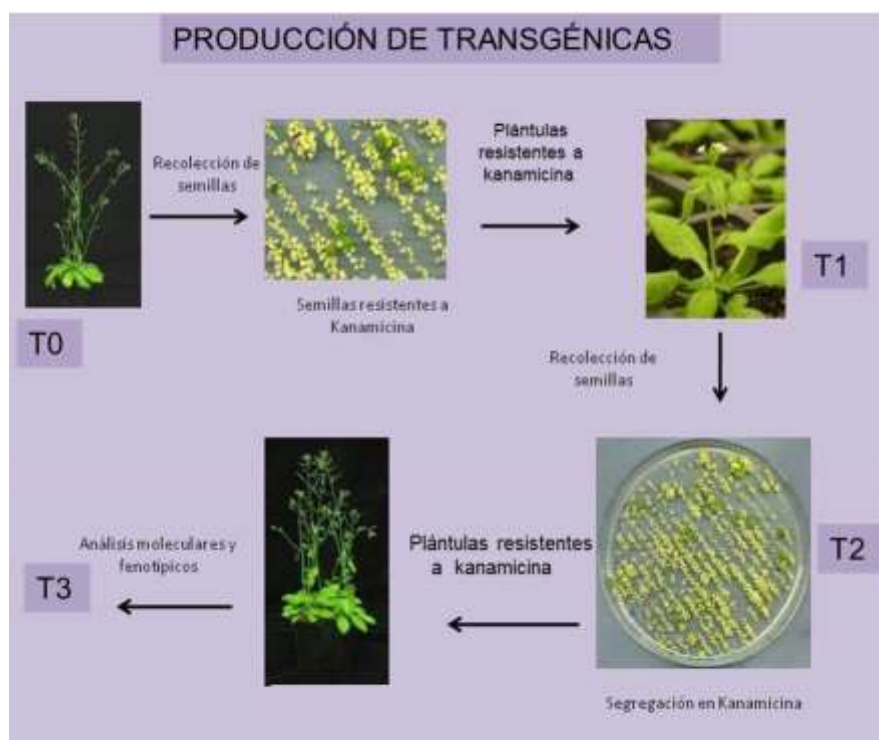
Para el análisis estadístico de los datos de segregación de la resistencia a kanamicina en la progenie de las distintas líneas transgénicas se utilizó el estadístico muestral  $\chi^2$ , que se construye utilizando la siguiente expresión analítica:  $\chi^2_{corr} = \sum (|O-E| - 1/2)^2 / E$

Donde O es la frecuencia observada, E es la correspondiente frecuencia esperada, y |O-E| es el valor absoluto de la diferencia entre O y E.

El valor obtenido se comparó con los valores de la tabla de  $\chi^2$  para un grado de libertad. Si el valor obtenido corresponde a una probabilidad mayor de 0,5, la desviación obtenida no es significativa y por lo tanto los datos se ajustan aceptablemente a la hipótesis (Parker, 1989).

Las hipótesis nulas ( $H_0$ ) planteadas fueron dos: que los datos eran compatibles con una segregación 3:1(resistentes: sensibles) lo que corresponde a la inserción del T-DNA en único *locus*, o bien compatibles con una segregación 15:1 que corresponde a la inserción del T-DNA en dos *loci*. En ambos casos la hipótesis alternativa ( $H_1$ ) fue que no se cumpliera la hipótesis  $H_0$ . Las categorías son plántulas resistentes y sensibles a kanamicina.





**Figura M.4** Resumen esquemático de la producción de transgénicos de *Arabidopsis*.

## 7.2.2.- Caracterización molecular y fenotípica de las plantas transgénicas.

Un grupo de 20 plántulas correspondientes a líneas T3 homocigotas y resistentes a kanamicina, se transfirieron de las placas a alveolos, para recolectar material vegetal y se utilizaron para la extracción de RNA. Las muestras de ácidos nucleicos obtenidas se utilizaron para el análisis por Northern blot (Apartado 4.9.2), o PCR cuantitativa (Apartado 4.10.2) permitiendo comprobar los niveles de expresión del transgén entre las distintas líneas transgénicas.

El análisis por Southern Blot (Apartado 4.9.1) nos permitió saber cuántas copias del transgén *PYL8/RCAR3* estaban presentes en nuestras líneas transgénicas y así seleccionar las líneas que tuvieran una única copia del gen transferido.

Para la caracterización fenotípica de estas líneas transgénicas se hicieron varios ensayos. En primer lugar, ensayos de germinación en presencia de ABA a diferentes concentraciones (0,5  $\mu\text{M}$ , 0,7  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$ ) utilizando como controles

medio MS sin suplemento y semillas Col-0. También se realizaron ensayos de germinación en presencia de paclobutrazol, que es un inhibidor de la síntesis de giberelinas, utilizándolo en dos concentraciones (1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M). Siguiendo la caracterización fenotípica, se realizó un ensayo de dormición, donde se analizaron los porcentajes de germinación de diferentes semillas que habían sido estratificadas durante 0, 24, 48 y 72 horas a 4°C en oscuridad y posteriormente mantenidas en una cámara de germinación a 21°C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz. En esta ocasión se utilizaron como controles semillas Col-0, *abi1-1* y el ecotipo Enkheim-2, con fuerte grado de dormición. Para estudiar la respuesta al estrés osmótico analizamos la germinación y crecimiento en presencia de manitol a concentraciones de 150mM, 200mM y 250mM, utilizando como control semillas de Col-0, *abi1-1*, *35S: FsPP2C1*. Otro ensayo de respuesta a estrés abiótico fue el que se realizó en presencia de NaCl a concentraciones de 100mM, 125mM y 150mM, utilizando los mismos controles del ensayo de respuesta a estrés osmótico.

Posteriormente, analizamos el crecimiento de las raíces en presencia de ABA (3 $\mu$ M, 5  $\mu$ M). Los ensayos de crecimiento de raíz se realizaron en placas cuadradas que se disponían de forma vertical, en medio MS suplementado con ABA, determinando la longitud de la raíz después de 5 días.

Por último, se realizaron ensayos de sequía y pérdida de agua. Para ello, se seleccionaron alveolos con plantas saludables, se forraron para evitar el ingreso de agua y minimizar la pérdida de agua por evaporación, se pesaron los alveolos a T0, posteriormente se pesan durante 9 días y se observa la pérdida de agua.

### **7.3 Cruzamiento y recolección de semillas.**

Para realizar un cruzamiento entre dos estirpes de *Arabidopsis thaliana*, se utilizó una de ellas como donante y otra como receptora de polen (parentales masculino (m) y femenino (f), respectivamente). Según el procedimiento descrito por Kranz y Kirchheim (1987), se elige un grupo de capullos florales en un ápice inflorescente de un tallo de la planta, que se usará como parental

femenino, y se eliminan todas las flores maduras, presuntamente autofecundadas, así como todos los capullos ya formados, salvo aquéllos cuyos pétalos sean apenas visibles. A estos últimos se les extirpan los sépalos, los pétalos y se emasculan los estambres inmaduros, obteniendo de este modo flores cuya única estructura funcional es un pistilo no fecundado. Estas manipulaciones se realizan con unas pinzas de microcirugía (Lawton 09-0956XC) previamente esterilizadas por inmersión en etanol al 95% y secadas al aire, para eliminar cualquier traza de polen contaminante que pudieran contener. De la planta que se utilizará como donante de polen, se extirpa una flor madura que presente los pétalos abiertos y estambres con los granos de polen bien visibles en sus anteras. Presionando la flor con unas pinzas a la altura de los sépalos, se ponen en contacto varias de sus anteras, una por una, con el pistilo de las flores receptoras de polen.

El cruce se señala adheriendo al tallo, junto a la flor fecundada manualmente, una etiqueta en la que se indica el genotipo del material del parental masculino empleado para la polinización. Las plantas que se han sido fecundadas por este procedimiento son devueltas a la cámara de cultivo, en la que permanecerán hasta que se formen y maduren las silicuas, que serán recogidas y separadas en tubos eppendorf adecuadamente etiquetados.

Las semillas contenidas en la totalidad de las silicuas de la planta, producto de su autofecundación, se conservan en sobres.

### **8.- TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA DE CÉLULAS DE EPIDERMIS DE CEBOLLA POR BOMBARDEO DE PARTÍCULAS.**

Con el objetivo de estudiar la localización subcelular de las proteínas FsPP2C1 y PYL8/RCAR3 *in vivo*, se utilizó el vector pMDC43 (Fig. M.1) y se realizaron las construcciones pMDC43-FsPP2C1 y pMDC43-PYL8/RCAR3. En ambas construcciones, el gen se introdujo entre los sitios attR1 y attR2 y el clonaje de

las construcciones se realizó según el protocolo de ligación GATEWAY (Apartado 4.5.3) y las construcciones químéricas se comprobaron por secuenciación.

Con estas construcciones se transformaron, de manera transitoria, células de epidermis de cebolla, mediante la técnica de bombardeo de partículas de oro recubiertas con el DNA de interés. La transformación transitoria se realizó siguiendo una modificación del protocolo de Klein et al. (1987), como se detalla en los subapartados siguientes.

### **8.1.- Preparación de células epidérmicas de cebollas.**

Las monocapas epidérmicas, obtenidas de la cara interna de las envueltas de los bulbos de cebolla, se colocaron en placas con medio MS-gelrite 2 horas antes del bombardeo con las partículas de oro, permaneciendo a 28°C en oscuridad hasta su transformación.

#### **Medio MS-gelrite:**

4.7gr/l de medio MS

20gr/l sacarosa

0,5g/l MES, se ajustó el pH a 5,8 y se añadieron 2g/l de Gelrite (Duchefa).

Posteriormente es esterilizado en autoclave.

### **8.2 Preparación de microproyectiles de DNA.**

\* En tubo eppendorf se mezclaron 60 mg partículas de oro (Bio-Rad) con 1 ml de etanol absoluto en vortex durante 10 min.

\* La mezcla se centrifugó 10 seg a 14.000 rpm, descartando el sobrenadante.

\* Añadir 1 ml de glicerol estéril al 50 % y agitar en vórtex 30 seg, repitiendo este proceso dos veces más.

\* Resuspender el precipitado en 1 ml de glicerol al 50% y almacenar a 4 °C.

\* A 38 µl de partículas de oro así preparadas, se le añadieron 5 µg de DNA de alta pureza y agua milliQ estéril hasta completar 110 µl, y se resuspendieron mediante agitación en un vórtex durante 5 min.

\* Bajo esta agitación continua, se añadieron 150  $\mu\text{l}$  de una mezcla de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ /espermidina (125  $\mu\text{l}$  de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  2.5 M y 25  $\mu\text{l}$  de espermidina 0.1 M).

\* Dejar sedimentar en hielo durante 10-15 min.

\* Eliminar el sobrenadante y añadir 500  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto, agitando en vórtex 20 seg. El lavado con etanol se repitió dos veces y, finalmente, se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto.

### **8.3.- Bombardeo de las células de epidermis de cebolla.**

\* Esterilizar todas las membranas (Rupture Disk BioRad 1652329) y las rejillas (Stopping Screens BioRad 1652336) con etanol absoluto y mantener siempre el sistema en una cámara de flujo laminar.

\* Conectar la bomba de vacío y el flujo de helio (hasta una presión de 1.100 psi con discos de ruptura de 900 psi).

\* Eliminar el etanol de las partículas de oro recubiertas con el DNA y resuspender en 48  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto.

\* Agitar en vórtex y depositar 8  $\mu\text{l}$  en el centro de cada membrana portadora, dejándola secar.

\* Colocar las membranas, la rejilla y la placa con el material a bombardear en el aparato de Biobalística (BioRad PDS-1000/He).

\* Cerrar la cámara. Por último, accionar la bomba de vacío hasta 27 in. Hg (0.1 atm). Presionar el botón de disparo hasta romper la membrana y parar inmediatamente el vacío.

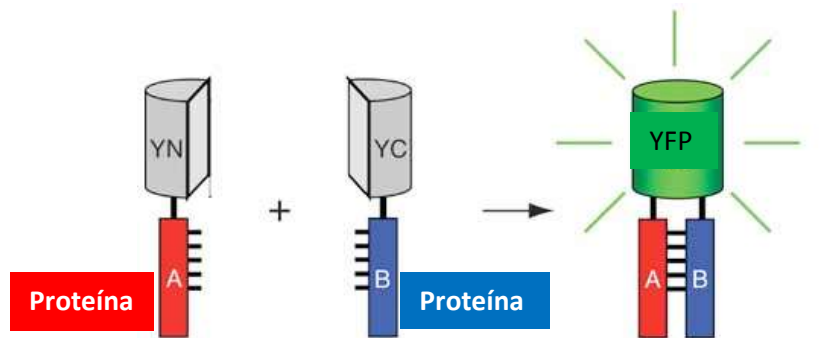
\* Una vez bombardeadas las células, las placas se incubaron en oscuridad de 2 a 18 horas a 22°C, para permitir la acumulación de la proteína GFP antes de su observación al microscopio.

\* La fluorescencia emitida por la expresión de la proteína GFP se observó en un microscopio óptico Zeiss Axiovert 200 con epifluorescencia y un filtro adecuado para GFP. Para la detección de la fluorescencia específica de la GFP por

microscopía confocal, se utilizaron filtros Zeiss de 515-530 nm con una fuente de excitación laser de Argon de 488 nm y el software de adquisición LaserShap v.5.

## 9.- COMPLEMENTACIÓN BIMOLECULAR FLUORESCENTE (BIFC).

Para confirmar la interacción “in planta” entre las proteínas FsPP2C1 y PYL8/RCAR3, se utilizó la técnica descrita por Hu et al., (2002) basada en la complementación de la fluorescencia por dos fragmentos no fluorescentes de la YFP cuando son reunidos por dos proteínas que interaccionan entre sí y que han sido fusionadas a cada uno de los mismos (Figura M6). La expresión se realiza de manera transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana*, transformadas mediante infiltración con *Agrobacterium tumefaciens*.



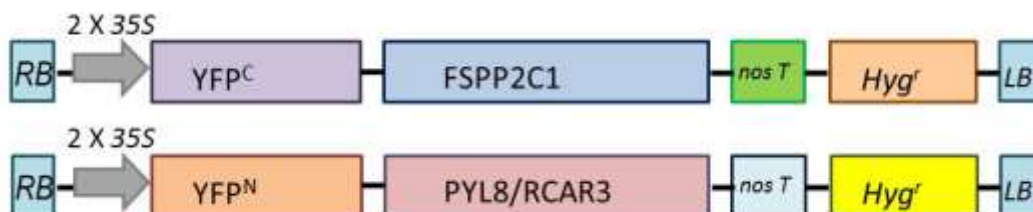
**Figura M.6** Modelo esquemático de la reconstrucción de la fluorescencia emitida por la proteína YFP, empleada para la realización del ensayo BiFC.

Las plantas de tabaco se cultivaron individualmente en macetas de plástico de 13 cm de diámetro que contenían una mezcla de turba:vermiculita (1:1), manteniéndose a una temperatura de 24°C durante el día y 18°C durante la noche. Se mantuvo un fotoperiodo de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad).

### 9.2.- Construcciones realizadas.

La proteína fluorescente amarilla (YFP) se dividió en dos fragmentos N-terminal (YFP<sup>N</sup>) y C-terminal (YFP<sup>C</sup>). Cada fragmento fue clonado junto a las proteínas de interés. La reconstitución del cromóforo fluorescente YFP se produce sólo

cuando interactúan las proteínas. Para el clonaje se utilizó el vector pMDC43 (Fig. M.1), y se realizaron las construcciones YFP<sup>C</sup>-FsPP2C1 y YFP<sup>N</sup>-PYL8/RCAR3. En las dos construcciones el gen se introdujo entre attR1 y attR2 y el clonaje de la construcción se realizó según el protocolo de ligación GATEWAY (Apartado 4.5.3)



**Figura M.7** Construcciones empleadas en el ensayo BiFC.

### 9.3.- Transformación transitoria por agroinfiltración.

- \*Hacer un preinoculo de *A. tumefaciens* transformado con las construcciones anteriores en 3ml de LB suplementado con rifampicina (50 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml).
- \* Incubar 48 horas a 28°C en agitación (200 rpm).
- \* Inocular con 2ml del preinóculo 20 ml de LB+ rifampicina y kanamicina.
- \* Inocular también 10ml de *A. tumefaciens* transformado con el supresor del silenciamiento p19.
- \* Dejar toda la noche incubando a 28°C en agitación 200 rpm.
- \* Medir la densidad óptica del cultivo, es muy importante detener la incubación cuando la D.O a 600nm sea igual a 0,5.
- \* Centrifugar los inóculos a 4000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente.
- \* Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado en un volumen de 10 ml de la solución de infiltración. Esta solución se mezcla en el momento y también se añade acetosiringona (stock a 100mM y añadir 20 µl para 10 ml de solución quedando a 200µM).

\*Dejar los tubos a temperatura ambiente durante al menos 3 horas y en oscuridad.

\*Agroinfiltrar con la ayuda de una jeringa. Justo antes de infiltrar se mezclan :

- 10 ml 35S:GFP+10 ml p19 (control positivo).
- 10 ml de YFP<sup>N</sup>- PYL8/RCAR3 + 10ml YFP<sup>C</sup>-FSPP2C1+ 10 ml p19.

\*Observar la infiltración tras 3 días en microscopia confocal.

### **Solución de infiltración:**

10mM de MgCl<sub>2</sub> +10 mM de MES pH 5,6

## **10.- ANÁLISIS Y PRESENTACIÓN DE DATOS.**

### **10.1.- Fotografía. Autorradiografía.**

Los geles de agarosa para la separación de DNA y RNA fueron visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta UVP BioDoc-It™ *Imaging System* y las imágenes se imprimieron en una impresora térmica Digital Graphic Printer UP-D897 (Sony).

Las placas de imagen Bas-IP 2040S (20x40 cm) (Fujifilm) utilizadas para los ensayos de Northern blot, se revelaron en un analizador de bioimágenes (*Bio-imagin analyzer* Bas 1500, Fujifilm).

Las imágenes de las plántulas, silicuas, semillas y placas fueron tomadas en un escáner EPSON *Perfection 3590 Photo* y en una lupa LEICA MZ 16 FA acoplada a una cámara fotográfica digital LEICA DFC 490. Tanto el escáner como la cámara estaban conectados a un ordenador Apple iMac G5.

### **10.2.- Análisis informático.**

El diseño de oligonucleótidos para la amplificación de cDNA mediante PCR se llevó a cabo con el programa Oligo® 4.05, Primer Analysis Software (National Biosciences, Inc.) mientras que para Q RT-PCR los oligonucleótidos se diseñaron en el programa Primer Express1.0 (Applied Biosystems). Para comprobar la



eficacia de los oligonucleótidos, se realizaron PCRs virtuales mediante el programa Amplify.

Los datos obtenidos tras la secuenciación de fragmentos de DNA se visualizaron mediante las aplicaciones informáticas EditView (ABI PRISM™, Perkin Elmer) y DNA Strider, y se analizaron por comparación con las bases de datos TAIR BLAST 2.2.8 (<http://www.arabidopsis.org/>) y MIPS (<http://mips.gsf.de/proj/plant/jsf/athal/index.jsp>)

La comparación entre las distintas secuencias aminoácidicas se obtuvieron utilizando el método CLUSTAL W (Thompson et al.,1994) con la aplicación de Megaling de DNASTAR LASERGENE.

El árbol filogenético en el que se representaron las PYR1/PYL/RCAR de Arabidopsis y otras especies, se realizó con el programa informático MEGA4 (Tamura et al., 2007) y la base de datos Phytozome (<http://www.phytozome.com>).

### **10.3.- Presentación de datos.**

El programa utilizado en la escritura ha sido Microsoft® Word 2007 (Microsoft Corporation). Para las figuras se ha utilizado el programa Adobe Photoshop® 6.0 (Adobe Systems). Las imágenes digitalizadas se obtuvieron con el EPSON “Perfection 3590 Photo”.

Las representaciones gráficas se han realizado, con Microsoft Excel para hojas de cálculo y realización de gráficas. Para la elaboración del apartado de bibliografía se usó el programa informático Jab Ref.

#### **10.3.1.- Pautas seguidas para la redacción de esta memoria.**

A lo largo de toda esta memoria se ha intentado hacer justicia a los autores anteriores, citando, en la medida de lo posible, los artículos en los que se recogió por primera vez un experimento o una idea. Las referencias en el texto se ordenan cronológicamente, siguiéndose un orden alfabético para autores de artículos publicados en el mismo año. Todos los autores de una publicación son

mencionados en la bibliografía, mientras que en el texto se cita únicamente al primero de ellos, salvo cuando son dos, que se menciona a ambos.

Se ha procurado seguir el Diccionario de la Lengua Española de la Real Academia Española [Vigésimo primera edición (1992), Espasa Calpe, Madrid] y el Vocabulario Científico y Técnico de la Real Academia de las Ciencias Exactas, Físicas y Naturales [Segunda edición (1990), Espasa Calpe, Madrid].

Aquellos términos en inglés que no cuentan con un equivalente español de uso generalmente aceptado, se citan en cursiva o entre comillas.

Las abreviaturas empleadas en esta memoria para referirse a unidades de medida se corresponden con las del Sistema Internacional. Se ha procurado aplicar la normativa de la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) en lo referente a la formulación química y a las denominaciones de los compuestos empleados en este trabajo.

En algunos puntos de esta memoria, se citan como fuentes direcciones de Internet, en formato <http://...> Estas citas se hacen con plena conciencia de que algunas de ellas son transitorias. Se trata, no obstante, de documentos que existen únicamente en formato electrónico y que no tienen un equivalente impreso en papel, por lo que no pueden ser citados de otro modo que el empleado en esta Tesis.



**RESULTADOS**



## 1. CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON LA PROTEÍN-FOSFATASA DE TIPO 2C (FsPP2C1) DE *Fagus sylvatica*.

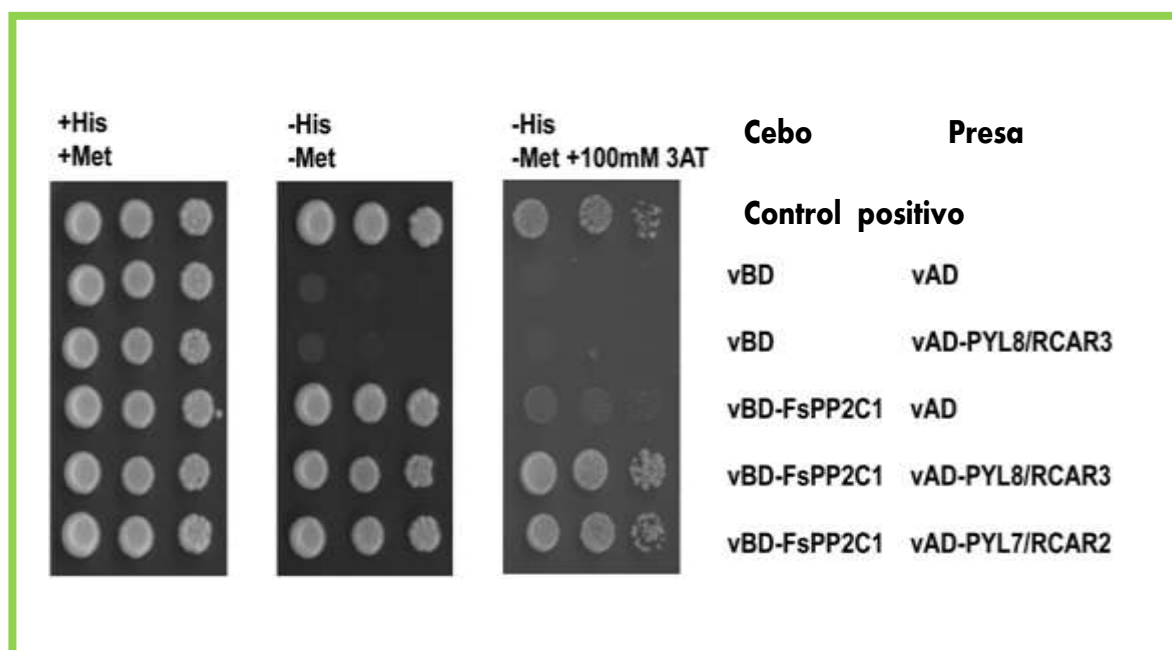
### 1.1 Ensayos de doble híbrido en levadura.

En anteriores estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación (O. Lorenzo Tesis D, 2000); (M.P González Tesis D, 2005), se han aislado y caracterizado varios clones de cDNA regulados por ABA. En concreto, una proteína-fosfatasa de tipo 2C, FsPP2C1, que es inducida por ABA, presenta un dominio catalítico con 11 subdominios conservados presentes en todas las PPs de tipo 2C y es específica de semillas (Lorenzo et al., 2001). Posteriormente, se realizó el análisis funcional de esta FsPP2C1 mediante su sobreexpresión en *Arabidopsis*, demostrando que FsPP2C1 actuaría como un regulador negativo en la señalización del ABA en semillas (González-García et al., 2003.) Nuestros resultados sugieren que esta PP2C de haya, a pesar de ser una proteína extraña en los tejidos de *Arabidopsis*, posee al menos sus correspondientes componentes de señalización (sustrato, activador, o ambos) en esta planta modelo.

Para profundizar en el estudio de esta fosfatasa realizamos la búsqueda de proteínas que interactúan con FsPP2C1 (PP2C-IPs) en *Arabidopsis*, mediante ensayos de doble híbrido en levaduras, utilizando FsPP2C1 como cebo (Fig. R1). Como resultado, hemos identificado tres proteínas diferentes (PYL8/RCAR3, PYL7/RCAR2 y PP2C IP3-) las cuales muestran fuerte interacción con FsPP2C1 (Tabla R.1).

Dos de las PP2C-IPs están estrechamente relacionadas con los miembros de una familia de genes en *Arabidopsis*, es decir, At5g53160 (PYL8/RCAR3) y At4g01026 (PYL7/RCAR2) (Fig. R1). Fueron identificados cinco clones pertenecientes a la misma PYL8/RCAR3, explicando así una fuerte interacción.

## RESULTADOS



**Figura R.1.** Resultados obtenidos del ensayo de doble híbrido en levadura con FsPP2C1 de *Fagus sylvatica* mostrando la interacción conPYL8/RCAR3 y PYL7/RCAR2.

**Tabla.R.1** Proteínas que interactúan con FsPP2C1 obtenidas en el ensayo de doble híbrido en levadura.

Clon	Genoma Arabidopsis	Secuencia	Nº de clones
PYL8/RCAR3	At5g53160	-46.....691	5
PYL7/RCAR2	At5g01026	24.....556	1
PP2C-IP3	At2g23380(CLF)	6.....983	1

### 1.2 Aislamiento y caracterización del clon PYL8/RCAR3.

#### 1.2.1 Determinación del tamaño del clon y de su mRNA correspondiente.

Se seleccionó el clon PYL8/RCAR3, para llevar a cabo los estudios de esta Tesis Doctoral. Utilizando la base de datos del proyecto TAIR (The Arabidopsis

## RESULTADOS

Information Resource, [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)), se localizó la secuencia completa de este gen, que se corresponde con el locus At5g53160.

La pauta de lectura de la secuencia (5' y 3') se muestra en la fig. R.2. Las secuencias de color negro de la parte superior e inferior se corresponden con las regiones, 5' y 3' no codificantes, respectivamente y que presentan 308 y 264 nucleótidos. Por su parte, la secuencia de color rojo pertenece a la región codificante que presenta 564 nucleótidos (Fig. R2.A).

El siguiente paso realizado fue traducir la secuencia proteica de este gen, utilizando los servicios bioinformáticas prestados por el sistema EXPASY (Expert Protein Analysis System), del "Swiss Institute of Bioinformatics" ([www.expasy.ch](http://www.expasy.ch)) (Fig.R2B).

A)

```
1 TTTGTTGGAG GATTTCGTCTC TCTCTCTCTC TCTTTCTCTT TCTCTCATCT
51 TCTTCTTATC TCCCTCCAAA GACGGCGACT GTATAATCTA TCATTTCTTC
101 ACAGTAACGC TTTCATCGGA AGATCTCGCC GGAAAAAAAC TTCTCTCTGA
151 GATCAGATCT CTTACGATTC TCAGCTCAAT CTTATCTTTT CCTTTGTTGT
201 GCTGCTTTTC ACTCTCTTCT GCGCGACGAA TTTGGCCTTG TTTTGTGTTT
251 GTTTGTGCGT TCCGACGCGG AGGTATTGAG AAACCGTGGC TTAAGACGGA
301 GGAAGAAGAT GGAAGCTAAC GGGATTGAGA ACTTGACGAA TCCGAATCAG
351 GAAAGAGAGT TTATAAGGAG ACATCATAAG CATGAGCTTG TGGATAATCA
401 GTGTAGCTCT ACGCTTGTTA AACATATCAA CGCTCCTGTT CATATTGTAA
451 GCTTCTCCCT TCTTCTTCTT CCTTCATGCG CTCTGATTTT CTCTGTTTAA
501 GTTAATCGGT TCTTCTTATT GTTGATTCAA TCCAGAATTT GAAATCTCTC
551 TCTATTTTCA TCGATTGTTG ATCTTACTGA TGAAGAATCG ATTTGTTTCT
601 AATTATTGAA AGCTTACATA GCATTTGTGT AATCCCAATC TGAGTTTGT
651 TGATCTGGTT TTGCTTTATT GGAAAAAAA GCTCCCAAAA ACGCTTATGG
701 ATTAGTTTGA ATCTCTCTGG TGAATAGGTG TGGTCACTTG TGAGAAGATT
751 TGATCAGCCA CAGAAGTATA AGCCGTTTAT CAGTAGATGT GTGGTGAAAG
801 GAAACATGGA GATTGGTACA GTAAGAGAAG TTGATGTGAA ATCTGGACTA
851 CCAGCAACTA GAAGCACTGA GAGATTGGAG TTACTTGATG ACAATGAGCA
901 TATTCTCAGT ATCAGAATCG TTGGTGGTGA TCATAGACTT AAGGTAATCA
951 ATGAATCAA AGGTTCGTTT TCTGTTTACA GTGAATCAA GACTTATATG
1001 TTCTATATTG TTTTGGATT TAGAACTATT CTTCAATCAT CTCTCTTCAC
1051 CCCGAGACTA TAGAAGGAAG AATAGGAACA CTTGTGATTG AGTCATTTGT
1101 GGTTGATGTA CCAGAAGGAA ACACAAAGGA TGAGACTTGT TACTTTGTTG
1151 AAGCTTTAAT CAAATGCAAT CTTAAATCTT TAGCTGATAT CTCTGAACGT
1201 CTTGCGGTTT AAGACACGAC AGAATCGAGA GCTTAAAGAT CAAAGGAGTA
1251 AGAACTATT GAATCAGAGA GATTTTGGTT GCCATGGATG AAGCTCTCAA
1301 AGGGAAAAAG AGAGAGTGGG TGAGTTTCTT TGAGGATGGA CAAGGCAAAA
1351 AAAGTATCAT CATTATCCA GTTACATAAT AAGTTTCTCA TTTGCTATTT
1401 TTGGGGTCAT TTCACTTTCA AACCTCTTT TTAATTTTCA GTGTCTAATT
1451 TAATGAATGT GTTTTGGTT TCTTCTCTAT AGAACCAAAA TATGATTTG
1501 GAGTTTAGCT TTAGCAACTT GCAGGAATCT TTTTACAATT TGC
```

**B)**

```

1 MEANGIENLT NPNQEREFIR RHHKHELVDN QCSSTLVKHI NAPVHIVWSL
51 VRRFDQPQKY KPFISRCVVK GNMEIGTVRE VDVKSGLPAT RSTERLELLD
101 DNEHILSIRI VGGDHRLKNY SSIISLHPET IEGRIGTLVI ESFVWDVPEG
151 NTKDETCYFV EALIKCNLKS LADISERLAV QDTTESRV
    
```

**Figura R.2. A** Análisis de la secuencia nucleotídica de *PYL8/RCAR3*. Secuencia en sentido 5'-3' del gen At5g53160. Se representa en negro las regiones no codificantes, en rojo y mayúsculas la región codificante y minúsculas los intrones y encuadrados en amarillo las regiones de inicio y fin de la traducción. **B** Análisis de la secuencia aminoacídica de la proteína *PYL8/RCAR3*.

Para amplificar mediante PCR y obtener la zona codificante del gen diseñamos parejas de oligonucleótidos. La fig. R.3 muestra la posición, secuencia y orientación de cada uno de los oligonucleótidos utilizados. Con esta pareja de oligonucleótidos se amplificó mediante PCR el fragmento de DNA, siendo secuenciado y confirmando así su identidad para seguir los estudios.

PP2C-IPF1 5' -**TCT AGA** TTT GTT TGT TTG TCG TAT CC-3' *Xba*I

PP2C-IPR1 5'- **GAG CTC AAA** GCT AAA CTC CAA AAT CA-3' *Sac*I

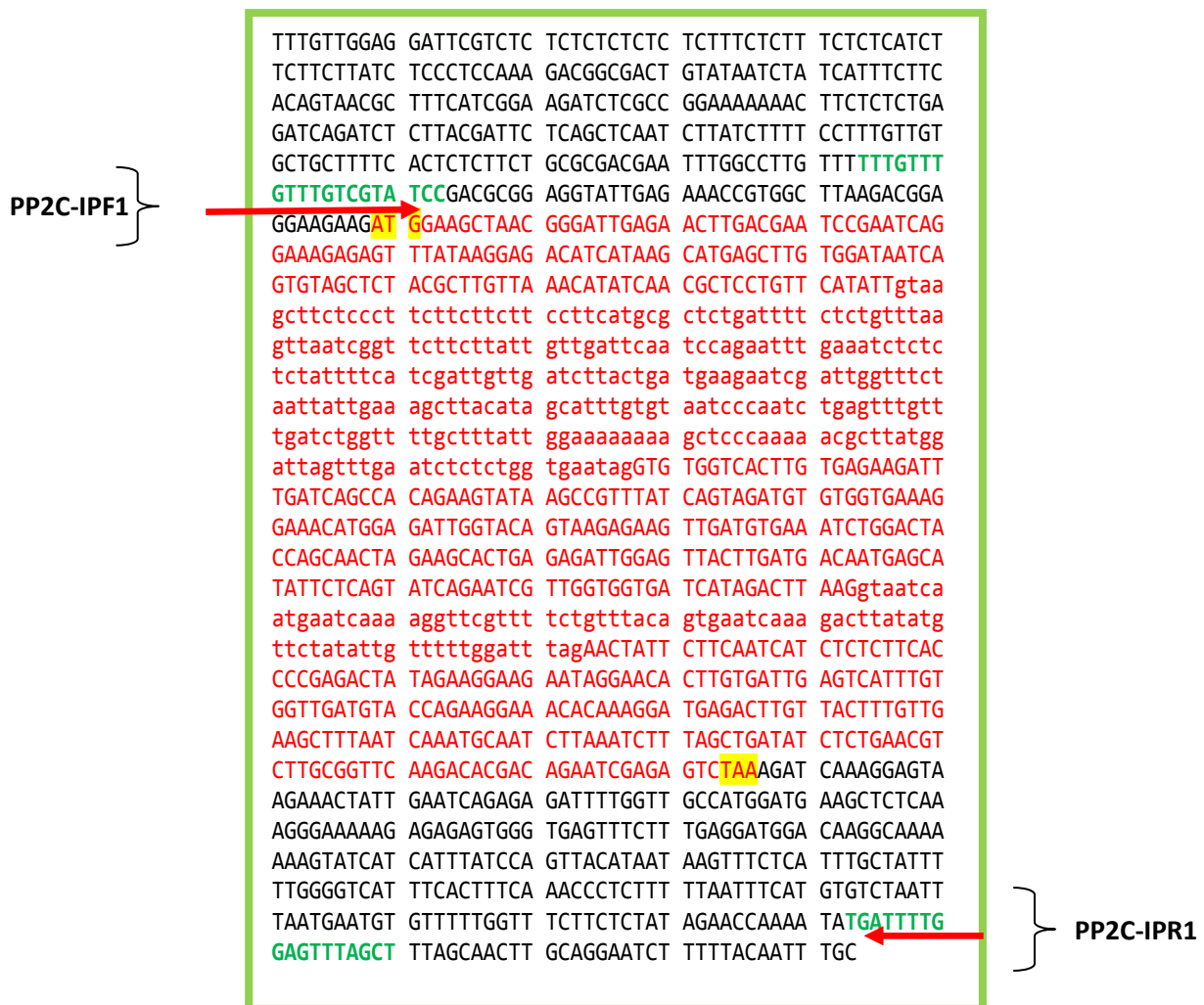
### 1.2.2 Estudio comparativo de *PYL8/RCAR3* con otras proteínas.

Haciendo uso de la herramienta de alineamiento BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) que nos permite observar si esta secuencia esta conservada en otros organismos, y hasta qué punto, hemos podido conocer si otros organismos, solamente de aquellos que se disponga información, poseen un gen similar a *PYL8/RCAR3*.

Debido a la degeneración del código genético principalmente, es más preciso y útil realizar un BLAST con la secuencia proteica, así se evitarán problemas como la duplicidad de clones en genotecas distintas, que podrían dar lugar a conclusiones



erróneas. La consulta reveló una alta similitud con la familia recientemente identificada PYR1-PYL/RCAR (Ma et al., 2009; Park et al., 2009b), compuesta por 14 miembros. Todos los miembros codifican proteínas pequeñas, que oscilan entre 165 y 221 aminoácidos (aproximadamente 20 kD), y se caracterizan por la presencia del dominio BetV I, con buen estado de conservación en muchos miembros de la familia (Fig. R.4), para esto se utilizó la base de datos InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>).



**Figura R.3.** Secuencia nucleotídica de At5g53160, donde se muestra la posición y secuencia de los oligonucleótidos utilizados.

## RESULTADOS

sp	Q9FGM1	PYL8_ARATH	Abscisic acid receptor PYL8 (PYR1-like prot...	378	e-103
tr	B9RIL1	_RICCO	Putative uncharacterized protein [RCOM_1580370] ...	302	1e-80
tr	Q5DQ85	_CAPAN	CAPIP1 [CAPIP1] [Capsicum annuum (Bell pepper)]	298	1e-79
tr	Q308B1	_SOLTU	CAPIP1-like [Solanum tuberosum (Potato)]	298	1e-79
tr	A4ZCW0	_CAPAN	PIP1 [PIP1] [Capsicum annuum (Bell pepper)]	298	1e-79
tr	B9I552	_POPTR	Predicted protein [POPTRDRAFT_569493] [Populus t...	298	2e-79
tr	B9IDY0	_POPTR	Predicted protein [POPTRDRAFT_824546] [Populus t...	298	2e-79
tr	B7FMM1	_MEDTR	Putative uncharacterized protein [Medicago trunc...	296	9e-79
tr	B7FGS9	_MEDTR	Putative uncharacterized protein [Medicago trunc...	294	3e-78
tr	B9GXH5	_POPTR	Predicted protein [POPTRDRAFT_830866] [Populus t...	291	2e-77
tr	B9GL69	_POPTR	Predicted protein [POPTRDRAFT_640369] [Populus t...	290	5e-77
tr	Q6EN42	_ORYSJ	Bet v I allergen-like (Os02g0255500 protein) (cd...	289	8e-77
tr	A2X334	_ORYSI	Polyketide cyclase (Putative uncharacterized pro...	289	8e-77
tr	C6T2R7	_SOYBN	Putative uncharacterized protein [Glycine max (S...	287	3e-76
tr	B9SBK0	_RICCO	Putative uncharacterized protein [RCOM_0719410] ...	287	3e-76
tr	B7FMG9	_MEDTR	Putative uncharacterized protein [Medicago trunc...	285	1e-75
tr	D0AB49	_ORYSI	Polyketide cyclase [pcyc] [Oryza sativa subsp. i...	285	2e-75
tr	A9P7Y8	_POPTR	Putative uncharacterized protein [Populus tricho...	285	2e-75
tr	A5HV16	_ARASU	Putative uncharacterized protein [Arabidopsis su...	284	3e-75
tr	B9I8W7	_POPTR	Predicted protein [POPTRDRAFT_664102] [Populus t...	283	6e-75
tr	B9GR01	_POPTR	Predicted protein [POPTRDRAFT_816630] [Populus t...	283	6e-75
tr	A9PJF2	_9ROSI	Putative uncharacterized protein [Populus tricho...	283	6e-75
tr	A3A567	_ORYSJ	Putative uncharacterized protein [OsJ_06125] [Or...	283	6e-75
tr	B5LNQ2	_ARAHY	Pathogenesis-induced protein [PIP] [Arachis hypo...	283	8e-75
tr	C5XZF6	_SORBI	Putative uncharacterized protein Sb04g009280 [Sb...	281	2e-74
tr	B4FVL9	_MAIZE	AT-rich element binding factor 3 (Putative uncha...	281	2e-74
tr	C6S2Y8	_SOYBN	Putative uncharacterized protein [Glycine max (S...	281	3e-74
tr	B9RCR6	_RICCO	Putative uncharacterized protein [RCOM_1691820] ...	281	3e-74
tr	Q5MJ53	_PEA	AT-rich element binding factor 3 [ATF3] [Pisum sat...	280	4e-74
sp	Q84MC7	PYL9_ARATH	Abscisic acid receptor PYL9 (PYR1-like prot...	279	9e-74
tr	C6THA8	_SOYBN	Putative uncharacterized protein [Glycine max (S...	278	1e-73
sp	Q8H1R0	PYL10_ARATH	Abscisic acid receptor PYL10 (PYR1-like pr...	277	3e-73
tr	B6TQK3	_MAIZE	AT-rich element binding factor 3 [Zea mays (Maize)]	273	5e-72
tr	B4FD84	_MAIZE	Putative uncharacterized protein [Zea mays (Maize)]	273	5e-72
tr	D0AB48	_ORYSI	Polyketide cyclase [pcyc] [Oryza sativa subsp. i...	273	8e-72
tr	A5AL88	_VITVI	Putative uncharacterized protein [VITISV_029498]...	271	3e-71
tr	Q6I5C3	_ORYSJ	Os05g0213500 protein (Putative uncharacterized p...	269	9e-71
tr	B8A274	_ORYSI	Putative uncharacterized protein [OsI_18892] [Or...	269	9e-71
tr	B5M1Y8	_RHEAU	Pathogen-induced protein-like protein [Rheum aus...	269	9e-71
tr	A9NSZ1	_PICSI	Putative uncharacterized protein [Picea sitchens...	268	2e-70
sp	Q1ECF1	PYL7_ARATH	Abscisic acid receptor PYL7 (PYR1-like prot...	264	3e-69
tr	C5YUR3	_SORBI	Putative uncharacterized protein Sb09g006700 [Sb...	261	2e-68
tr	B6TC93	_MAIZE	CAPIP1 [Zea mays (Maize)]	261	2e-68
tr	B6SMD9	_MAIZE	CAPIP1 (Putative uncharacterized protein) [Zea m...	261	2e-68
tr	A5AR38	_VITVI	Putative uncharacterized protein [VITISV_004915]...	261	3e-68
tr	B4FSI0	_MAIZE	CAPIP1 (Putative uncharacterized protein) [Zea m...	260	4e-68
tr	B9FN40	_ORYSJ	Putative uncharacterized protein [OsJ_17548] [Or...	259	7e-68
tr	B8A2B9	_MAIZE	Putative uncharacterized protein [Zea mays (Maize)]	251	3e-65
tr	Q3E8C1	_ARATH	Putative uncharacterized protein At5g53160.1 [At...	243	7e-63
tr	A2YDM7	_ORYSI	Putative uncharacterized protein [OsI_23215] [Or...	236	8e-61
tr	Q652Y8	_ORYSJ	Bet v I allergen-like (Os06g0527800 protein) (Pu...	235	1e-60
tr	Q5Z7A8	_ORYSJ	Bet v I allergen-like (Os06g0528300 protein) (Pu...	234	2e-60
tr	A2YDN0	_ORYSI	Putative uncharacterized protein [OsI_23218] [Or...	231	2e-59
tr	B9FTJ8	_ORYSJ	Putative uncharacterized protein [OsJ_21539] [Or...	210	6e-53
tr	A9S6X3	_PHYPA	Predicted protein [PHYPADRAFT_209242] [Physcomit...	200	5e-50
tr	A9NQM9	_PICSI	Putative uncharacterized protein [Picea sitchens...	199	1e-49
tr	Q6EN43	_ORYSJ	Bet v I allergen-like [OSJNBA0052K15.17] [Oryza ...	197	4e-49
tr	B9F4U9	_ORYSJ	Putative uncharacterized protein [OsJ_06123] [Or...	197	4e-49
tr	B8AF92	_ORYSI	Putative uncharacterized protein [OsI_06615] [Or...	194	5e-48
tr	A9THF2	_PHYPA	Predicted protein (Fragment) [PHYPADRAFT_222359]...	192	2e-47
tr	B9SL06	_RICCO	Putative uncharacterized protein [RCOM_0847730] ...	190	5e-47
tr	Q53HY7	_TOBAC	Putative uncharacterized protein c17 [c17] [Nico...	187	4e-46

**Figura R.4.** Comparación de la secuencia aminoacídica de PYL8/RCAR3, en distintas especies vegetales mediante BLAST.

La secuencia de nucleótidos del clon *PYL8/RCAR3* y su correspondiente traducción en aminoácidos, fueron enviadas a la base de datos disponibles (GENENML y SWISSPROT) para encontrar otros genes y proteínas ya descritos que presentaran secuencias similares. La comparación con todas las secuencia incluídas en estas bases, reveló la existencia de homología con secuencias aminoacídicas que codifican *PYL8/RCAR3* de diversas especies vegetales.

### 1.2.3 Relación filogenética de *PYL8/RCAR3* con otras proteínas vegetales.

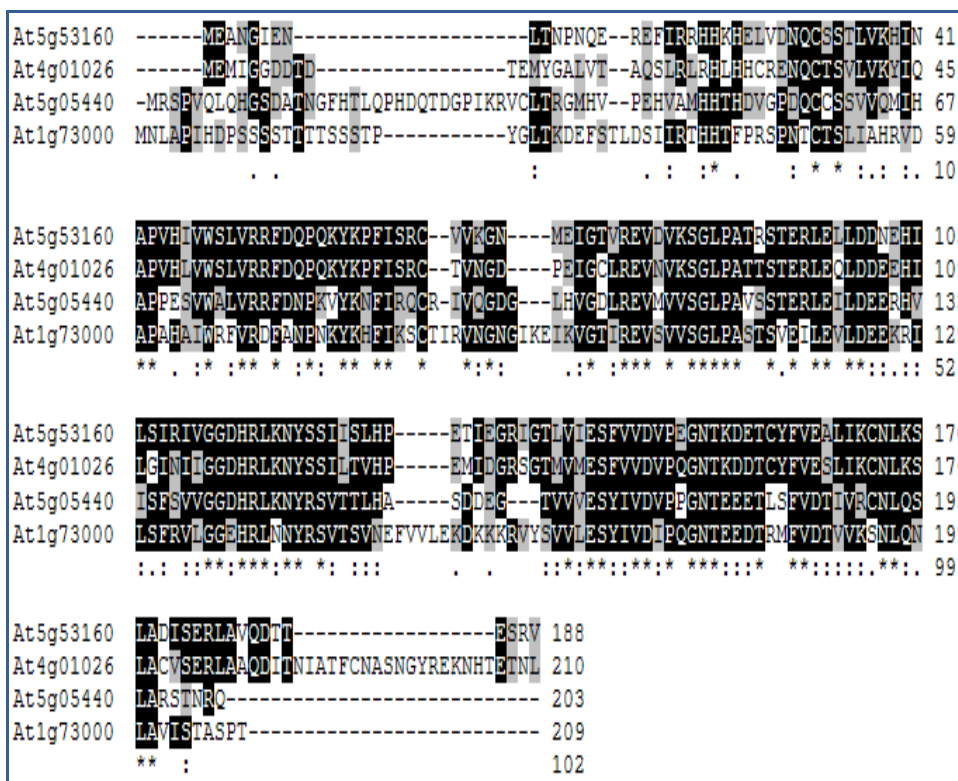
La relación filogenética entre *PYL8/RCAR3* y otras proteínas estrechamente relacionadas de la familia *PYR1-PYL/RCARs* se muestra en la Figura R5. El árbol filogenético se construyó utilizando los 14 miembros *PYR1-PYL/RCARs* de *Arabidopsis* y sus ortólogos, tanto en plantas superiores como inferiores (*Physcomitrella patens*, *Selaginella moellendorffii*, *Populus trichocarpa*, *Vitis vinifera*, *Oryza sativa*, Fig. R5 y Tabla R.2). El árbol filogenético revela la presencia de antiguos eventos de duplicación génica que son anteriores a la especiación de las dicotiledóneas, monocotiledóneas y musgos, y que conduce a los seis clados distintos (Figura R5). Los datos disponibles a partir de proyectos de secuenciación recientes han puesto de manifiesto la conservación de las *PYR1-PYL/RCAR* en el musgo (*P. patens*) y en el helecho (*S. moellendorffii*). Se distinguen diferentes subgrupos *PYR1-PYL/RCAR* y las proteínas de todas las especies vegetales analizadas están presentes en al menos un subgrupo, lo que sugiere la probable existencia de ortólogos en todos los genomas considerados, así como en el antepasado común de todas las especies examinadas. Uno de los clados contiene exclusivamente las secuencias de las plantas inferiores *P. patens* y *S. moellendorffii*, lo que sugiere que este linaje de plantas contiene una copia de proteínas BetV I con funciones especializadas. Además, tres clados pueden distinguirse claramente, que incluyen la mayoría de los *PYR1-PYL/RCARs* de plantas superiores, donde están presentes duplicaciones y otros dos clados que incluyen *Arabidopsis* y una o dos especies superiores.





**Tabla R.2.** Número de identificación de genes de la familia PYR1-PYL/RCAR en *Arabidopsis* y sus homólogos en diferentes plantas superiores e inferiores.

Nombre	Número de Gen
PYR1/RCAR11	AT4G17870
PYL1/RCAR12	AT5G46790
PYL2/RCAR14	AT2G26040
PYL3/RCAR13	AT1G73000
PYL4/RCAR10	AT2G38310
PYL5/RCAR8	AT5G05440
PYL6/RCAR9	AT2G40330
PYL7/RCAR2	AT4G01026
<b>PYL8/RCAR3</b>	<b>AT5G53160</b>
PYL9/RCAR1	AT1G01360
PYL10/RCAR4	AT4G27920
PYL11/RCAR5	AT5G45860
PYL12/RCAR6	AT5G45870
PYL13/RCAR7	AT4G18620
OsP2CPL1	Os02g15640
OsP2CPL2	Os05g12260
OsP2CPL3	Os02g15620
OsP2CPL4	Os06g33640
OsP2CPL5	Os06g33690
OsP2CPL6	Os03g18600
OsP2CPL7	Os01g61210
OsP2CPL8	Os05g39580
OsP2CPL9	Os10g42280
OsP2CPL10	Os02g13330
OsP2CPL11	Os06g36670
PpP2CPL1	213389
PpP2CPL2	132509
PpP2CPL3	222359
PpP2CPL4	209242
PtP2CPL1	824546
PtP2CPL2	569493
PtP2CPL3	664102
PtP2CPL4	816630
PtP2CPL5	830866
PtP2CPL6	640369
PtP2CPL7	257966
PtP2CPL8	427282
PtP2CPL9	430202
PtP2CPL10	226903
PtP2CPL11	590008
PtP2CPL12	783700
PtP2CPL13	260339
PtP2CPL14	427058
SmP2CPL1	117026
SmP2CPL2	80077
SmP2CPL3	231224
SmP2CPL4	58736
SmP2CPL5	135818
VvP2CPL1	GSMVT0000650 7001
VvP2CPL2	GSMVT0002700 9001
VvP2CPL3	GSMVT0000244



**Figura R.6.** Alineamiento de la proteína PYL8/RCAR3 con otros miembros de la familia PYR1-PYL/RCARs en *Arabidopsis thaliana*.

**1.2.4 Caracterización de la proteína deducida de la secuencia nucleotídica.**

La proteína deducida de la secuencia nucleotídica consta de 564 aminoácidos, con un peso molecular de 21.3 kDa y un punto isoeléctrico de 6.34 (Tab.R.3A y B)

**Tabla R.3 A)** Características de la proteína **B)** composición aminoacídica de la proteína deducida de la secuencia nucleotídica del clon PYL8/RCAR3.

A)

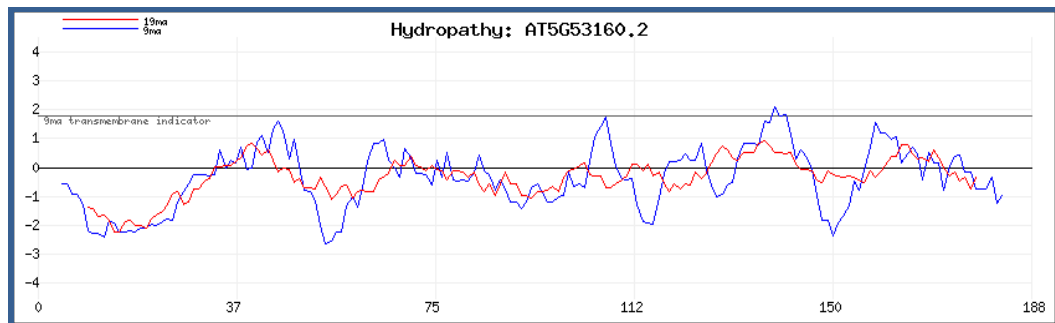
Características de la Proteína	
Peso Molecular ( Da)	2139,36 m.w
Longitud (aminoácidos)	188
Punto Isoeléctrico	6,34
Carga a pH 7	-2,84

**B)**

Aminoácidos	Número	% Peso	% Frecuencia
Cargados (RKHYCDE)	67	41.79	35.64
Ácidos (DE)	28	16.24	14.89
Básicos (KR)	24	16.21	12.77
Polares (NCQSTY)	48	23.97	25.53
Hidrofóbicos (AILFWV)	62	31.57	32.98
A Ala	6	1.99	3.19
C Cys	4	1.93	2.13
D Asp	40	5.38	5.32
E Glu	48	10.86	9.57
F Phe	5	3.44	2.66
G Gly	9	2.40	4.79
H His	8	5.13	4.26
I Ile	16	8.46	8.51
K Lys	10	5.99	5.32
L Leu	16	8.46	8.51
M Met	2	1.23	1.06
N Asn	11	5.87	5.85
P Pro	7	3.18	3.72
Q Gln	5	2.99	2.66
R Arg	14	10.22	7.45
S Ser	14	5.70	7.45
T Thr	11	5.20	5.85
V Val	18	8.34	9.57
W Trp	1	0.87	0.53
Y Tyr	3	2.29	1.6

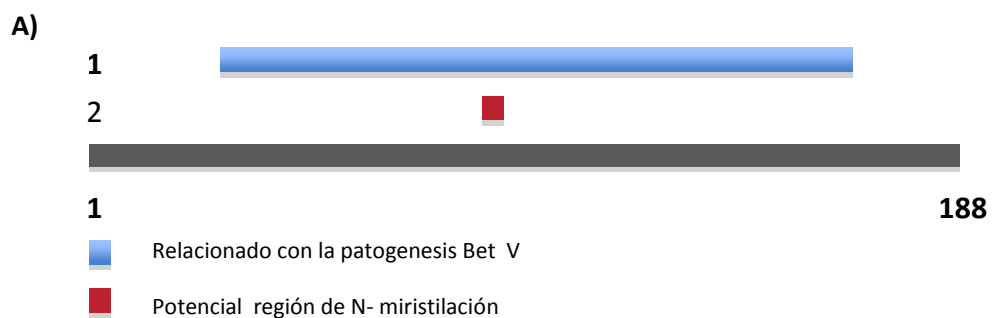
Cabe resaltar la gran cantidad de aminoácidos cargados (35.64%) e hidrofóbicos (32.98%), aunque no se destaca la presencia de ningún aminoácido predominante. Cuando se estudia el perfil hidropático de esta proteína, obtenido según el algoritmo de Kyte y Doolittle (Fig. R.7), se puede observar una alternancia de zonas hidrofóbicas y hidrofílicas, sin que haya un predominio claro de ninguna de ellas.

# RESULTADOS



**Figura R.7.** Perfil hidropático correspondiente a la secuencia de aminoácidos del clon PYL8/RCAR3.

El análisis de la secuencia en la base de datos (<http://Plants.genomics.purdue.edu/html/>) reveló la presencia de dominios funcionales en la proteína (Fig. R8), como el dominio relacionado con la patogénesis, Bet V I.



**B)**

1MEANGIENLT NPNQREFIR RHHKHELVDN QCSSTLVKHI NAPVHIVWSL VRRFDQPQKY  
 61KPFISRVCVK GNMEIGTVRE VDKSGLPAT RSTERLELLD DNEHILSIRI VGGDHLKNY  
 121SSIISLHPET IEGRIGTLVI ESFVVDVPEG NTKDETCYFV EALIKCNLKS LADISERLAV  
 181QDTTESRV

**Figura R.8 A)** Dominios funcionales de PYL8/RCAR3 **B)** Secuencia aminoácida de PYL8/RCAR3 donde se indican con colores los distintos dominios funcionales.



### 1.3 Comprobación de la interacción *in planta* mediante BiFC.

Para confirmar la interacción entre FsPP2C1 y PYL8/RCAR3 realizamos ensayos de complementación bimolecular fluorescente (BiFC), como técnica de interacción *in planta*. Para ello, generamos construcciones fusionando a la FsPP2C1 la región C-terminal de 84 aminoácidos de la proteína fluorescente amarilla (YFPC) en el vector pYFPC43 (derivado de pMDC43; Curtis y Grossniklaus, 2003), que genera una proteína de fusión YFPC-FsPP2C1 (Fig. R9). Por otra parte, PYL8/RCAR3 (At5g53160), se fusionó a la región N-terminal de 155 aminoácidos de la proteína fluorescente amarilla (YFPN) en el vector pYFPN43, lo que generó la quimera YFPN-PYL8/RCAR3 (Fig. R9). Estas construcciones se expresaron de manera transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana*, transformadas mediante infiltración con *Agrobacterium tumefaciens*.

Como resultado observamos la imagen de microscopia confocal (Fig. R.10), donde la distribución de la fluorescencia confirmó la interacción entre las proteínas FsPP2C1 y PYL8/RCAR3. Del mismo modo, pudimos demostrar que la interacción se localiza específicamente en el núcleo celular. Resultados similares se obtuvieron cuando otro miembro de la familia PYR1-PYL/RCAR la proteína PYL5/RCAR8 (At5g05440), se utilizó también en los ensayos de BiFC (Fig. R.9), mostrando la especificidad de la interacción de FsPP2C1 con la familia PYL/RCAR.

Además, se corroboró la interacción con otros miembros de PP2Cs del cluster A de Arabidopsis mediante el análisis de la interacción entre PYL8/RCAR3 y HAB1.

HAB1 es uno de los ortólogos de FsPP2C1. Por lo tanto, utilizamos HAB1 y su versión mutada hab1G246D, correspondiente a la misma mutación encontrada en los mutantes dominantes *abi1-1* y *abi2-1*. Conviene resaltar que hemos sido capaces de demostrar también la interacción entre PYL8/RCAR3 y HAB1, mientras que la mutación hab1G246D es capaz de impedir dicha interacción (Fig. R.11).

## RESULTADOS

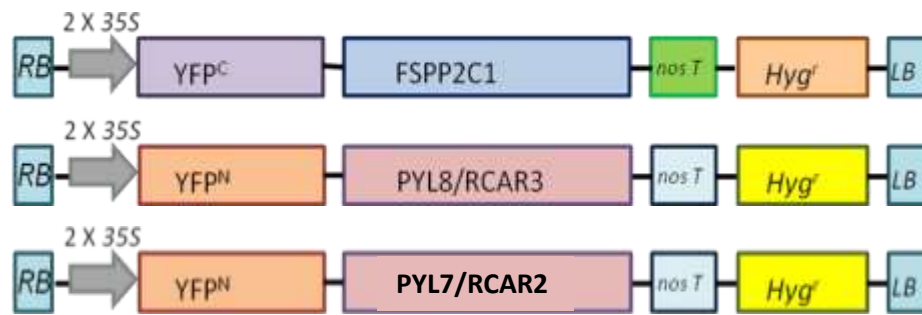
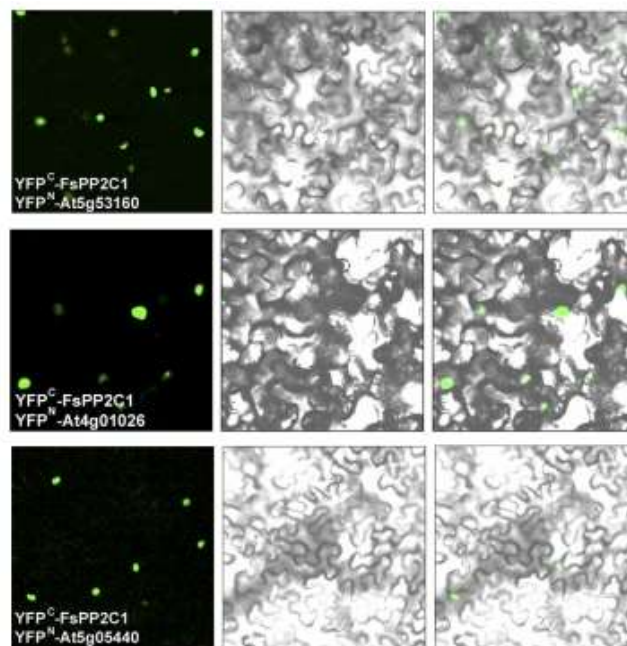


Figura R.9. Construcciones realizadas: YFPc-FSP2C1, YFPn-PYL8/RCAR3 y YFPn-PYL7/RCAR2.

A)



B)

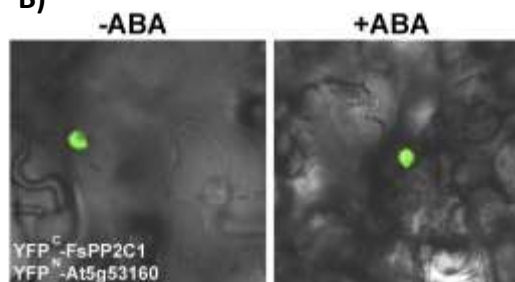
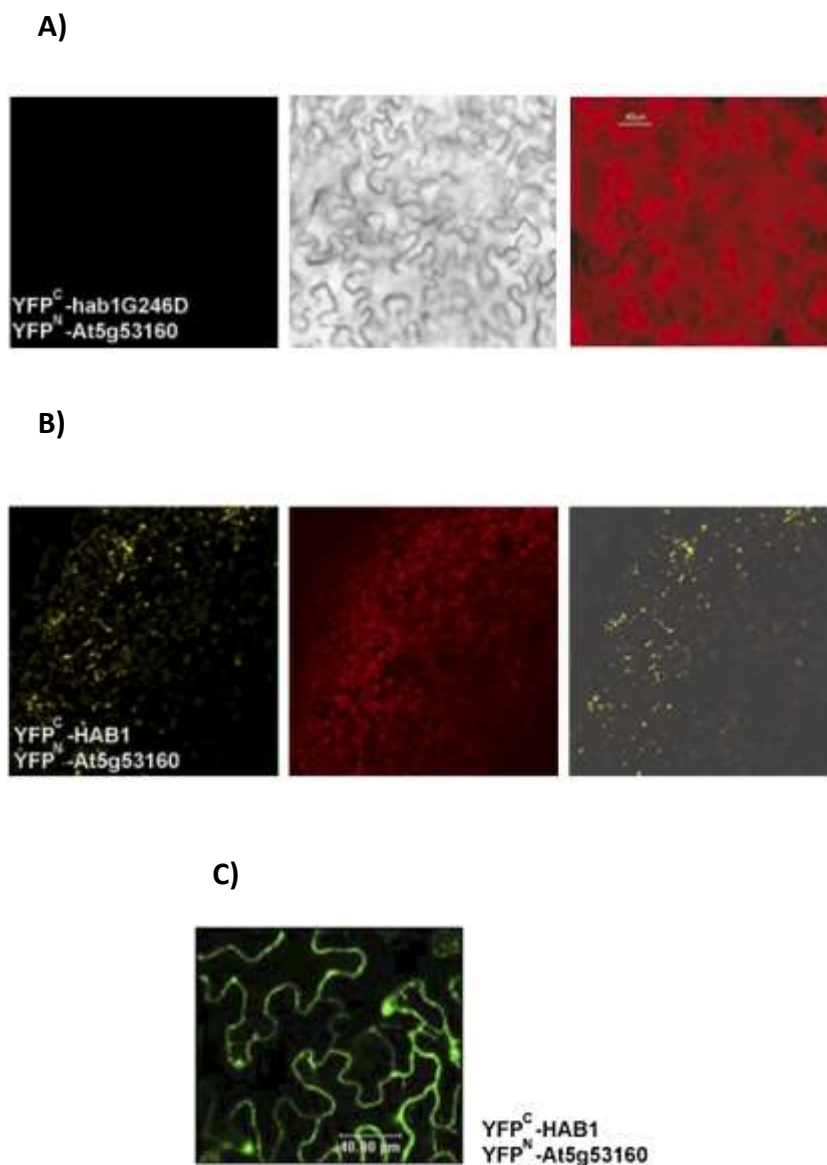


Figura R.10. A) Imágenes de microscopía confocal, donde se muestra la interacción proteína-proteína mediante ensayos BiFC. Las interacciones entre YFPn-At5g53160 y YFPc-FsPP2C1 (arriba), YFPn At4g01026 y YFPc-FsPP2C1 (centro), y YFPn At5g05440 y YFPc-FsPP2C1 (abajo). B) Localización de la interacción FsPP2C1-At5g53160 en el núcleo, en ausencia y en presencia de ABA.



**Figura R.11.** Localización subcelular de la proteína HAB1 de Arabidopsis y PYL8/RACR3. **A)** Imágenes de microscopía confocal, donde no se observa interacción entre YFP<sup>C</sup>-hab1G246D y YFP<sup>N</sup>-At5g53160 **B)** Imagen donde se muestra la interacción entre la proteína YFP<sup>N</sup>-At5g53160 y YFP<sup>C</sup>-HAB1. **C)** Localización de la interacción de YFP<sup>N</sup>-At5g53160 y YFP<sup>C</sup>-HAB1.

## 1.4 Expresión del clon *PYL8/RCAR3*.

### 1.4.1 Estudio *in silico* de la expresión del clon *PYL8/RCAR3* durante la germinación y en respuesta a distintos tratamientos.

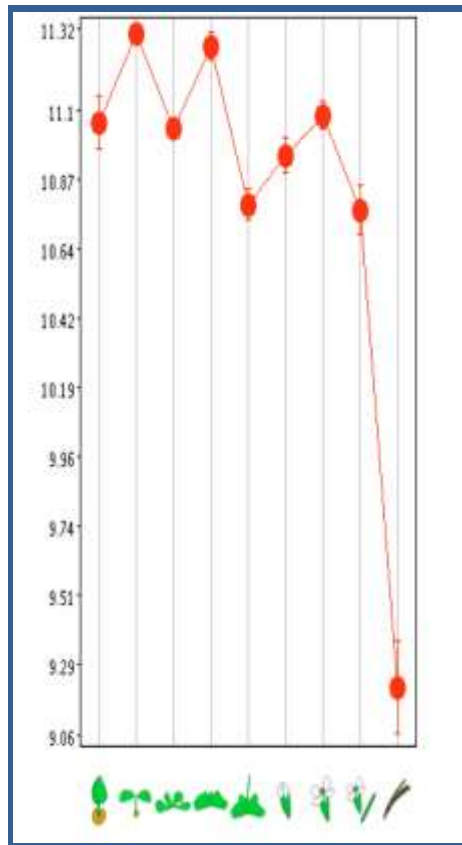
Para analizar la expresión de *PYL8/RCAR3* empleamos la base de datos

## RESULTADOS

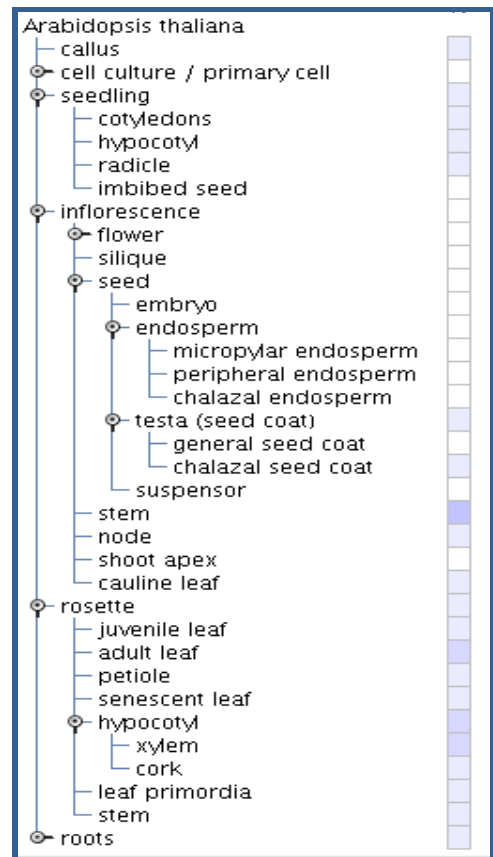
Genevestigator (<http://www.genevestigator.ethz.ch>; Zimmerman et al., 2004) que aglutina los resultados de decenas de “Microarrays” realizados con diferentes condiciones. En concreto, engloba un total de 31.460 experimentos de expresión en distintas situaciones. Al introducir el gen objeto de estudio, el motor de búsqueda del programa hace una compilación de todos los experimentos en los que aparece dicho gen y los clasifica según el tejido donde se exprese, o tras tratamientos de estrés.

En primer lugar, se obtuvieron los datos para los diferentes órganos de la planta (Fig. R.12).

A)



B)



**Figura R.12. (A y B) Niveles de expresión de *PYL8/RCAR3* en diferentes órganos de la planta. Una mayor intensidad en el color azul de las celdas indica una mayor expresión en el tejido indicado.**

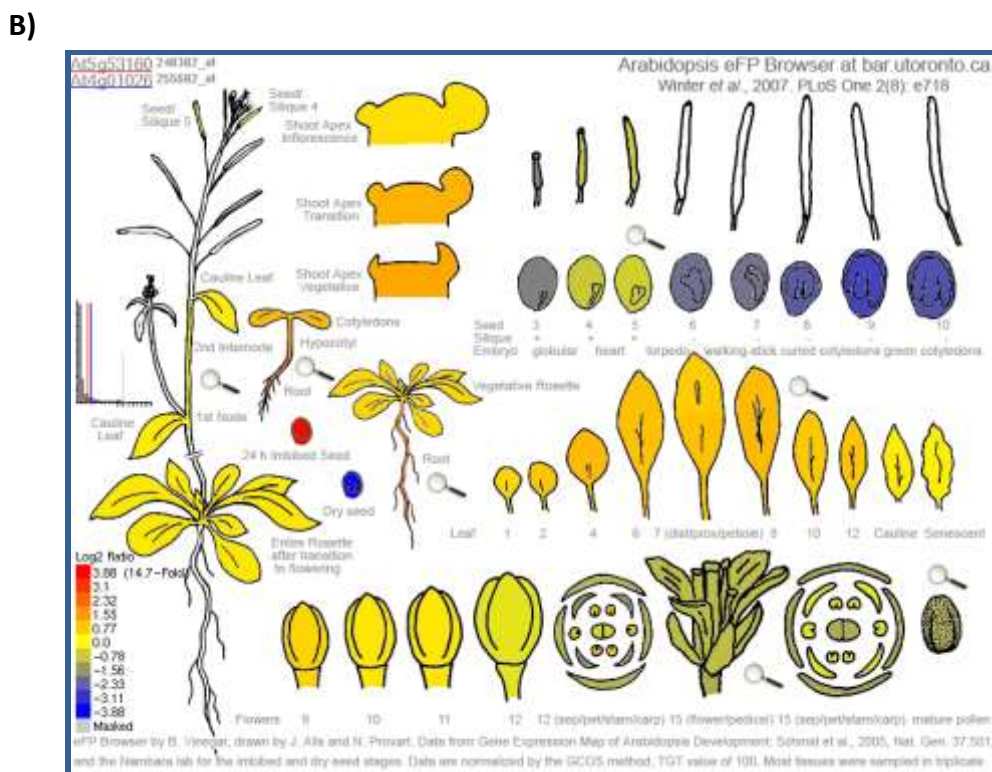
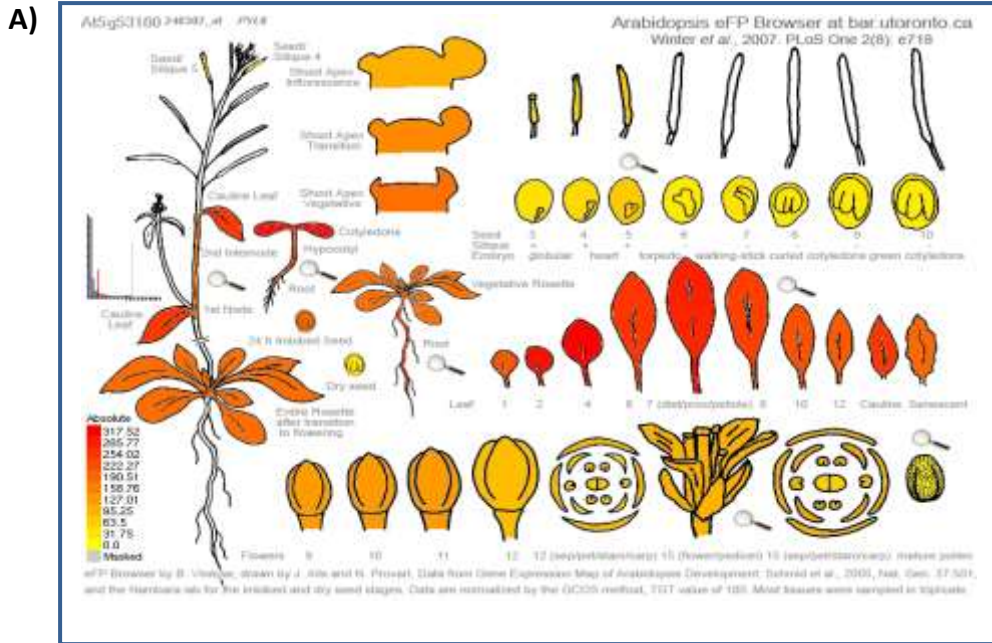
Se observa claramente una mayor expresión en la germinación y primeros estadios del desarrollo de la planta, decayendo a lo largo del ciclo de vida del vegetal. De aquí se puede deducir que este gen se expresa en órganos involucrados en la germinación.



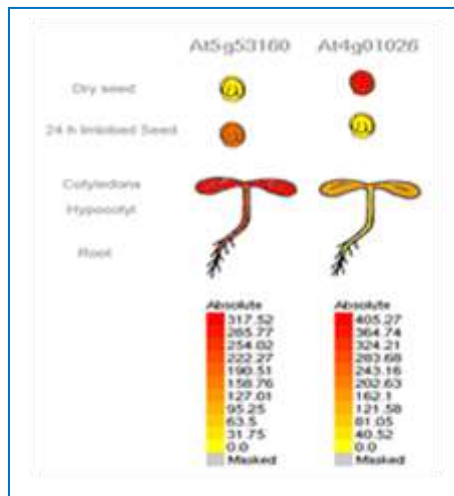


# RESULTADOS

e imbibidas), lo que puede indicar diferentes funciones para algunos miembros de esta nueva familia.



**Figura R.14. A)** Niveles de transcritos de *PYL8/RCAR3* (*At5g53160*) en diferentes tejidos de la planta **B)** Comparación de los niveles de transcritos de *PYL8* (*At5g53160*) vs. *PYL7* (*At4g01026*) en los diferentes tejidos de la planta, basados en datos obtenidos mediante el navegador eFP (<http://bar.utoronto.ca>).



**Figura R.15.** Representación pictográfica de la expresión de *PYL8* (At5g53160) y *PYL7* (At4g01026) en las semillas y plántulas ubicado en la base de datos BAR (<http://bar.utoronto.ca>).

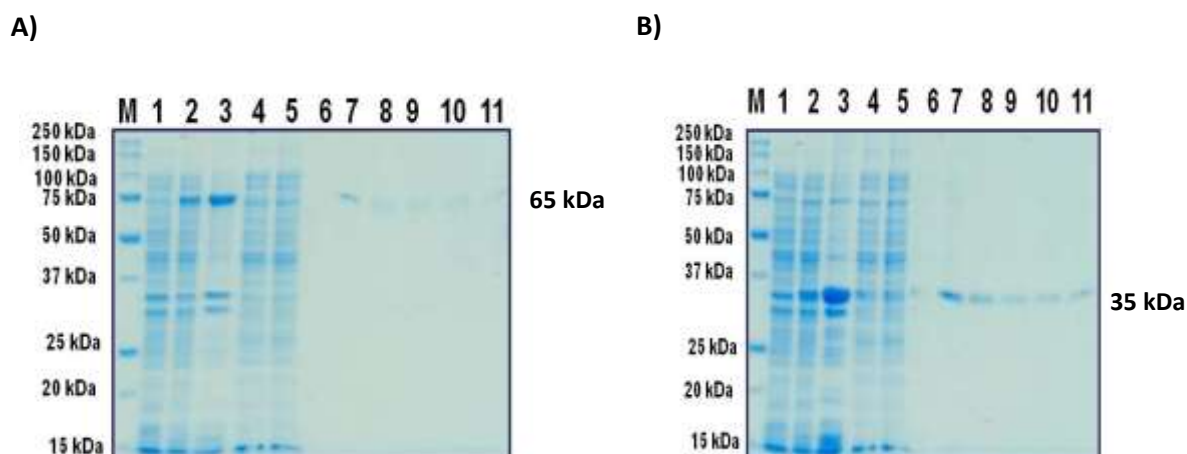
## 1.5 Expresión y actividad *in vitro* de las proteínas FsPP2C1 y PYL8/RCAR3.

Para comprobar si los clones *FsPP2C1* y *PYL8/RCAR3* realmente codifican proteínas funcionales, se procedió a su expresión en *E. coli*, purificación de las proteínas recombinantes sintetizadas y determinación de su actividad *in vitro*.

### 1.5.1. Expresión *in vitro* de las proteínas.

Las regiones codificantes de los clones de cDNA *PYL8/RCAR3* y *FsPP2C1* fueron expresadas en *E. coli* como proteínas de fusión utilizando el vector pALEX2b, que está diseñado para ser utilizado con el sistema CASCADE™ para la expresión y purificación de proteínas, y de esta forma medir posteriormente su actividad. (Fig. R.16).

En la fig. R.16 se presenta una electroforesis de las proteínas expresadas en *E. coli* después de la inducción con IPTG durante 1- 4 horas, se observa la aparición de una banda clara, con un peso molecular aproximada de 35kDa y 65kDa respectivamente.



**Figura R.16. A)** Expresión y purificación de la proteína FsPP2C1 **B)** Expresión y purificación de la proteína PYL8/RACR3 en *E. coli*.

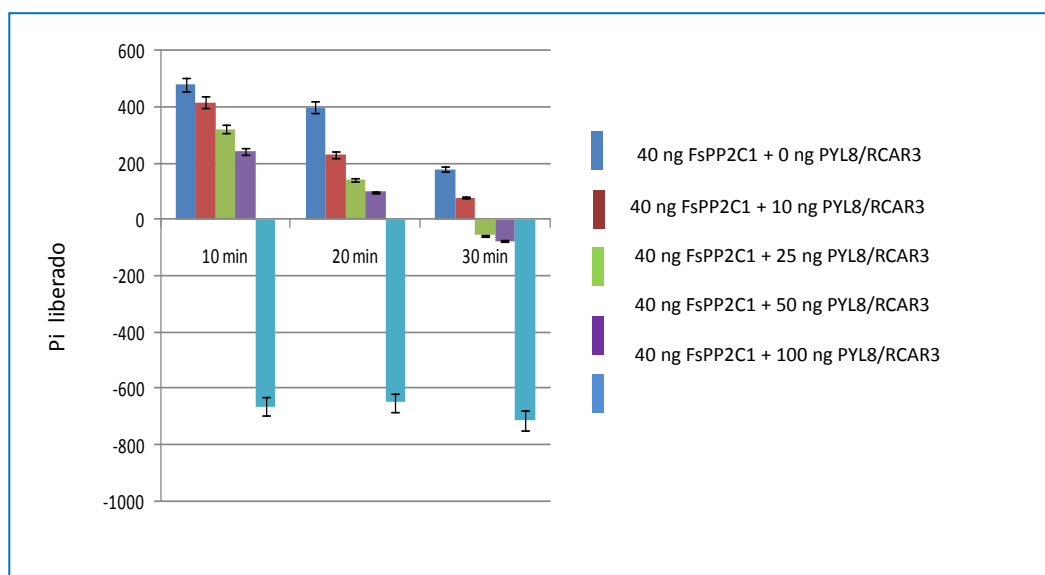
## 1.5.2 Determinación de la actividad proteín-fosfatasa *in vitro*.

Una vez que las proteínas de fusión habían sido expresadas, purificadas y renaturalizadas, se comprobó su funcionalidad mediante ensayos de actividad proteín-fosfatasa *in vitro*. La determinación de la actividad fosfatasa se realizó mediante ensayos de fluorescencia, para los que se utilizó el kit “SensoLyte FDP” que está optimizado para detectar la actividad utilizando 3,6 fluorescein bi phosphate como sustrato fluorogénico, el grado de hidrólisis se determina espectrofotométricamente. Protein Phosphatase Assay kit” (ANASPEC), la lectura se realizó en el lector de placas TECAN ULTRA EVOLUTION Ex/Em = 485±20 /528±20nm.

Las proteínas PYL8/RACR3 se adicionaron de manera creciente 0ng, 10 ng, 25 ng, 50 ng, 100 ng, y de la proteína FsPP2C1 40 ng. La lectura se realizó en 3 tiempos 10,20 y 30 minutos.

La adición de cantidades crecientes de la proteína PYL8/RACR3 inhibe la actividad fosfatasa de FsPP2C1 (Fig. R.17). En los ensayos de actividad se cuantifica la capacidad de la FsPP2C1 para liberar Pi. Estos resultados sugieren un posible papel de PYL8/RACR3 como inhibidor de la PP2C.





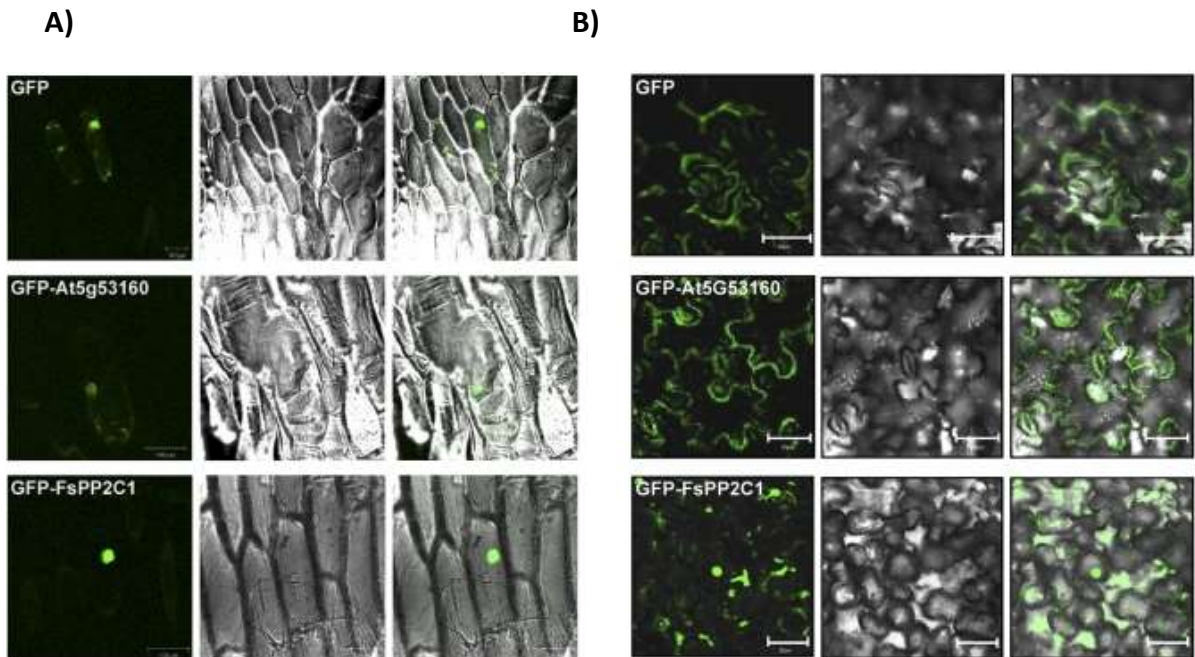
**Figura R.17.** Ensayo de actividad fosfatasa de FsPP2C1 y PYL8/RACR3, se muestra los resultados en tiempos de 10, 20 y 30 minutos.

## 1.6 Localización subcelular de las proteínas FsPP2C1 y PYL8/RCAR3.

La localización subcelular de las proteínas FsPP2C1 y PYL8/RCAR3 se determinó mediante bombardeo de partículas de oro. Para ello se generaron proteínas quiméricas fusionando el extremo N-terminal de las proteínas FsPP2C1 y PYL8/RCAR3 a la proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*) utilizando el vector pMD43, como se detalla en el apartado 9 de Materiales y Técnicas, y se expresaron de manera transitoria en células epidérmicas de cebolla por transformación.

El análisis del patrón de distribución de la fluorescencia mediante microscopía confocal (Fig R.18) confirmó la localización nuclear de la proteína FsPP2C1-GFP. La expresión transitoria de la construcción PYL8/RCAR3-GFP en las células epidérmicas de cebolla mostró el mismo patrón de expresión de las células transformadas únicamente con los vectores pMD43 en los que observamos que la

proteína GFP aparece en toda la célula, lo que demuestra que *PYL8/RCAR3* se localiza en citoplasma y el núcleo.



**Figura R.18.** Localización subcelular de *FsPP2C1* y *PYL8/RCAR3* (*At5g53160*) A) determinada de manera transitoria en células epidérmicas, se observa la localización nuclear y citosólica de ambas proteínas B) Análisis mediante agroinfiltración en hojas de tabaco, la localización que se observa tanto para *FsPP2C1* y *PYL8/RCAR3* es nuclear y citosólica.

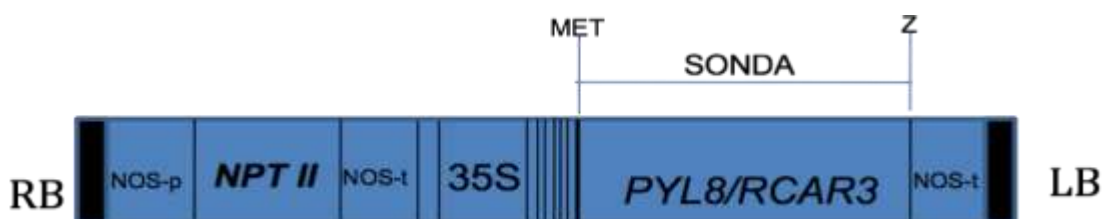
## 2. ANÁLISIS FUNCIONAL DE *PYL8/RCAR3* EN LA DORMICIÓN/GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y SU PAPEL EN LA SEÑALIZACIÓN DE ABA.

### 2.1 Generación de las líneas transgénicas *35:SPYL8/RCAR3*.

Para intentar comprender el papel que podía desempeñar la proteína *PYL8/RCAR3* en la dormición/germinación de semillas, se abordó la generación de plantas transgénicas de *A. thaliana*, para lo cual diseñamos la construcción que se muestra en la Fig. R.18. Teniendo en cuenta que *PYL8/RCAR3* pertenece a una familia de 14 miembros y que genes homólogos de la misma familia suelen presentar redundancia funcional en diferente grado, hemos optado por un enfoque de ganancia de la función. De esta forma, pretendemos aportar pruebas genéticas sobre la posible función del gen *PYL8/RCAR3* en la señalización del ABA, mediante la generación de líneas transgénicas *35S:PYL8/RCAR3*.

## RESULTADOS

El método de transformación de plantas de *A. thaliana* fue el de infiltración *in planta* (apartado 6.1.7 de Materiales y Técnicas). Las semillas transformadas (en las que *A. tumefaciens* ha introducido el T-DNA de las construcciones en pBIN121) se seleccionaron por su resistencia al antibiótico kanamicina conferida por el gen *NPT II* presente en el T-DNA. Las semillas recolectadas de las plantas infiltradas, se sembraron en placas de medio MS con kanamicina (50 µg/ml).



**Figura R.19.** Construcción usada para la transformación de plantas de *Arabidopsis*. RB, borde derecho del T-DNA; LB, borde izquierdo del T-DNA; 35S, promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor; *NPTII*, neomicina fosfotransferasa II; NOS-p, promotor NOS; NOS-t, terminador NOS. La región codificante del cDNA *PYL8/RCAR3* se obtuvo por PCR.

Las semillas no transformadas germinaron en presencia de kanamicina, pero dos días después de la germinación los cotiledones perdieron la pigmentación. Estas semillas no desarrollaron hojas primarias y se retrasó mucho el crecimiento de las raíces. Las semillas resistentes germinaron en presencia de kanamicina, se mantuvieron verdes y mostraron un crecimiento normal, desarrollando hojas primarias. Se pudieron observar las diferencias en color y tamaño entre las plántulas resistentes y las sensibles a kanamicina.

De las semillas de las plantas infiltradas se obtuvieron dos plántulas resistentes a kanamicina por cada mil, indicando que la eficiencia de transformación había sido de un 0.2%.

De 30 líneas *35S:PYL8/RCAR3* resistentes a kanamicina recogidas en la T1, aproximadamente el 60% muestran un fenotipo de hipersensibilidad al ABA durante la germinación, comparando con las plantas sin transformar.

**2.2.-Segregación de los transgenes en la progenie.**

Las semillas provenientes de las plantas T1, muestran segregación de la resistencia a kanamicina conferida por el gen *NPT II* incluido en el T-DNA introducido en las plantas. La Tabla R.4 resume la segregación observada en la T2 para cada línea de la generación T1.

Para determinar el tipo de segregación de la resistencia a kanamicina de cada línea, se calculó el valor estadístico  $\chi^2$  (Parker, 1989) utilizando el número de plantas resistentes y sensibles. El límite para aceptar o rechazar una hipótesis se fija en la probabilidad del 5 %, es decir, para valores menores de 3,841 (valor de  $\chi^2$  para un grado de libertad) la desviación no es significativa y los datos se ajustan a la hipótesis.

La transmisión del gen de resistencia a kanamicina de la generación T1 a la T2, está de acuerdo con la segregación de inserciones del T-DNA como un marcador dominante en hemizigosis. En la T2, se analizaron aproximadamente 100 semillas, que provenían de 7 líneas diferentes (Tabla R.4). Finalmente, se determinaron las líneas homocigotas en la T3 y se seleccionaron aquellas líneas presentaban una única copia de T-DNA. En concreto, siete líneas homocigóticas T3 fueron seleccionados para la caracterización molecular y fenotípica.

Las líneas IP1, IP2, IP3, IP5, IP7 muestran una distribución de resistencia a kanamicina que se ajusta a una segregación mendeliana de una inserción en un sólo locus, con un cociente de semillas resistentes sobre semillas sensibles de 3:1. Por su parte, las líneas IP4, IP6 muestran dos inserciones (15:1). El resto de las líneas no presentan un patrón de segregación mendeliano. Esta segregación puede ser debida a la pérdida de la expresión del gen *NPT II*, a la existencia de varias inserciones que pueden presentarse en homocigosis o en hemizigosis, a una inestabilidad del inserto o a una transmisión sexual defectuosa para este locus debida, por ejemplo, a una generación de gametos de menor viabilidad.

**Tabla R.4.** Segregación a la resistencia a kanamicina de las líneas transgénicas en la generación T2. KR: número de semillas resistentes a kanamicina. KS: número de semillas sensibles a kanamicina. Las líneas sombreadas fueron seleccionadas para seguir los ensayos.

Línea	Total	KR	KS	Valor X2 para cada cociente	
				3R:1S (1 inserto)	15R: 1S (2 insertos)
IP1	97	81	16	3.302	15.671
IP2	90	75	15	2.904	14.936
IP3	116	94	22	1.943	29.876
IP4	64	58	6	7.521	0.6
IP5	106	88	18	3.22	19.042
IP6	89	80	9	9.742	1.655
IP7	95	75	20	0.593	33.045

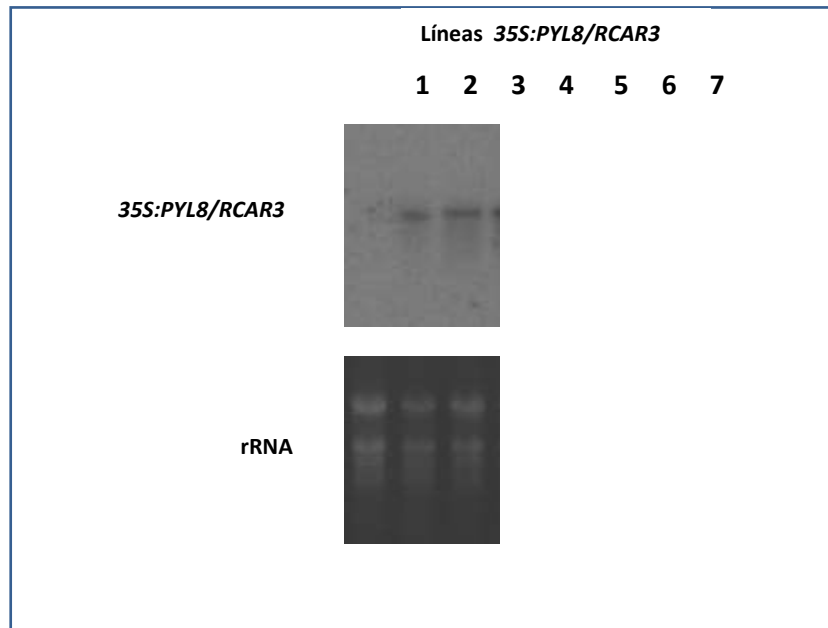
### 2.3.-Caracterización molecular del transgén *PYL8/RCAR3*.

Una vez seleccionadas las plantas transgénicas homocigóticas (T3) para dicho gen, se realizaron los correspondientes ensayos moleculares y fenotípicos.

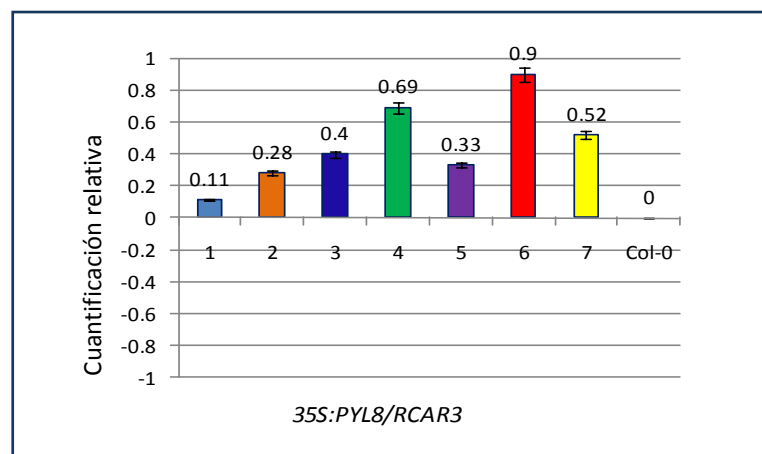
En primer lugar, comprobamos que las líneas sean portadoras del transgén *PYL8/RCAR3*, mediante caracterización molecular de las plantas transgénicas por Northern blot, Q RT-PCR y Southern blot.

El nivel de expresión del transgén *PYL8/RCAR3* en las distintas líneas transgénicas se analizó mediante el análisis Northern blot y Q RT-PCR. El resultado de estos análisis se muestra en las fig. R.20 y R.21, donde se observa una alta expresión del transgén *PYL8/RCAR3* en las 7 líneas transformadas con la construcción *35S:PYL8/RCAR3* (IP1-IP7), mientras que la expresión no se detecta en las plantas de *Arabidopsis* de tipo silvestre.

El análisis Northern y Q RT-PCR mostró que el gen *PYL8/RCAR3* se expresaba de manera variable en las diferentes líneas transgénicas *35S:PYL8/RCAR3*, se observó que niveles bajos de expresión del transgén son suficientes para dar lugar a hipersensibilidad al ABA, estrés salino, estrés osmótico.

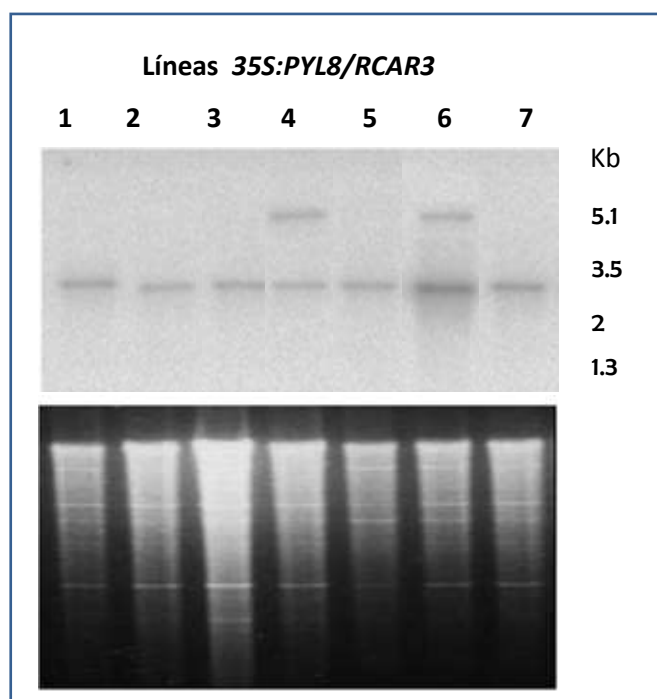


**Figura R.20.** Análisis por Northern blot de las líneas transgénicas que sobreexpresan *PYL8/RCAR3*. WT, tipo silvestre Col-0; IP1-IP7, líneas transgénicas que portan la construcción *35S:PYL8/RCAR3*. Se utilizaron 10 µg de RNA por muestra que se hibridaron con una sonda obtenida a partir de la pauta de lectura abierta de *PYL8/RCAR3*. Panel inferior: RNA ribosómico usado como control de carga.



**Figura R.21.** Análisis de Q RT-PCR de las líneas transgénicas que sobreexpresan *PYL8/RCAR3* (1 a 7) en comparación con el tipo silvestre (Col-0) utilizando oligonucleotidos para *PYL8/RCAR3* específicos.

El análisis por Southern blot muestra el número de inserciones del gen *PYL8/RCAR3* presentes en las distintas líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. El DNA de estas líneas fue digerido con la enzima *NcoI*. Las líneas transgénicas IP4 e IP6 presentan dos inserciones y las líneas IP1, IP2, IP3, IP5, e IP7 presentan una única inserción, como se puede observar en la fig. R.22, con una segregación 3:1 de resistencia a kanamicina en la T2. En todos estos casos, este resultado está acorde con el obtenido en el análisis de la segregación (Tabla R.4.).



**Figura R.22.** Análisis por Southern Blot de las líneas transgénicas (IP1-IP7) que sobreexpresan *PYL8/RCAR3*. El DNA genómico (10 µg) fue digerido con *NcoI* (panel inferior) e hibridado con cDNA de *PYL8/RCAR3*. M, marcadores de peso molecular en kb.

## 2.4 Caracterización fenotípica de las plantas 35S:PYL8/RCAR3.

Los análisis de expresión previos de *PYL8/RCAR3 in silico* y su contraste con la expresión de *FsPP2C1*, nos llevó a comprobar si la expresión constitutiva de *PYL8/RCAR3* en *Arabidopsis* podría afectar a diferentes procesos del desarrollo y respuestas a estrés regulados por ABA. Para ello, primeramente se realizaron ensayos de sensibilidad al ABA, dormición, respuestas a estrés salino y osmótico y

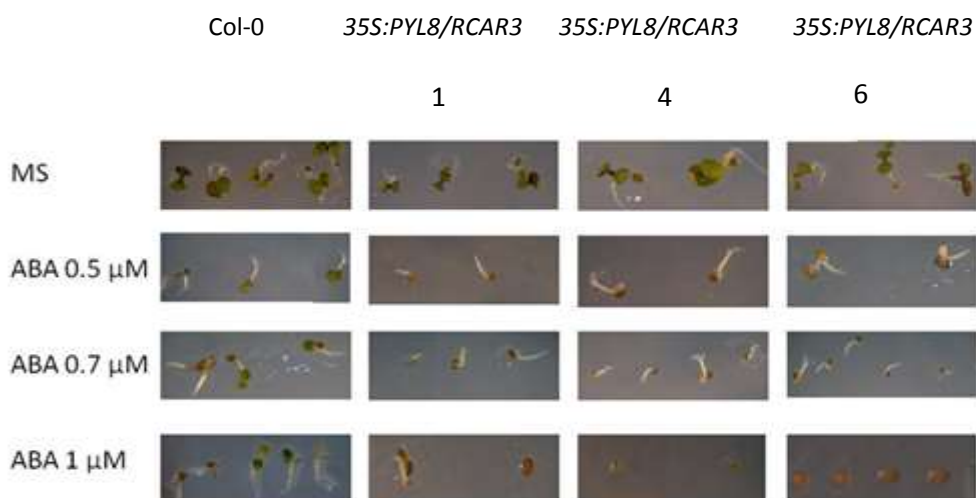
en tejidos vegetativos utilizando en ocasiones como controles semillas de *Arabidopsis thaliana* de tipo silvestre Col-0, semillas del mutante *abi1-1*, que es insensible a ABA, y semillas que sobreexpresan *FsP2C1* (P1,P2,P3).

## 2.4.1 Estudio de la germinación en semillas que sobreexpresan 35S:PYL8/RCAR3.

En este trabajo, hemos optado en primer lugar por un enfoque de ganancia de función para aportar pruebas genéticas sobre la función del gen *PYL8/RCAR3* en la señalización de ABA durante los procesos de dormición y germinación.

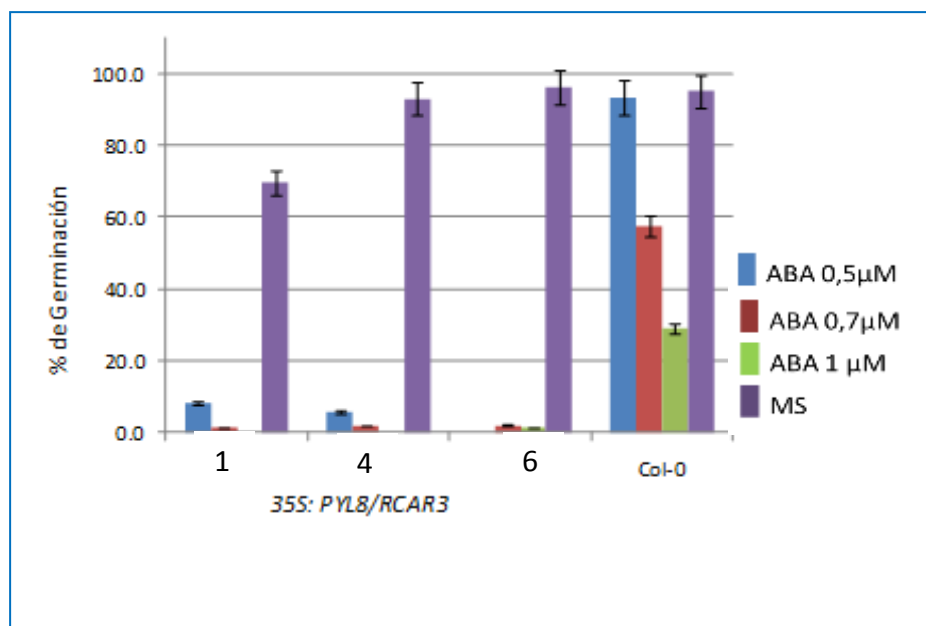
Se estudió la germinación de las semillas en presencia de tres concentraciones de ABA (0,5 $\mu$ M; 0,7  $\mu$ M y 1  $\mu$ M). Como podemos observar en la fig. R.23 después de 8 días, la emergencia radicular y el desarrollo de los cotiledones fueron inhibidos en las semillas que sobreexpresan *PYL8/RCAR3*, mientras que las semillas de tipo silvestre (Col-0) fueron capaces de germinar y crecer bajo estas condiciones. Al analizar los porcentajes de emergencia radicular de las semillas a iguales concentraciones de ABA (0,5 $\mu$ M; 0,7 $\mu$ M y 1 $\mu$ M) se observa que las líneas transgénicas presentan porcentajes de germinación menores del 5 % mientras que las de tipo silvestre (ecotipo Col-0) muestra valores altos, aún en presencia de ABA 1 $\mu$ M. Estos resultados demuestran que las semillas que sobreexpresan el transgén *PYL8/RCAR3* son hipersensibles al ABA.

A)





B)



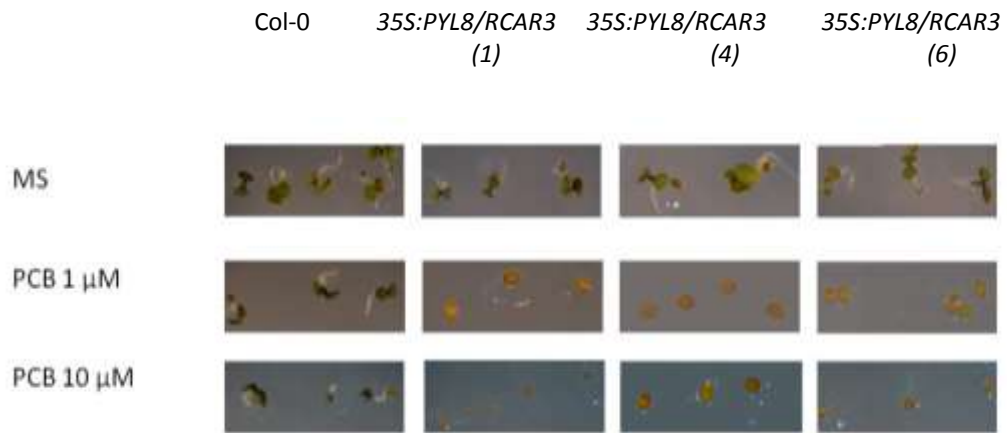
**Figura R.23. A)** Ensayo de germinación en MS y en presencia de diferentes concentraciones de ABA en semillas *35S:PYL8/RCAR3*, comparadas con el tipo silvestre Col-0. **B)** Porcentaje de germinación de 3 líneas transgénicas *35S:PYL8/RCAR3* en concentraciones crecientes de ABA.

Otro ensayo de germinación fue llevado a cabo en presencia de paclobutrazol (PCB), un inhibidor de la síntesis de giberelinas (GAs), dado que las GAs y el ABA tienen papeles antagónicos en la germinación de semillas. Vemos que a diferencia de las semillas de tipo silvestre, nuestras líneas transgénicas son incapaces de germinar, corroborando de nuevo esta hipersensibilidad en la germinación. (Fig. R.23). Lo mismo ocurre tras la adición de paclobutrazol, siendo los porcentajes de las líneas transgénicas menores al 5% mientras que las semillas de tipo silvestre presentan valores mayores a estos, aún a altas concentraciones (PCB 10 μM) (Fig. R.24)

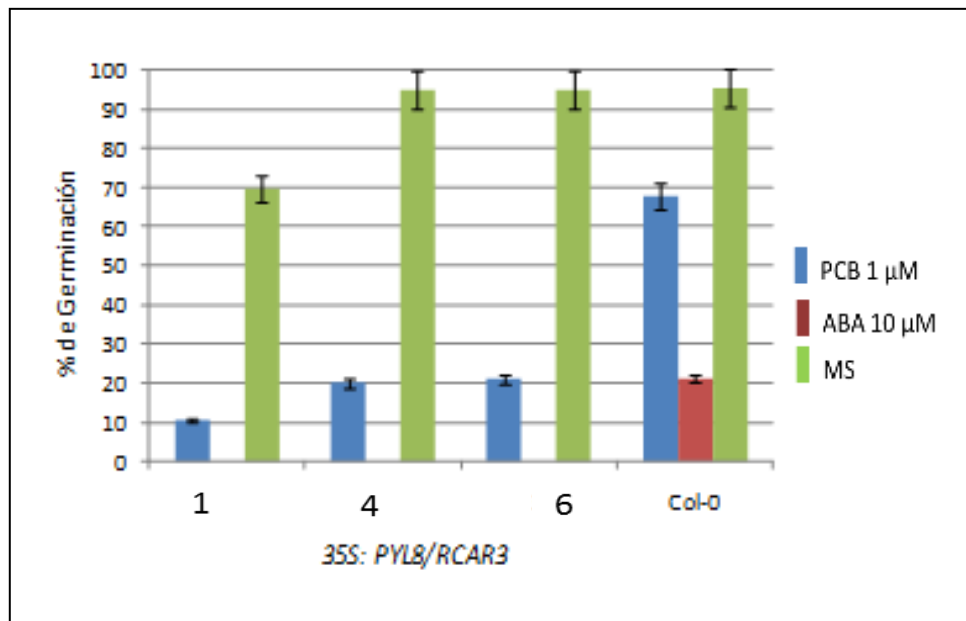
De nuevo, estos fenotipos identificados contrastan fuertemente con la insensibilidad a ABA y paclobutrazol que muestran las plantas que sobreexpresan la *FsPP2C1* (González-García et al; 2003).

# RESULTADOS

A)



B)



**Figura R.24. A)** Ensayo de germinación de semillas *35S:PYL8/RCAR3* en MS y en presencia de diferentes concentraciones de paclobutrazol (PCB), que es un inhibidor de la síntesis de giberelinas (GAs). **B)** Porcentajes de germinación de 3 líneas transgénicas *35S:PYL8/RCAR3* en presencia del inhibidor de la síntesis de giberelinas (PCB).

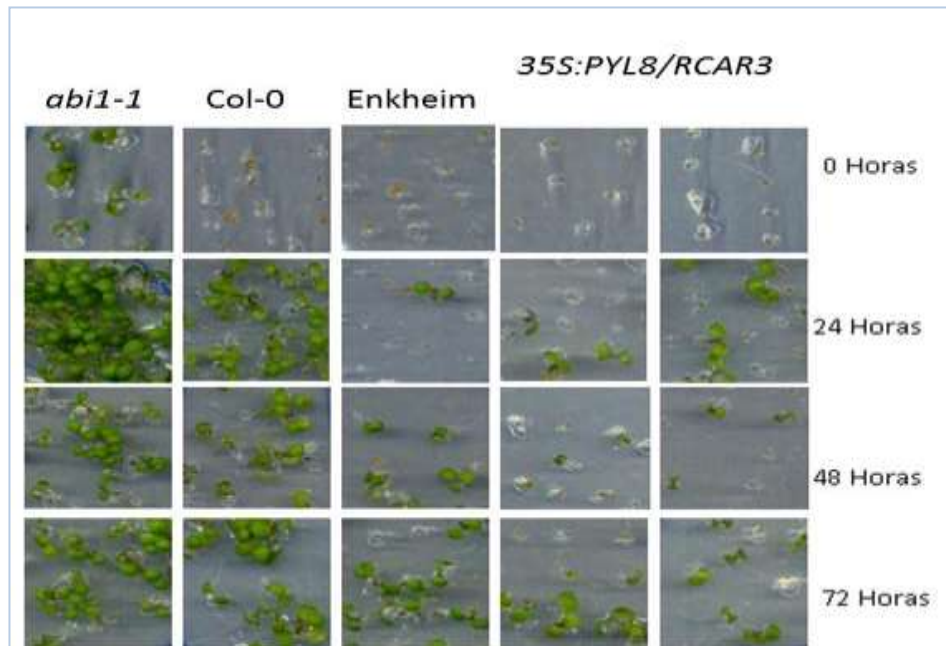
### 2.4.2 Estudio de la dormición en semillas que sobreexpresan *35S:PYL8/RCAR3*.

El siguiente paso fue la realización de ensayos de dormición, en los que se analizaron los porcentajes de germinación en semillas de las líneas transgénicas seleccionadas (IP1, IP4 y IP6) y en los controles anteriormente mencionados (Col-0, *abi1-1*) y el ecotipo Emkheim, que presenta un fuerte grado de dormición (Fig R.24). Una vez recolectadas las semillas de la planta madre, primero fueron estratificadas durante 0, 24, 48 y 72 horas a 4°C en oscuridad y posteriormente, mantenidas en una cámara de germinación con un fotoperiodo de 16 horas de luz a 21°C.

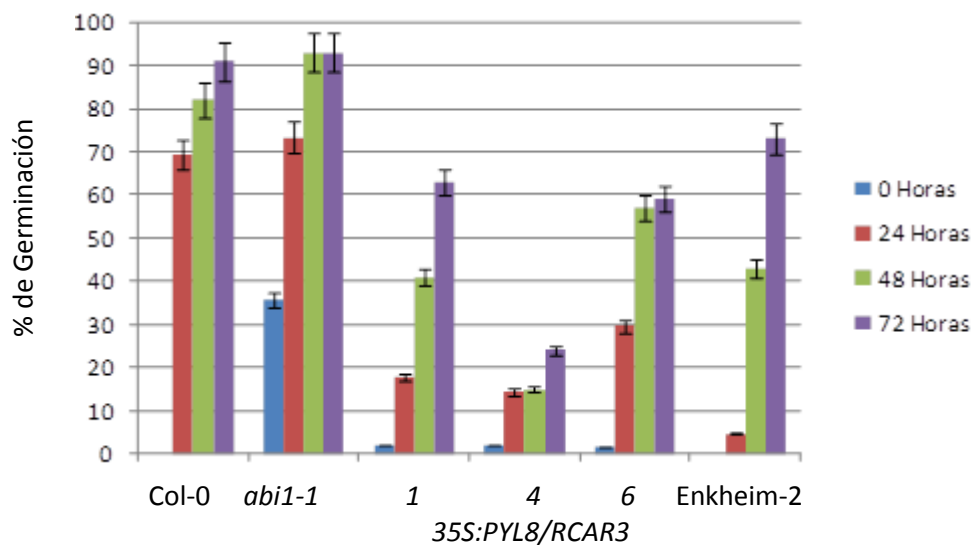
Las semillas de *Arabidopsis thaliana* de tipo silvestre (Col-0) presentan dormición primaria cuando se recogen de la planta madre, son incapaces de germinar aunque las condiciones ambientales sean apropiadas y necesitan ciertos tratamientos que ayuden a eliminar la dormición como la estratificación o la aplicación de GAs (Koornneef y Karssen, 1994). Así, las semillas del ecotipo Col-0, si no se estratifican apenas van a germinar, mientras que tras 72 horas de tratamiento frío se observan porcentajes de germinación cercanos al 90%. (Fig R.24 B).

El mutante *abi1-1* presenta altos porcentajes de germinación, tanto en las muestras estratificadas como en las que no habían sido sometidas a ningún tratamiento previo. Las líneas transformadas *35S:PYL8/RCAR3* presentan porcentajes de germinación inferiores al 5% en las muestras no estratificadas y en las que habían sido sometidas a estratificación presentan porcentajes de germinación siempre inferiores al ecotipo silvestre, lo que indica que estas semillas presentan un mayor grado de dormición y sugiere que *PYL8/RCAR3* probablemente está relacionado con la señalización de ABA en este proceso fisiológico.

A)



B)



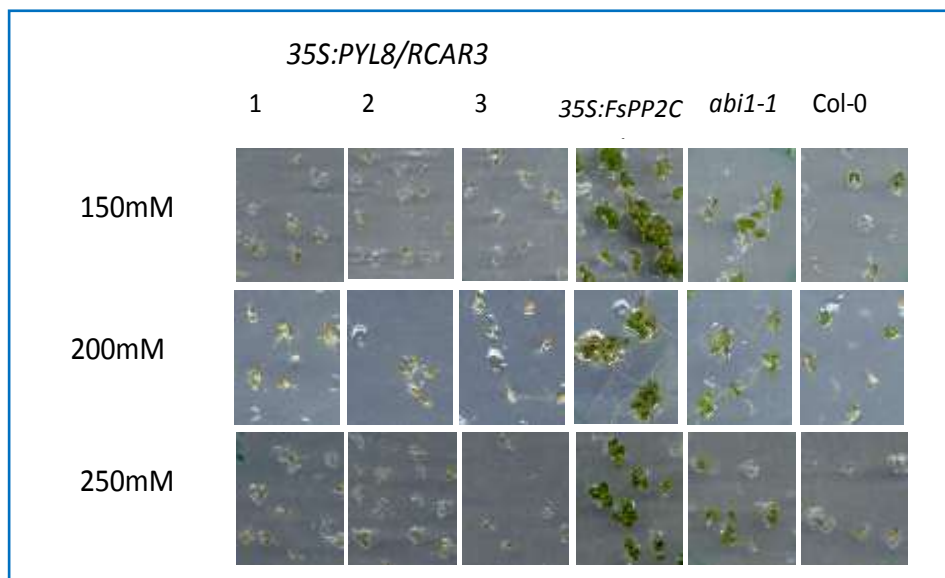
**Figura R.25 A)** Ensayo de dormición en las líneas transgénicas *35S:PYL8/RCAR3*, a 0, 24, 48 y 72 horas de estratificación, haciendo uso como controles Col-0 y Enkheim-2. **B)** El porcentaje de germinación se determinó a los 5 días de estratificación, se utilizaron como control semillas Col-0, el mutante *abi1-1* y el ecotipo Enkheim-2, ecotipo que presenta mayor grado de dormición.

**2.4.3 Hipersensibilidad al estrés salino y osmótico de 35S:PYL8/RCAR3.**

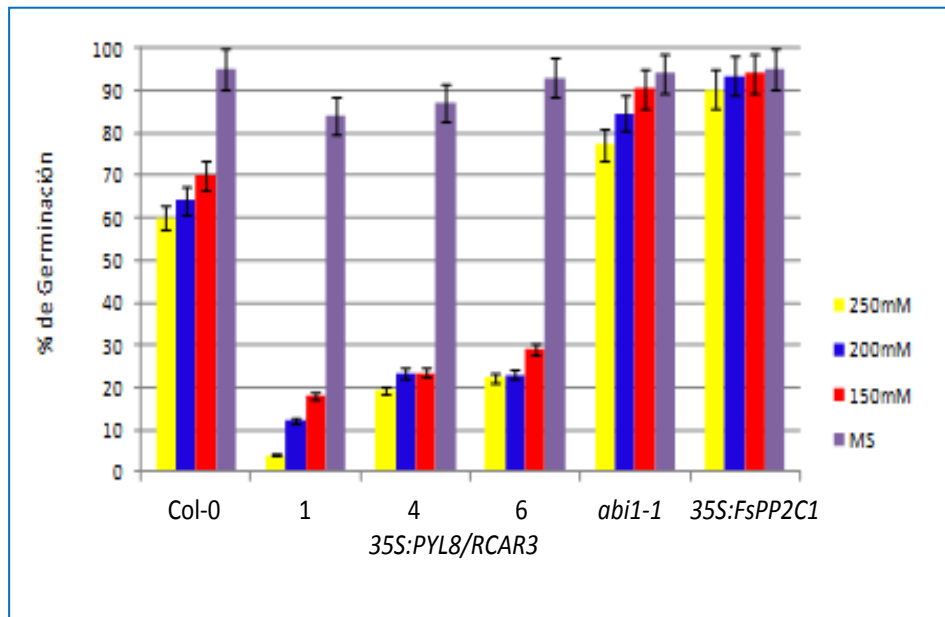
Por otra parte, dada la importancia que tiene el ABA en la adaptación a diferentes tipos de estreses ambientales, analizamos las respuestas de las plantas que sobreexpresan *PYL8/RCAR3* al estrés salino y al estrés osmótico. Para el ensayo de respuesta al estrés osmótico utilizamos dosis crecientes de manitol a concentraciones de 150 mM, 200mM y 250mM. Así, comprobamos que las semillas de las plantas sobreexpresoras *35S:PYL8/RCAR3* son incapaces de germinar, mostrando también que las semillas de tipo silvestre (Col-0) presentan porcentajes de germinación aún mayores que las transgénicas *35S: PYL8/RCAR3*, mientras que los mutantes *abi1-1*, así como la línea transgénica *35S:FSP2C1*, presentan elongación de la raíz y cotiledones verdes perfectamente desarrollados (Fig. R.26 A).

Estos resultados indican que la sobreexpresión de *PYL8/RCAR3* confiere hipersensibilidad al manitol, aún en concentraciones donde las semillas de tipo silvestre (Col-0) son capaces de germinar y desarrollarse.

A)

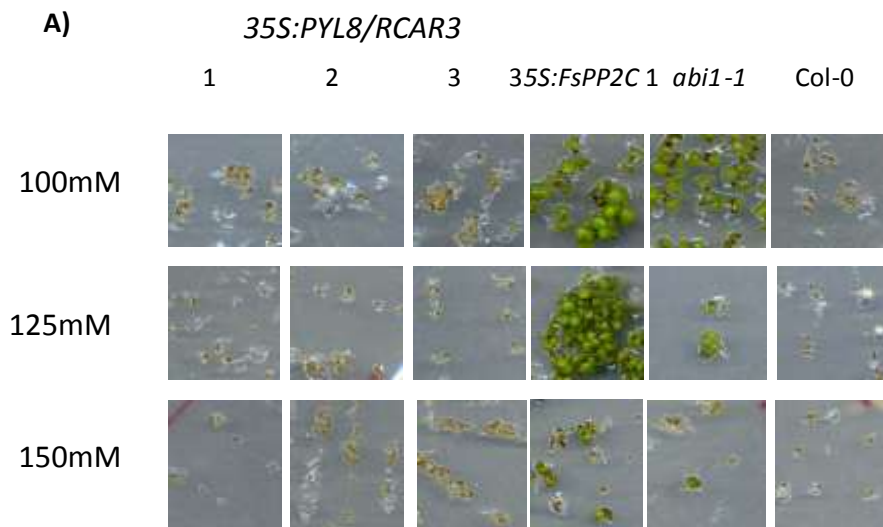


B)

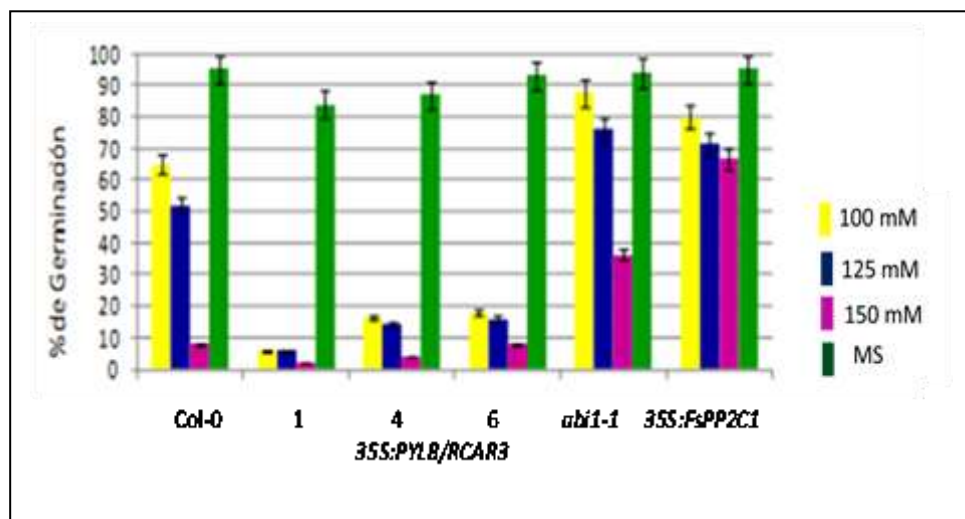


**Figura R.26. A)** Germinación y crecimiento inicial de plántulas en medio MS suplementado con manitol. En la fotografía se muestra 3 líneas transgénicas *35S:PYL8/RCAR3*, como controles *35S:FSP2C1* (González-García et al.,2003), Col-0 y *abi1-1*. **B)** Porcentajes de germinación de las semillas *35S:PYL8/RCAR3* en medio MS suplementado con manitol a concentraciones de 150, 200 y 250 mM.

La respuesta de las plantas transgénicas *35S:PYL8/RCAR3* a estrés salino, se analizó, en presencia de tres concentraciones de NaCl (100mM, 125mM y 150 mM). Se encontró que las transgénicas son hipersensibles al estrés salino de manera contraria a lo observado en las semillas que sobreexpresan *FsPP2C1*, que son capaces de germinar aún en presencia de concentraciones altas de NaCl (Fig. R.27).



**B)**



**Figura R.27. A)** Germinación en presencia de NaCl a concentraciones de 100, 125 y 150mM. En la fotografía se observa la hipersensibilidad de las líneas transgénicas *35S:PYL8/RCAR3*, fenotipo contrario al que muestran las semillas *35S:FsPP2C1*. **B)** Análisis de los porcentajes de germinación de las semillas *35S:PYL8/RCAR3* en condiciones de estrés salino, usando como controles semillas *35S:FsPP2C1*, *abi1-1* y Col-0.

#### 2.4.4 Efecto de la sobreexpresión de *35S:PYL8/RCAR3* en tejidos vegetativos

Para continuar determinando las características fenotípicas de nuestras líneas transgénicas y ver si la sobreexpresión de *PYL8/RCAR3* afecta a procesos de desarrollo y respuesta a estrés en la planta entera, analizamos su sensibilidad al

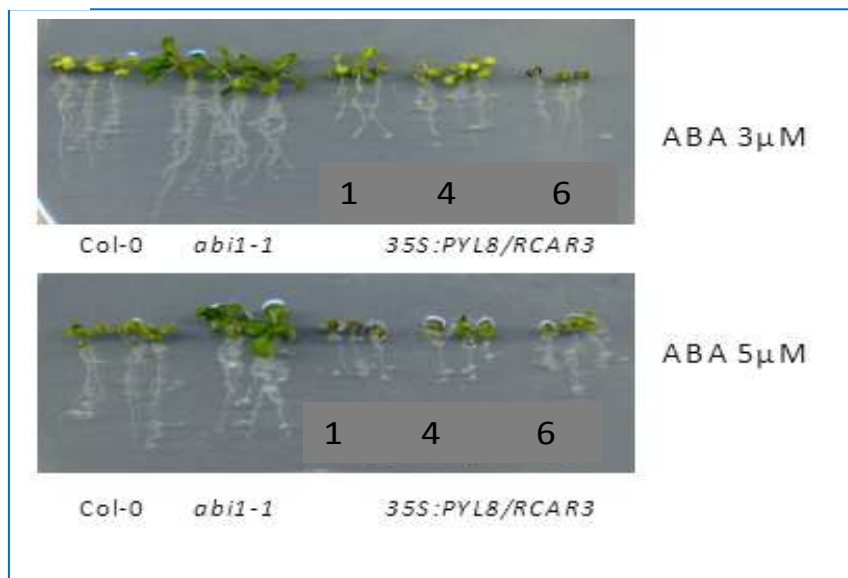
## RESULTADOS

ABA en tejidos vegetativos, comparada con las plantas control (Col-0) y con mutantes insensibles al ABA.

Se sabe que el ABA inhibe el crecimiento de la raíz y que los mutantes insensibles al ABA y las plantas que sobreexpresan *FsP2C1* son resistentes a este proceso (Himmelbach et al., 1998, González-García et al., 2003). Por ello, analizamos la sensibilidad de las raíces de plantas de 12 días a concentraciones de ABA (3  $\mu$ M y 5  $\mu$ M) en placas verticales. Comprobamos que la longitud de la raíz era menor en nuestras líneas *35S:PYL8/RCAR3* en comparación con el tipo silvestre y aún mayor es la diferencia con lo observado en los mutantes *abi1-1* (insensibles al ABA). Mostrando así una inhibición en el crecimiento de las raíces en las líneas transgénicas de *PYL8/RCAR3* (Fig R.28).

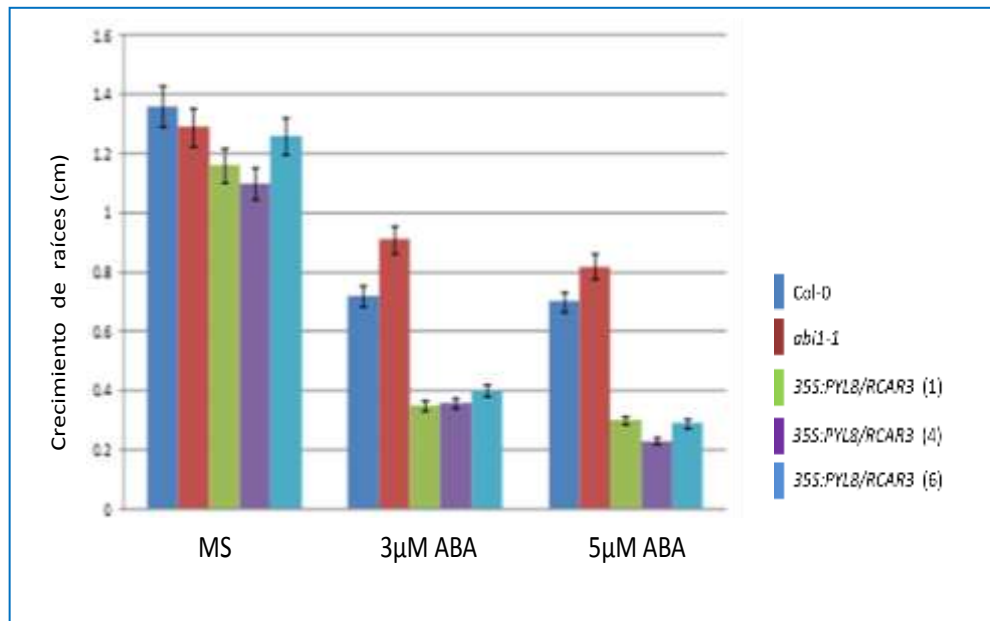
Así mismo, en el resto de los tejidos vegetativos de algunas de nuestras plantas transgénicas *35S:PYL8/RCAR3* se aprecia una mayor sensibilidad al ABA, como puede observarse por el amarilleamiento de las hojas, amarilleamiento que no aparece en los mutantes *abi1-1*.

A)





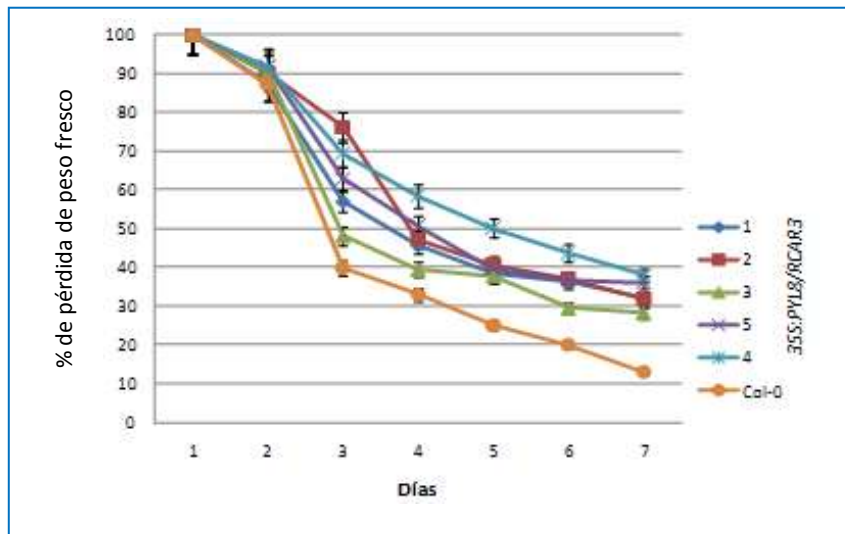
**B)**



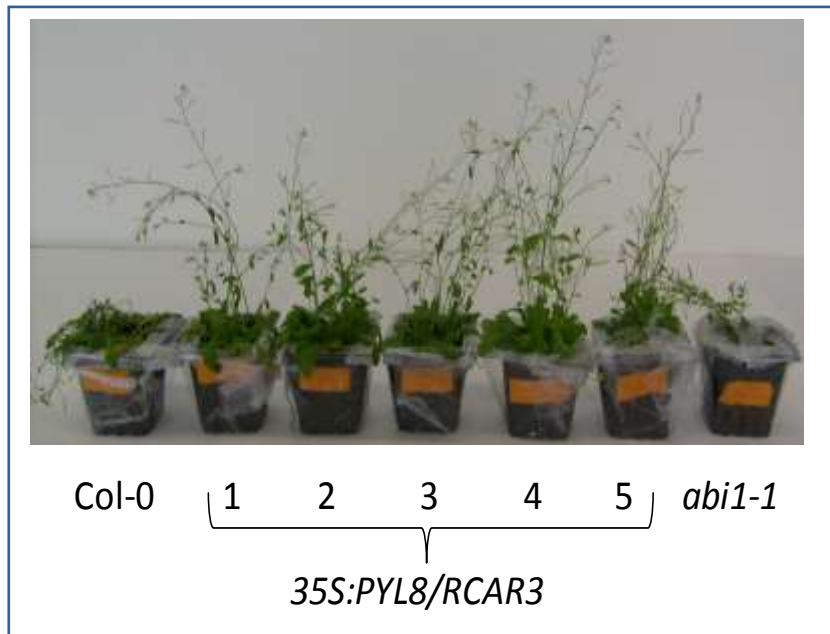
**Figura R.28. A).** Ensayos de crecimiento de raíz para estudiar la sensibilidad a ABA. Las plantas *35S:PYL8/RCAR3*, *abi1-1* y Col-0 de 5 días crecidas en MS se transfirieron a MS suplementado con ABA 3 y 5µM. La fotografía se realizó a los 12 días. **B)** Gráfica de crecimiento de raíces en las tres líneas *35S:PYL8/RCAR3*. Los datos son promedios de 3 experimentos independientes con 20 plantas por experimento.

Otra de las funciones fisiológicas del ABA, es el control del mecanismo de apertura y cierre estomático, produciendo el cierre de los estomas y, por tanto, reduciendo la pérdida de agua, en condiciones de sequía. Por eso, el siguiente paso en esta caracterización fenotípica, fue el análisis de la pérdida de humedad en nuestras líneas transgénicas en comparación con plantas de tipo silvestre (Col-0) y con los mutantes *abi1-1*. Para ello, se realizó la prueba de transpiración en alveolos, en plantas previamente pesadas y teniendo el peso húmedo con el cual se iniciaría la curva de pérdida de humedad (Fig. R. 29).

A)



B)



**Figura R.29 A)** Gráfica de pérdida de humedad, medida de peso fresco de plantas Col-0, *35S:PYL8/RCAR3*. Los valores de desviación estándar representan el promedio de tres experimentos independientes. **B)** Ensayo de sequía en plantas *35S:PYL8/RCAR3*, Col-0 y *abi1-1*. Las plantas se crecieron en ausencia de irrigación durante 7 días. Los controles Col-0 y *abi1-1* muestran pérdida de turgencia, mientras que las plantas transgénicas son más tolerantes a condiciones de sequía.

El ensayo se realizó en un periodo de 7 días y la fotografía corresponde al 7<sup>º</sup> día. Los datos representan los valores de uno de los tres experimentos realizados independientemente con resultados similares.

El ABA provoca el cierre de los estomas y la consiguiente reducción en la pérdida de agua en condiciones de sequía. Los mutantes de *Arabidopsis* ABA-insensibles (*abi1-1*) son incapaces de cerrar sus estomas y pierden grandes cantidades de agua ya que no son capaces de reducir su transpiración. Por el contrario, la sobreexpresión de *PYL8/RCAR3* afectó a la regulación osmótica, ya que las plantas *35S:PYL8/RCAR3* mostraron menores tasas de transpiración con respecto a las plantas de tipo silvestre en condiciones de sequía (no regadas después de 7 días), que perdió aproximadamente el 80% del peso en fresco (Fig R.29). Estos resultados muestran también la hipersensibilidad de las plantas transgénicas en el cierre estomático.

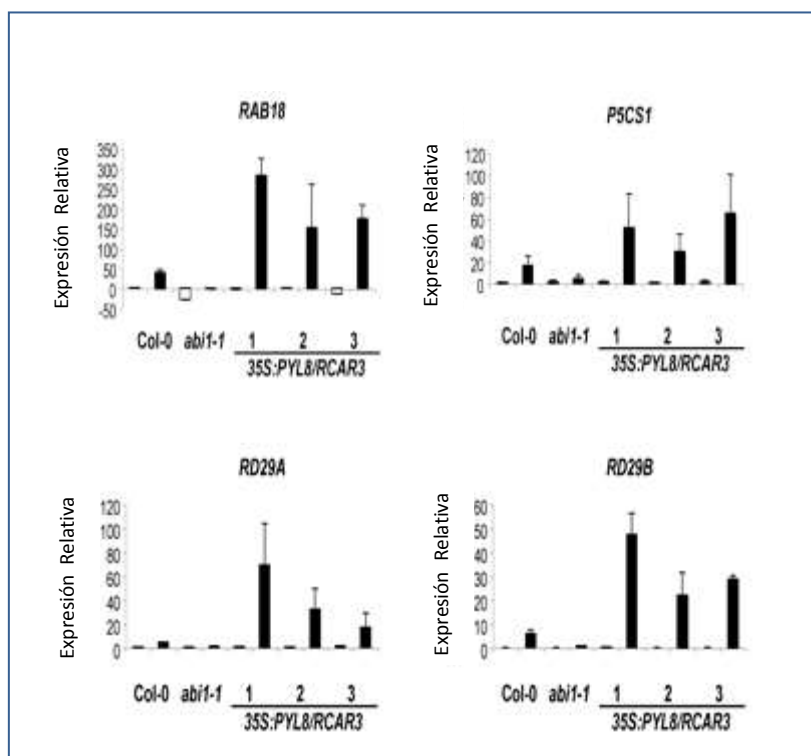
### 2.5 Análisis de la expresión génica en plantas *35S:PYL8/RCAR3*.

Para examinar en mayor profundidad si el aumento de la sensibilidad al ABA en nuestras líneas transgénicas iba acompañada por una modificación en la expresión de genes de respuesta al ABA, comparamos la inducción de varios genes marcadores de la respuesta al ABA (*RAB18*, *P5CS1*, *RD29A* y *RD29B*) en las líneas *35S:PYL8/RCAR3* y también en Col-0 y el mutante *abi1-1* (Fig. R.30). *RAB18* (Lang y Palva, 1992; Parcy et al., 1994) presenta una fuerte inducción por esta hormona y su expresión está drásticamente inhibida en los mutantes *abi1-1* y *abi2-1* (Leung et al., 1997). *P5CS1* es inducido por sequía, salinidad y ABA y se reduce en aproximadamente un 50% en el mutante *abi1-1* en comparación con las plantas de tipo silvestre (Strizhov et al., 1997). Del mismo modo, *RD29A* y *RD29B* son genes regulados por frío, sequía, y contienen elementos de respuesta a ABA en sus promotores. *RD29A* contiene, además, el elemento de respuesta a la deshidratación (DRE), que participa en una respuesta rápida a las condiciones de deshidratación o estrés salino (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994).

## RESULTADOS

Para llevar a cabo el análisis molecular de la respuesta a ABA se sembraron semillas de tipo Col-0, el mutante *abi1-1* y 3 líneas de *PYL8/RCAR3* en placas de MS y se dejaron crecer durante 12 días. Transcurrido este tiempo, las plántulas fueron tratadas con ABA 10  $\mu$ M y con H<sub>2</sub>O como control durante 3 horas. Posteriormente, se extrajo el RNA de las plántulas tratadas y tras síntesis del cDNA correspondiente, se empleó la técnica de PCR cuantitativa (Q RT-PCR), para estudiar la sensibilidad a ABA. La adición de ABA provoca una clara inducción de los genes RD29A, RD29B, RAB18, P5CS1 en los genes de *PYL8/RCAR3*, los niveles de transcritos correspondientes a estos genes en el mutante *abi1-1* eran muy reducidos en respuesta al tratamiento.

Todo indica que *PYL8/RCAR3* está implicada en la ruta de señalización del ABA regulando positivamente la expresión de estos genes.



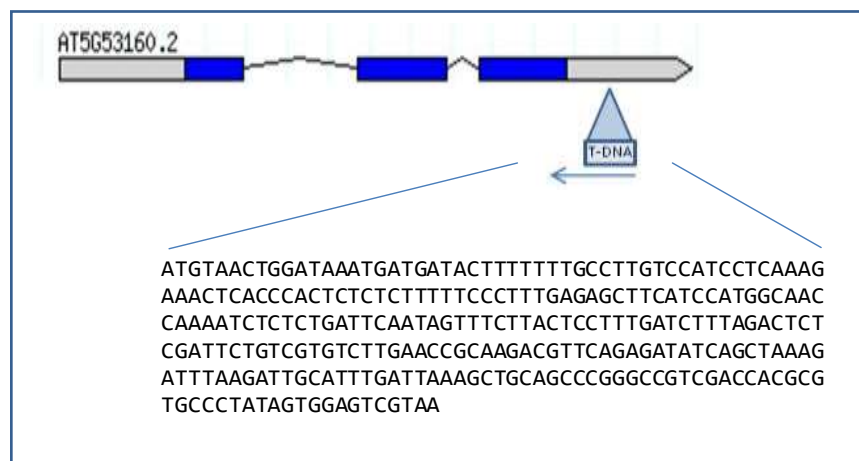
**Figura R.30.** Análisis de la expresión mediante Q RT-PCR en *35S:PYL8/RCAR3*. La imagen muestra los niveles de expresión de los genes *RAB18*, *P5CS1*, *RD29A*, *RD29B* en los controles Col-0, *abi1-1*. Para realizar este ensayo se empleó 10  $\mu$ M de ABA durante 3 horas.

## 2.6 Análisis de la pérdida de función de *PYL8/RCAR3*

Como último apartado del estudio funcional de *PYL8/RCAR3* también hemos llevado a cabo el análisis de su pérdida de función, mediante la caracterización de un mutante por inserción de T-DNA para el gen *PYL8/RCA3*.

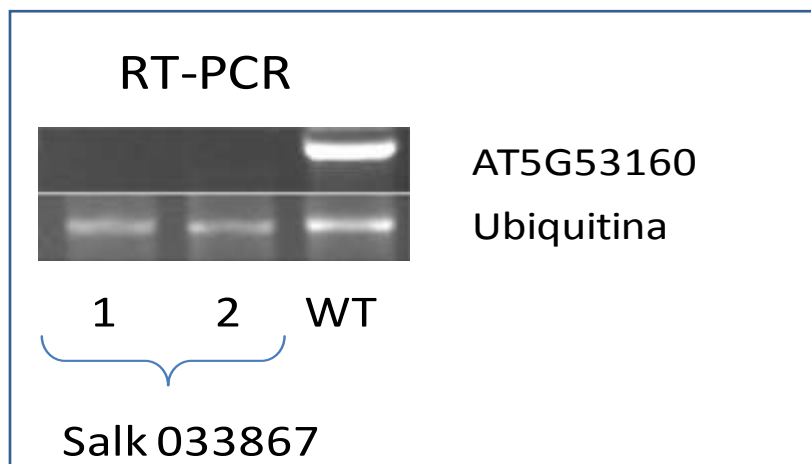
Para ello, se identificó el mutante SALK\_033867, (Alonso et al., 1999) cuya inserción se localiza en la región UTR 3' (Fig. R.32).

En primer lugar, se identificaron plantas homocigotas para la inserción mediante resistencia a kanamicina para continuar con los ensayos de caracterización fenotípica y molecular.



**Figura R.31.** Localización de la inserción de T-DNA correspondiente a la línea Salk-033867 en el gen *PYL8/RCAR3*.

Para comprobar si existía expresión del gen en esta línea mutante realizamos una RT-PCR. Como se observa en la fig. R.32 en dos líneas del mutante no hay expresión del gen, comparado con el tipo silvestre. A pesar de que la inserción de T-DNA recae fuera de la región codificante, no hemos detectado expresión en las líneas homocigotas para la mutación. Con este análisis comprobamos que este mutante SALK es un mutante de pérdida de función para *PYL8/RCAR3*.



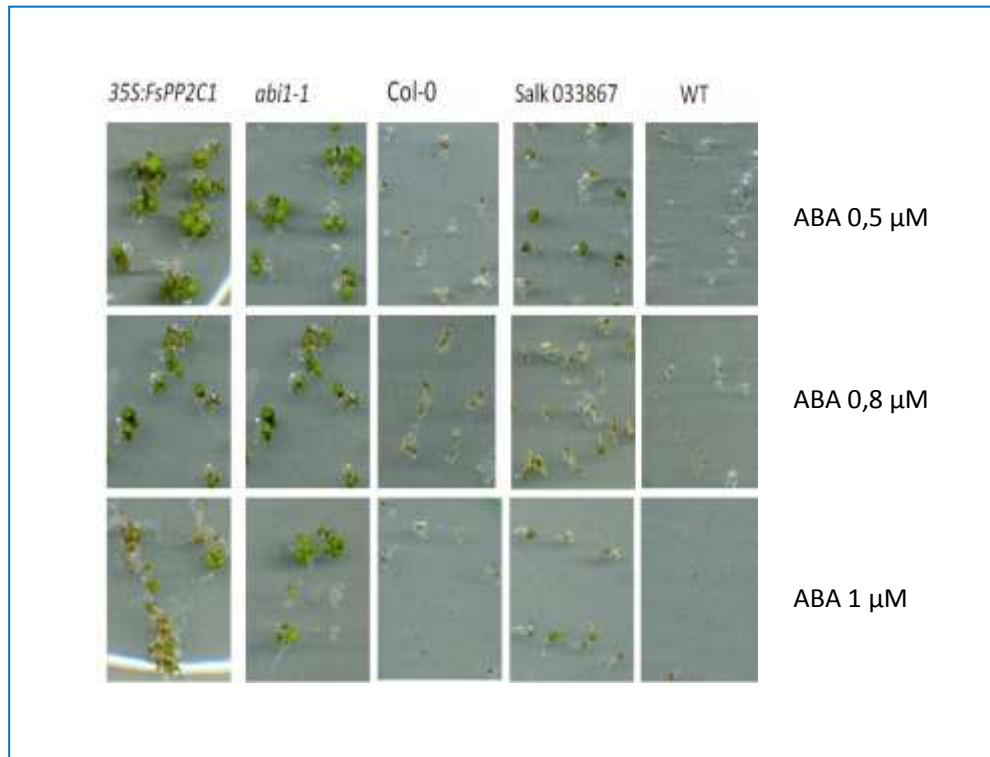
**Figura R.32.** Análisis de la pérdida de función del gen *PYL8/RCAR3* en la línea de inserción Salk-033867 mediante RT-PCR.

## 2.6.1 Caracterización fenotípica del mutante de pérdida de función.

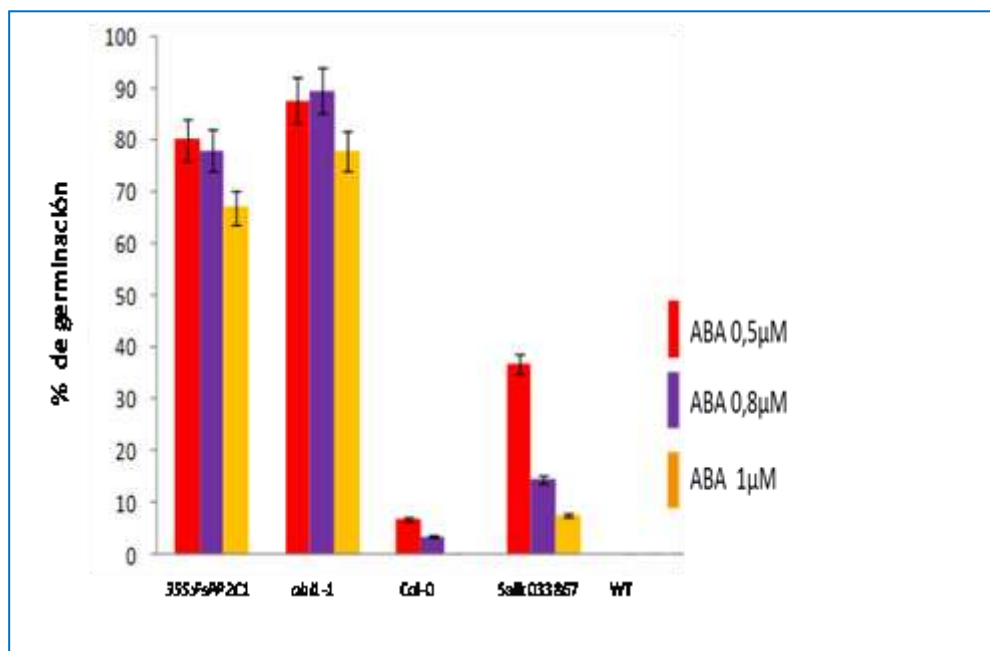
Para la caracterización fenotípica realizamos ensayos de germinación en semillas del mutante y utilizando como controles semillas *35S:FsPP2C1*, *abi1-1* y Col-0 en presencia de ABA 0,5; 0,8; 1  $\mu$ M, a los 10 días después de la siembra. Se observa que las semillas del mutante presentan menor sensibilidad en cuanto a su emergencia radicular y desarrollo de cotiledones que los correspondientes tipos silvestres Col-0 (Fig. R.33 A).

Comparando la capacidad de germinación del mutante con semillas que sobreexpresan *FsPP2C1*, con el mutante insensible a ABA (*abi1-1*) y con el tipo silvestre (Col-0) en presencia de diferentes concentraciones de ABA 0,5; 0,8; 1  $\mu$ M (Fig. R 33 B) comprobamos que las semillas del mutante de pérdida de función para *PYL8/RCAR3* son capaces de germinar, pero en menor porcentaje que las semillas *35S:FSP2C1* y *abi1-1*.

A)



B)



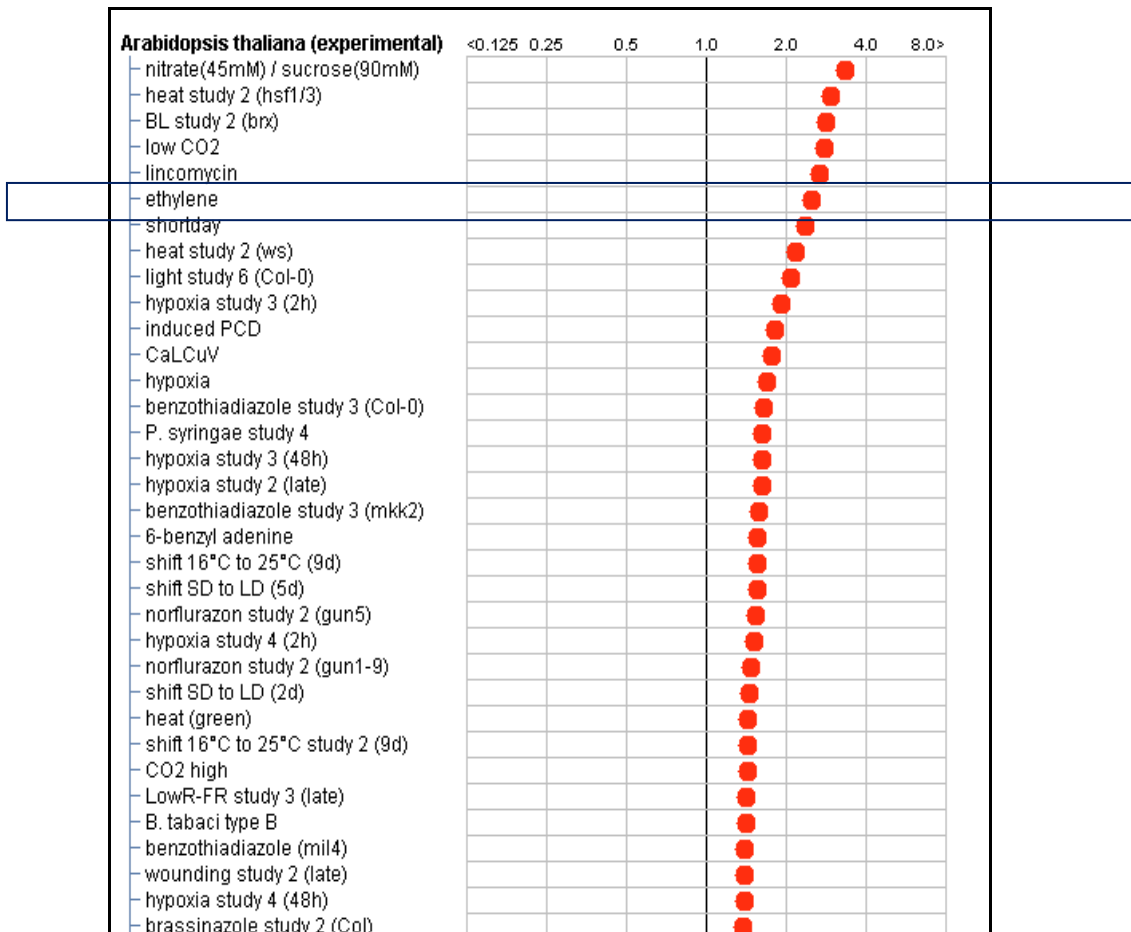
**Figura R.33. A)** Ensayo de germinación en presencia de ABA en semillas del mutante Salk. En la fotografía se muestran las diferencias de germinación entre las semillas que sobreexpresan *FsPP2C1* y las de tipo silvestre (Col-0) después de 10 días en presencia de ABA. **B)** Porcentajes de germinación de las semillas que desarrollan cotiledones verdes y perfectamente desarrollados en presencia de ABA en concentraciones de 0,5  $\mu$ M; 0,8  $\mu$ M; 1  $\mu$ M. El recuento se realizó 10 días después de la siembra.

## 2.6.2 Caracterización molecular en el mutante de pérdida de función.

Según la base de datos públicos (<http://www.genevestigator.ethz.ch>), *PYL8/RCAR3* se induce por etileno, entre otros tratamientos, como lo demuestran ensayos realizados con ACC, precursor de esta hormona (Fig. R.34).

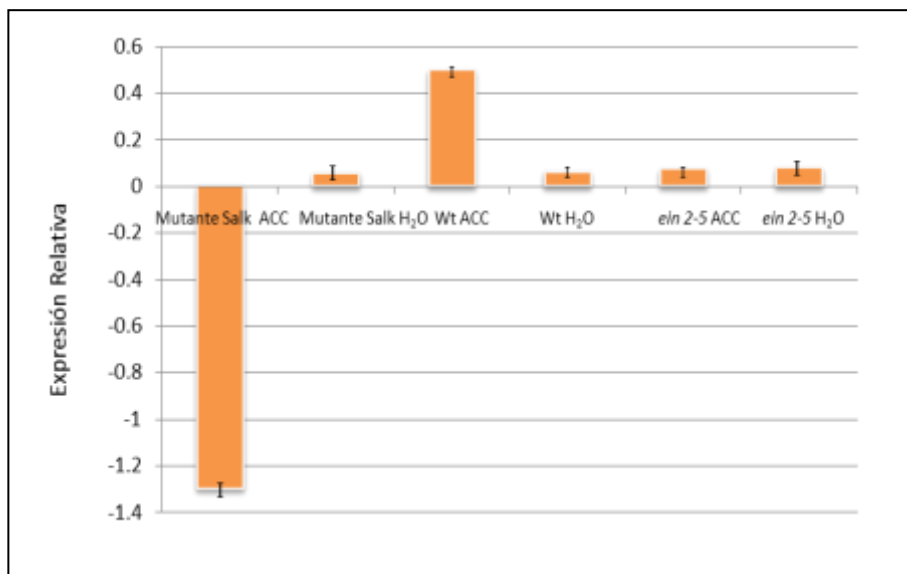
Para comprobar si nuestro gen era inducido o reprimido por ACC, realizamos el ensayo en plantas de 10 días crecidas en medio líquido tras el tratamiento con ACC 10 $\mu$ M durante 6 horas, para posteriormente recolectar material, extraer RNA y realizar una Q RT-PCR (Fig.R.34 B).

**A)**





B)



**Figura R.34. A)** Análisis “in silico” de la expresión de *PYL8/RCAR3* en presencia de distintos tratamientos, obtenido de la base de datos Genevestigator. **B)** Análisis por Q RT-PCR de expresión de *PYL8/RCAR3* regulada por etileno. Plántulas del tipo silvestre (Wt), del mutante insensible a etileno *ein 2-5* y del mutante de pérdida de función para *PYL8/RCAR3* se trataron con el precursor de etileno ACC (10uM) comparado con un control en agua.

El gen *PYL8/RCAR3* se induce claramente tras tratamiento con el precursor de etileno ACC, pero esta inducción no tiene lugar en el mutante insensible a etileno (*ein 2-5*), ni en la propia pérdida de función de este gen.

Estos resultados muestran la posible implicación de otras hormonas, como el etileno, en la regulación transcripcional del gen *PYL8/RCAR3*.

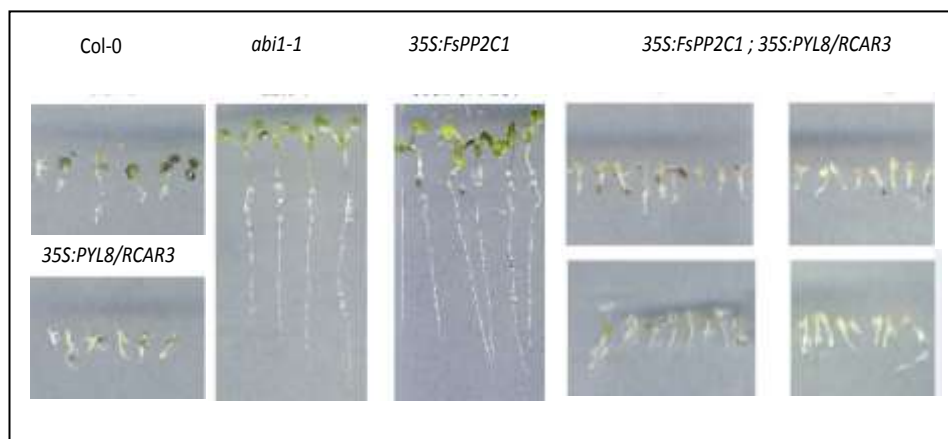
### 3.- GENERACIÓN DE DOBLES TRANSGÉNICAS *35S:PYL8/RCAR3*; *35S:F<sub>s</sub>PP2C1*.

Para obtener una visión más profunda sobre la función que tiene *PYL8/RCAR3* en la interacción con *F<sub>s</sub>PP2C1*, decidimos generar líneas dobles transgénicas.

La sobreexpresión constitutiva de *PYL8/RCAR3* confiere hipersensibilidad a ABA en semillas de *Arabidopsis* y en consecuencia un mayor grado de dormición en las semillas. Además, semillas que sobreexpresan *35S:PYL8/RCAR3* son incapaces de

## RESULTADOS

germinar en bajas concentraciones de manitol, NaCl o paclobutrazol, estos fenotipos que presenta *PYL8/RCAR3* son opuestos a las que presentan semillas que sobre expresan *FsPP2C1*. Por último, las dobles transgénicas confirman el papel antagónico de *PYL8/RCAR3* sobre *FsPP2C1* demostrando que *PYL8/RCAR3* regula positivamente la señalización de ABA durante la germinación y respuestas de estrés abiótico (Fig. R.35).



**Figura R.35.** Ensayos de germinación en presencia de ABA en concentración 0,5μM se observa fenotipo de sensibilidad del doble transgénico *35S:FSP2C1; 35S:PYL8/RCAR3*, se muestra como controles de hipersensibilidad *PYL8/RCAR3* y *Col-0* y *35S:FSP2C1* como control de insensibilidad. Se sembraron (1-4) líneas independientes luego de 8 días se observó la germinación.



**DISCUSIONES**



## 1.- DISCUSIÓN GENERAL

Los reguladores del crecimiento son moléculas fundamentales en la modulación de diversos procesos del desarrollo de las plantas, desde la germinación hasta la senescencia y las respuestas a factores bióticos y abióticos.

La formación, maduración, dormición y germinación de semillas son algunos de los procesos más importantes y vulnerables por los que pasa una planta en su ciclo de vida, pues de ellos depende el desarrollo de nuevas plantas. La germinación, que comienza con la toma de agua por la semilla seca, implica la reactivación de procesos metabólicos y de expresión génica y termina con la elongación del eje embrionario, que se manifiesta con la emergencia radicular a través de las cubiertas que lo rodean (Bewley y Black, 1994).

En muchas semillas, la dormición puede ser eliminada por un tratamiento a bajas temperaturas (estratificación), mediante iluminación o bien por la aplicación de distintos factores hormonales o agentes químicos (Schneider y Gifford, 1994; Finkelstein et al., 2002; Koornneef et al., 2002), pero los efectos de estos tratamientos difieren en las distintas especies, por lo que no parece probable que un único mecanismo o proceso sea el responsable de esta compleja respuesta.

Es bien conocido que la germinación es una de las etapas del desarrollo más profundamente influenciada por la acción de las hormonas vegetales. De todas ellas, son las giberelinas (GAs) las que desarrollan un papel esencial en la regulación positiva de la germinación en *Arabidopsis thaliana* (Davies et al., 1985). Por el contrario, la germinación está influenciada de modo negativo principalmente por el ácido abscísico (ABA).

El ABA, además de regular la maduración y dormición de las semillas, juega un papel crítico en la respuesta a sequía y salinidad, acumulándose en las células vegetales bajo estrés hídrico, donde promueve el cierre estomático y regula la expresión de una gran cantidad de genes (Hirayama y Shinozaki 2007; Umezawa et al., 2010). Los procesos de fosforilación/desfosforilación de proteínas y la activación transcripcional son esenciales en las rutas de transducción de señales hormonales y más concretamente, en la señalización de ABA (Trewavas et al., 1988; Schweighofer et al., 2004, 2008).

Las proteín-fosfatasas proporcionan reversibilidad a los mecanismos de fosforregulación, gobernando de este modo un amplio espectro de procesos en plantas. Así, regulan muchos aspectos del metabolismo celular y participan en la modulación de las rutas de señalización hormonal. De hecho, está ampliamente descrita la implicación de este tipo de proteínas en la transducción de los estímulos mediada por ABA. En *Arabidopsis* se han identificado 112 secuencias que presentan el dominio catalítico típico de las proteín-fosfatasas (Schweighofer et al., 2004), dentro de las cuales las proteín-fosfatasas de tipo 2C (PP2Cs) han sido las más estudiadas.

Alineamientos de las secuencias aminoacídicas realizados con anterioridad entre PP2Cs de *Arabidopsis* y otras especies vegetales, revelan una alta conservación del dominio catalítico de las PP2Cs a lo largo de la evolución. Las PP2Cs han sufrido numerosos eventos de duplicación que preceden a la especiación y diversificación de la función de las proteínas, sugiriendo que algunos miembros de esta familia tienen funciones específicas.

En concreto, los mutantes de PP2C en *Arabidopsis* demuestran reacciones alteradas en los procesos regulados por el ABA. Anteriormente, hemos aislado y caracterizado una PP2C de haya

FsPP2C1 (Lorenzo et al., 2001; González - García et al., 2003 ), revelaron que plantas que sobreexpresan FsPP2C1 se comportan como los mutantes *abi1-1* y *abi2-1*, ya que mostraron una severa reducción en la expresión de *RAB18* tras el tratamiento con ABA. A partir de estos resultados, podemos concluir que FsPP2C1 funciona como un regulador negativo de la señalización de ABA en *Arabidopsis*, con un papel importante en la transducción de señales mediada por ABA tanto en la dormición, germinación y diferentes respuestas a estrés abiótico (Lorenzo et al., 2001; González-García et al., 2003).

## **2.- EL RECEPTOR DE ABA PYL8/RCAR3 INTERACCIONA CON FsPP2C1 E INHIBE SU ACTIVIDAD.**

Con esta información, iniciamos la búsqueda de posibles sustratos celulares de FsPP2C1 por medio del análisis de doble-híbrido en levadura (Fig. R.1). Así, hemos identificado tres proteínas diferentes que interactúan fuertemente con FsPP2C1 (PP2C-IPs) (Tabla. R.1).

De las tres proteínas que interactúan fuertemente, se ha elegido una de ella, PYL8/RCAR3 (Fig. R.2) la cual se ha caracterizado como perteneciente a la familia BetV I (Fig. R.4). Esta familia se caracteriza por la presencia de dominios bien conservados hallados en distintos alérgenos de plantas y particularmente en el caso del polen del abedul blanco. Sin embargo, una característica común entre los muchos componentes de esta superfamilia, es la unión a un compuesto hidrofóbico. Los datos que hemos obtenido para algunos miembros de la familia PYR / PYL indican que son parte de un mecanismo dependiente de ABA para regular la actividad PP2C1 , y por lo tanto, la señalización de ABA (Radauer et al., 2008).

Comprender cómo el ABA es percibido en la célula y cómo sus señales transducidas, era una parte fundamental para comprender mejor la vía de señalización de ABA. Hasta ahora, se han propuesto algunos

candidatos, a tener una función en la percepción de ABA en las células, se han planteado numerosas preguntas acerca de su implicación en la señalización de ABA.

El primer receptor del ABA descrito fue FCA (Razem et al., 2006). Su identificación se basó en la similitud de su secuencia con ABAP1, una proteína de unión a ABA. Desafortunadamente, el papel de FCA como un receptor del ABA se puso en duda cuando el ensayo no pudo ser reproducido (Risk et al., 2008).

ChIH / ABAR se definió como un receptor del ABA que reside en cloroplastos y media las respuestas a ABA en la germinación de semillas, el crecimiento post-germinativo y apertura de estomas. Además, la expresión de genes de respuesta a ABA también se vio afectada por cambios en la expresión de ChIH (Shen et al., 2006). Este receptor fue identificado como un homólogo del receptor del ABA (ABAR) de habas (Zhang et al., 2002). ChIH fue identificado como una subunidad de la magnesio protoporfirina IX quelatasa. Además de las dudas sobre la ChIH como receptor de ABA en Arabidopsis, ChIH de cebada fue incapaz de unirse a ABA y sus mutantes de pérdida de función mostraron una respuesta normal a ABA. Esto sugiere que la ChIH de cebada no funciona como un receptor de ABA o que las proteínas ChIH juegan un papel diferente, con respecto a la percepción y señalización de ABA, entre las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (Müller y Hansson, 2009). Sin embargo, a pesar de que se describe un modelo que relaciona los eventos de señalización primaria a ABA con la expresión de genes regulados por esta hormona, este modelo presenta algunas inconsistencias y preguntas pendientes. Una de las inconsistencias es la función de ABAR que interactúa con las proteínas WRKY. La caracterización de ChIH en mutantes de pérdida de función, parecía revelar que ChIH juega un papel en la regulación estomática (Shen et al., 2006; Legnaioli et al., 2009; Tsuzuki et al., 2011). Sin embargo, a pesar



de que las dos proteínas se conectan en el modelo propuesto por Sheng et al., ( 2010 ), ninguno de los mutantes WRKY de pérdida de función presenta fenotipos en estomas (Chen et al., 2010; Shang et al., 2010).

En el caso de GCR2, se identificó a través de aproximaciones “in silico” como un posible candidato a ser un receptor del ABA extracelular (Liu et al., 2007). La proteína G heterométrica (GPA1 y AGB1), que presenta fenotipos de respuesta a ABA (Pandey et al., 2006 ), se predijo (GPCR) que podría funcionar como un receptor de ABA. GCR2 parecía encajar con todos los requisitos, ya que se preveía que era una proteína de membrana, y el mutante *gcr2* presentaba fenotipo de insensibilidad a ABA. Sin embargo, trabajos publicados entre 2007 y 2009 han planteado interrogantes sobre la función de GCR2 en la señalización de ABA (Gao et al., 2007; Johnston et al., 2007; Guo et al., 2008; Risk et al., 2009). Aparentemente, GCR2 no es una proteína transmembrana como se predijo. Los programas de predicción utilizados por Liu et al. (2007) eran conocidos por ser propensos a los falsos positivos y sin la incorporación de un filtro adecuado para evitar este problema, que se integró en la versión más reciente del software DAS. La nueva predicción de GCR2, usando este filtro, no la reconoció como una proteína 7TM.

De una forma concluyente las proteínas PYR/PYL/RCAR se identificaron de forma paralela en grupos de investigación con diferentes enfoques, y fueron descritas como receptores intracelulares de ABA, ya que se localizan en el citosol y en el núcleo de la célula (Ma et al., 2009; Park et al., 2009; Nishimura et al., 2010; Saavedra et al., 2010; Santiago et al., 2009). La localización intracelular de estos receptores de ABA reveló la importancia de la absorción del ABA en la célula, con el fin de que el proceso de señalización se produzca.

La caracterización bioquímica y funcional de estas proteínas han proporcionando evidencias definitivas de su función como receptores de ABA.

Ma et al. (2009) identificó una familia de 14 miembros, con el nombre RCAR, en ensayos de doble híbrido en levadura para proteínas que interactúan con PP2C de plantas y que regulan negativamente la señalización del ABA. Las proteínas RCAR se unen al ABA y bloquean la actividad fosfatasa de PP2Cs. La afinidad del ABA al complejo de proteína RCAR-PP2C es mucho mayor que la del RCAR, la cual consiste en un complejo receptor heteromérico. Al mismo tiempo, Park et al. (2009) identificaron la misma familia de proteínas conformada por 14 miembros nombrados PYR1 y PYL, los cuales son funcionalmente redundantes y producen respuestas múltiples en ABA. Además, utilizando métodos bioquímicos y genéticos encontraron que el ABA promueve la interacción de PYR1 con las PP2Cs de grupo A, lo que conduce a la inhibición de la actividad enzimática de la PP2C. A la luz de estos resultados, se concluye que las PYR1, PYL, y RCAR forman una gran subfamilia de receptores citosólicos del ABA que pertenecen a la familia BetV I y que actúan uniéndose e inhibiendo a las proteínas fosfatasas de tipo 2C, lo que desencadena una cascada de activación de proteínas que intervienen en la fosforilación reversible que produce las respuestas a ABA (Ma et al., 2009, Park et al., 2009b).

El análisis filogenético demuestra que la familia de genes PYR-PYL/RCAR ha sido objeto de varios eventos de duplicación génica, y estos eventos de duplicación son anteriores a la especiación de las dicotiledóneas, monocotiledóneas y musgos, y que conduce a los seis clados distintos (Figura R5). Los datos disponibles a partir de proyectos de secuenciación, han puesto de manifiesto la conservación de las PYR1-PYL/RCAR en el musgo (*Physcomitrella patens*) y en el helecho (*Selaginella moellendorffii*). Se distinguen diferentes subgrupos PYR1-

PYL/RCAR, y están presentes en todas las especies vegetales analizadas en al menos un subgrupo, lo que sugiere la probable existencia de ortólogos en todos los genomas considerados, así como en el antepasado común de todas las especies examinadas. Uno de los clados contiene exclusivamente las secuencias de las plantas inferiores *P. patens* y *S. moellendorffii*, lo que sugiere que este linaje de plantas contiene una copia de proteínas BetV I con funciones especializadas. Además, se distinguen claramente tres clados, que incluyen la mayoría de los PYR1-PYL/RCARs de plantas superiores, donde están presentes duplicaciones, y otros dos clados que incluyen *Arabidopsis* y una o dos especies superiores.

El lugar de acción de las PP2Cs del grupo A en las plantas no está todavía suficientemente aclarado. En diferentes trabajos se ha descrito la localización tanto nuclear como citoplasmática (Himmelbach et al., 2002; Moes et al., 2008). El análisis de la localización subcelular de la proteína FsPP2C1 se ha llevado a cabo mediante transformación transitoria de células de epidermis de cebolla por biobalística, fusionándola al extremo C-terminal de la proteína GFP. Estos estudios han revelado la localización tanto nuclear como citosólica de la proteína (Fig. R.17). Asimismo, la expresión de PYL8/RCAR3 fusionada a la proteína GFP ha revelado que se distribuye en toda la célula (Fig. R.17).

Tras la verificación individual de las interacciones en levadura entre las proteínas FsPP2C1 y proteínas de la familia PYR1/PYL-RCAR, decidimos comprobar la interacción “in vivo”, donde se localizaba esta interacción. El análisis se ha llevado a cabo mediante la técnica de complementación bimolecular fluorescente (BiFC), y la detección de fluorescencia, lo que indica la existencia de interacción entre FsPP2C1 y PYL8/RCAR3. Así se ha comprobado que existe interacción y que esta interacción tiene lugar específicamente en el núcleo (Fig. R.10), lo que concuerda con lo

obtenido en los ensayos BiFC de PYL5/RCAR8, mostrando la especificidad de la interacción de FsPP2C1 con la familia PYR1/PYL-RCAR (Ma et al., 2009; Saavedra et al., 2010).

Es importante señalar que la mayor parte de las PP2Cs del clado A no son proteínas nucleares (Cherel et al., 2002; Guo et al., 2002; Ohta et al., 2003; Miao et al., 2006; Yang et al., 2006; Yoshida et al., 2006a). Sin embargo la interacción se produce en el núcleo.

Para comprobar la funcionalidad de PYL8/RCAR3 sobre FsPP2C1, se planteó analizar la actividad fosfatasa “in vivo” de FsPP2C1 tras la interacción. Para realizar con este ensayo, previamente las proteínas de fusión han sido expresadas, purificadas y renaturalizadas (Fig. R.16). El ensayo de actividad fosfatasa “SensoLyte FDP” está optimizado para detectar la actividad utilizando 3,6 fluorescein-bi-phosphate como sustrato fluorogénico. Durante la reacción el sustrato y las proteínas producirán un compuesto amarillo soluble en agua, el cual puede ser detectado y cuantificado por un lector de placas de ELISA (Fig. R.17). Este ensayo se basa en la hidrólisis del sustrato fluorogénico con liberación Pi, determinando el grado de hidrólisis espectrofotométricamente.

La adición creciente de la proteína PYL8/RCAR3 inhibe la actividad fosfatasa de FsPP2C1 (Fig. R.17), lo que sugiere que PYL8/RCAR3 es un inhibidor de las PP2Cs.

### **3.- EL ANÁLISIS FUNCIONAL DE PYL8/RCAR3 MUESTRA SU PAPEL COMO REGULADOR POSITIVO DE LA SEÑALIZACIÓN DE ABA.**

Era necesario tener evidencias genéticas para determinar si PYL8/RCAR3 funcionaba como un regulador positivo o como un inhibidor de la señalización de ABA. Hemos abordado el presente estudio con el enfoque de ganancia de función de PYL8/RCAR3 con el promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor en el sistema modelo

de *Arabidopsis* (Fig. R.19), utilizando el método *floral dip* para lograr la transformación de los gametos de la planta.

La sobreexpresión de *PYL8/RCAR3* da como resultado en una hipersensibilidad a ABA en semillas de *Arabidopsis*. A diferencia de los mutantes *abi*, las semillas de las plantas transgénicas *35S:PYL8/RCAR3* mostraron mayor dormición (Fig. R.23), lo cual indica una mayor respuesta en semillas al ABA endógeno (Gosti et al., 1999). En efecto, mientras la germinación de las semillas de *Arabidopsis* tipo silvestre no fue reprimida por 0,5 $\mu$ M de ABA, las semillas transgénicas *PYL8/RCAR3* no fueron capaces de mostrar la aparición de radícula y desarrollo de cotiledones verdes bajo estas condiciones, como si lo hace el mutante ABA hipersensible *hab1-1* (Sáez et al., 2006). Estos datos en conjunto son consistentes con el papel de *PYL8/RCAR3* como un regulador positivo de la señalización de ABA en semillas.

La función fisiológica del *PYL8/RCAR3* se ve reforzada por el ensayo de germinación en presencia de paclobutrazol (PCB) (Fig. R.24), que es un inhibidor de la biosíntesis de GAs. Las GAs y el ABA tienen papeles antagónicos en la germinación de semillas, y los mutantes insensibles o deficientes en ABA necesitan menos GAs durante la germinación (Léon-Klossterziel et al., 1996). Es evidente que en las semillas *35S:F<sub>s</sub>PP2C1* el requerimiento de GAs se reduce claramente comparado con las de tipo silvestre, y lo mismo sucede en las semillas que sobreexpresan el gen *HAB1* de *Arabidopsis* (Saéz et al., 2004), lo que sugiere que la expresión constitutiva de *PYL8/RCAR3*, inhibe la germinación de semillas.

En contraste con la mayoría de los demás miembros *PYL1-PYL/RCAR*, *PYL7/RCAR2* muestra un perfil de expresión génica opuesta, con incremento de la expresión en respuesta al ABA, sal, estrés osmótico o sequía. Una comparación de los niveles de transcripción de *PYL8* versus *PYL7* en distintos tejidos y etapas de desarrollo de la planta destaca

diferentes patrones de expresión en el desarrollo de semillas, semillas secas, embebidas, y plántulas (Fig R.26,R.27), lo cual podría indicar distintas funciones para algunos miembros de esta nueva familia.

Otro papel importante del ABA es impedir la germinación cuando el aporte de agua no es adecuado (González-Gúzman et al., 2002). Evidencias convincentes han demostrado que las condiciones de estrés retrasan la germinación de las semillas inhibiendo el comienzo del desarrollo de la plántula cuando las condiciones no son favorables. Varios estudios demuestran que el ABA tiene un papel en estos procesos, ya que los mutantes insensibles y deficientes en ABA son capaces de resistir a estas condiciones a estrés (Werner and Finkelstein, 1995; López- Molina et al., 2001), mientras los mutantes hipersensibles no son capaces (Sáez et al.,2006). Como previamente se había observado con *hab1* (Sáez et al.,2004), las líneas de sobreexpresión del *PYL8/RCAR3* no fueron capaces de germinar y desarrollar plántula en medio suplementado con manitol (200mM) (Fig R.26), así como en presencia de concentraciones bajas de sal (125mM NaCl) (Fig R.27) comparado con la capacidad germinativa de las plantas de tipo silvestre. Estos resultados indican que *PYL8/RCAR3* produce hipersensibilidad general al estrés osmótico y están de acuerdo con la evidencia de que los transcritos *PYL8/RCAR3* están altamente afectados por la falta de agua en *Arabidopsis*. Por tanto, la sobreexpresión de *PYL8/RCAR3* en *Arabidopsis* promueve la inhibición de la germinación de semillas cuando el aporte de agua no es adecuado y contribuye a la respuesta a estrés.hídrico.

Entre las respuestas mediadas por ABA, otra de las más conocidas es la regulación del cierre estomático. En condiciones de carencia de agua, el ABA promueve el cierre de estomas reduciendo la pérdida de agua por transpiración para evitar la desecación de la planta. Varios mutantes de

*Arabidopsis* (*abi1*, *abi2*, *gca2* y *ost1*), están afectados en el cierre estomático inducido por ABA y son incapaces de reducir la transpiración en condiciones de sequía (Pei et al.,2000).

Se ha descrito que las proteínas PYR/PYL/RCAR regulan las respuesta no transcripcionales de la hormona en el control de cierre de estomas (Lee et al., 2009; Geiger et al., 2010), interactuando directamente e inhibiendo la actividad del clado A de PP2Cs, que conduciría la activación de SnRK2, ya sea por autofosforilación o por la acción de otras quinasas activadoras (UAKs). Además SnRK2 regula el cierre de los estomas mediante la activación del canal de iones. Por otra parte, el complejo PYR/PYL/RCAR-ABA-PP2C también regula la activación de las proteína kinasa dependiente del calcio (CPK) y participan en la regulación de flujo de iones (Fuji et al., 2009; Geiger et al., 2009; Sirichandra et al., 2009).

Para comprobar si *PYL8/RCAR3* tiene alguna función que regule la transpiración, hemos examinado su efecto sobre la respuesta fisiológica de tolerancia a la sequía. De acuerdo con nuestros resultados, *PYL8/RCAR3* induce el cierre de estomas, suprime la pérdida de agua y promueve la tolerancia a la sequía, respuesta que no presentan las plantas de tipo silvestre. En efecto, después de 7 días bajo condiciones de sequía (sin aporte de agua), las plantas *35S:PYL8/RCAR3* (Fig. R.27b) se mantuvieron verdes y turgentes, mostrando así una marchitez tardía durante la pérdida progresiva de agua, mientras que el mutante *abi1-1* y del tipo silvestre (Col-0) demostraron un marchitamiento irreversible.

La sobreexpresión de *PYL8/RCAR3* demostró que *PYL8/RCAR3* confiere mayor resistencia a la sequía en *Arabidopsis*, vinculando directamente a estas proteínas en la regulación de la respuesta a estrés hídrico en plantas (Santiago et al.,2009a).

Un análisis adicional de la respuesta al ABA en los tejidos vegetativos indicó que la inhibición del crecimiento de la raíz era mayor en las plantas *35S:PYL8/RCAR3* en medio suplementado con ABA en concentraciones de 3 a 5 $\mu$ M fue mayor en las plantas *35S:PYL8/RCAR3*, demostrando una vez más que las plántulas que sobreexpresan esta proteína son más sensibles al ABA en esta etapa de desarrollo. El efecto inhibitorio de altas concentraciones del ABA sobre el crecimiento de las raíces ha sido atribuido a la activación de la vía de señalización al etileno (Beaudoin et al., 2000; Ghassemian et al., 2000).

Aunque FsPP2C1 y los correspondientes ortólogos PP2C que pertenecen al clado A (Schweighofer et al., 2004) han sido descritos como reguladores negativos de la señalización del ABA, son fuertemente inducidos por ABA como algún mecanismo de realimentación negativa (Lorenzo et al., 2001; Merlot et al., 2001; González-García et al., 2003). Por el contrario, la expresión de *PYL8/RCAR3* ha sido fuertemente muy inhibida por estrés salino y osmótico, así como por el tratamiento con ABA (Fig. R.23). Por tanto, la expresión del clado A de las PP2Cs y la mayoría de los *PYL-PYL/RCAR* reflejan un patrón opuesto, que entraría en el mecanismo regulatorio de retroalimentación negativa, teniendo en cuenta que las proteínas *PYL-PYL/RCAR* inhiben la actividad de las PP2Cs (Ma et al., 2009; Park et al., 2009b; Santiago et al., 2009).

Para analizar si el aumento de la sensibilidad al ABA en las líneas transgénicas *PYL8/RCAR3* iba acompañada por una modificación en la expresión de genes de respuesta al ABA, comparamos la inducción de varios genes marcadores de la respuesta al ABA (*RAB18*, *P5CS1*, *RD29A* y *RD29B*) en las líneas *35S:PYL8/RCAR3* y también en el fenotipo silvestre (Col-0) y en el mutante *abi1-1* (Fig. R.29). *RAB18* (Lang y Palva, 1992; Parcy et al., 1994) presenta una fuerte inducción por esta hormona y su expresión está drásticamente inhibida en los mutantes *abi1-1* y *abi2-1*



(Leung et al., 1997). *P5CS1* es inducido por sequía, salinidad y ABA, se reduce en aproximadamente un 50% en el mutante *abi1-1* en comparación con las plantas de tipo silvestre (Strizhov et al., 1997). Del mismo modo, *RD29A* y *RD29B* son genes regulados por frío y sequía, y contienen elementos de respuesta a ABA en sus promotores. *RD29A* contiene, además, el elemento de respuesta a la deshidratación (DRE), que participa en una respuesta rápida a las condiciones de deshidratación o estrés salino (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994).

Para tener mas evidencias de la función de *PYL8/RCAR3*, abordamos la caracterización de un mutante de pérdida de función por inserción de T-DNA para *PYL8/RCAR3*. Ensayos de germinación en presencia de ABA, encontramos que el mutante de pérdida de función presenta menor sensibilidad que el correspondiente tipo silvestre, y difiere con la germinación que presentan las plantas que sobreexpresan *PYL8/RCAR3*

Según datos ya descritos, *PYL8/RCAR3* se induce por etileno. El gen *PYL8/RCAR3* se induce claramente tras un tratamiento con el precursor de etileno (ACC), pero esta inducción no tiene lugar en el mutante insensible a etileno *ein 2-5* ni en el de pérdida de función de este gen. Estos resultados muestran la posible implicación de otras hormonas, como el etileno, en la regulación transcripcional del gen *PYL8/RCAR3*.

Las características de *PYL8/RCAR3*, esto es, su interacción con las PP2Cs relacionadas con las respuestas al ABA y su regulación por ABA en semillas, hacen de esta proteína un buen candidato para regular la señalización del ABA en semillas y, consecuentemente, un regulador de la dormición. Fue necesario obtener evidencias genética para determinar si *PYL8/RCAR3* funciona como un regulador positivo o un inhibidor de la dormición, la germinación de semilla y las respuesta a estreses. La sobre-expresión de *PYL8/RCAR3* en *Arabidopsis* dio como resultado una hipersensibilidad al ABA en las semillas (Fig R.23) Basado en estos resultados, concluimos que *PYL8/RCAR3* es un regulador

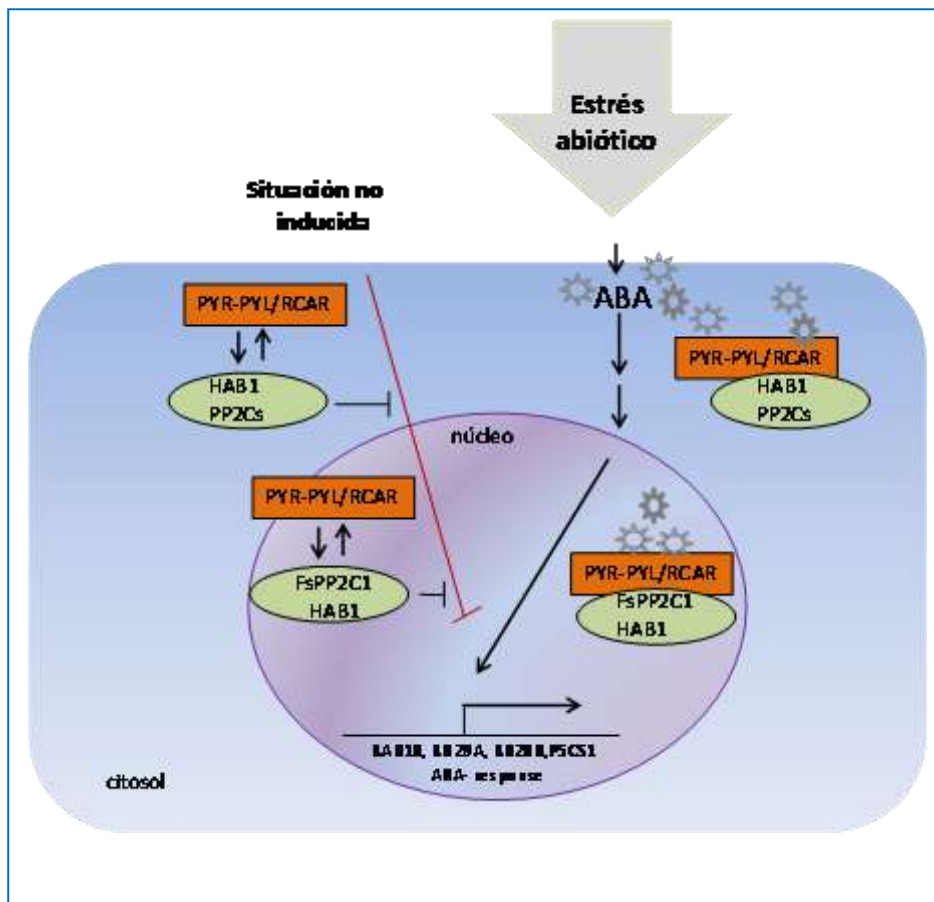
positivo de la dormición y de la señalización del ABA, ya que su expresión constitutiva en *Arabidopsis* lleva a respuestas aumentadas al ABA en las semillas y consecuentemente, a una mayor dormición.

En la búsqueda de más evidencias funcionales sobre *PYL8/RCAR3* como regulador positivo de *FsPP2C1*, se obtuvieron dobles transgénicas *PYL8;FsPP2C1* y se confirmó el papel de *PYL8/RCAR3*. La sobreexpresión de *35S:PYL8/RCAR3;35S:FSP2C1* conduce a una sensibilidad a ABA con respecto a las semillas que sobreexpresan solo *35S:FSP2C1*, y el fenotipo de germinación de las semillas de las dobles transgénicas es similar a la que presenta *35S:PYL8/RCAR3*, lo que confirma que *PYL8/RCAR3* es un regulador positivo de las PP2C.

#### **4.- MODELO PROPUESTO DE LA INTERACCIÓN *PYL8/RCAR3* CON *FsPP2C1* Y OTRAS PP2Cs**

El modelo hipotético que se muestra en la Fig D.1, tiene en cuenta que las PP2Cs son reguladores negativos de la señalización de ABA y que la interacción con esta nueva familia de receptores PP2C ( *PYL1-PYL/RCAR*) daría lugar a la modificación de la percepción de ABA o la inactivación de la actividad PP2C. En cuanto a la interacción funcional, las diferencias en la sensibilidad a la hormona y la selectividad entre diferentes miembros de las *PYL1-PYL/RCAR* dejan preguntas aún por responder.

Los 14 miembros que pertenecen a la familia BetV I y pueden interactuar directamente con las PP2Cs del clado A de *Arabidopsis* (nueve miembros) formando diferentes complejos de percepción.



**Figura D.1** Modelo esquemático que describe la interacción de PP2C-PYL/RCAR. En ausencia de ABA las proteínas PYR1-PYL/RCAR pueden interactuar con las PP2Cs, pero las PP2Cs permanecen activas. Tras la percepción del ABA, las proteínas PYR1-PYL/RCAR interactúan con las PP2Cs, inactivándolas, y por consiguiente permitiendo la transcripción de genes de respuesta a ABA.



**CONCLUSIONES**

## CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos de la búsqueda de nuevos interactores de la proteín-fosfatasa de tipo 2C FsPP2C1 y del aislamiento y caracterización de uno de ellos, regulado por ABA y relacionado con la germinación de semillas, nos han permitido llegar a las siguientes conclusiones:

1.- Se han identificado dos proteínas, denominadas PYL8 y PYL7, pertenecientes a la familia BetV I de receptores de ABA, que funcionan como interactores de FsPP2C1.

2.- La expresión de PYL8/RCAR3 en *E. coli* y su utilización en ensayos de actividad fosfatasa *in vitro* ha permitido determinar que PYL8/RCAR3 actúa como inhibidor de la actividad fosfatasa de FsPP2C1.

3.- Los ensayos de interacción proteína-proteína empleando la técnica de complementación bimolecular fluorescente (BiFC), muestran que la proteína FsPP2C1 es capaz de interactuar *in vivo* con varios componentes de la familia de proteínas PYR1/PYLRCAR, descritas como receptores de ABA, y que la interacción se produce en el núcleo, concordando con lo observado en los ensayos de localización subcelular mediante transformación transitoria de tejido vegetal y el uso de plantas transgénicas sobreexpresoras de PYL8 y FsPP2C1. Por otra parte, la mutación *hab1G245E* impide la formación del complejo receptor de ABA entre la PP2C y las proteínas PYR1/PYL-RCAR, sin provocar cambios en la distribución subcelular de la proteína, lo que apoya la participación de PYL8 en la percepción de la hormona.

4.- PYL8 codifica una proteína que participa en la regulación de la señalización del ABA durante los procesos de germinación y desarrollo temprano, así como en las respuestas a estreses. El mutante *pyl8* presenta bajos niveles de dormición, es insensible a la adición exógena de ABA y Paclobutrazol durante la germinación y los primeros estadios del desarrollo, así como a la presencia de estreses abióticos por cloruro sódico y manitol.

5.- La sobreexpresión de PYL8 en *Arabidopsis* produce un aumento de la dormición de semillas e impide la germinación en concentraciones inhibitorias de ABA, en presencia de paclobutrazol y en medios que provocan estrés osmótico, lo que significa que PYL8 confiere una hipersensibilidad al ABA similar a la de los mutantes *era* y *hab*

(hipersensibles al ABA), indicando que PYL8 puede funcionar como regulador positivo en la señalización del ABA. Además, la capacidad germinativa de las semillas transgénicas en presencia de paclobutrazol, inhibidor de la síntesis de GAs, demuestra que el comienzo de la germinación no sólo requiere una acción positiva de las GAs, sino también una regulación negativa de la ruta del ABA.

6.- Las plantas transgénicas que sobreexpresan PYL8 también muestran hipersensibilidad a la inhibición del crecimiento de la raíz provocada por el ABA en las primeras etapas del desarrollo de este órgano, sin embargo, esta proteína tiene también efecto en la pérdida de agua por transpiración regulada por ABA. Estos fenotipos de hipersensibilidad al ABA, junto con la inducción de PYL8 específicamente en semillas, nos permiten concluir que esta proteína ejerce su función reguladora fundamentalmente en las respuestas al ABA en las semillas, participando probablemente en el mantenimiento de la dormición y/o inhibición de la germinación, en las respuestas a estreses y en los primeros estadios del crecimiento de la raíz, y tiene una función específica en la regulación por ABA de la pérdida de agua por transpiración.

7.- La sobreexpresión de PYL8 aumenta la expresión de genes inducibles por ABA, lo que confirma que esta proteína participa en la cascada de señalización del ABA actuando como un regulador positivo de la señal hormonal, al igual que se ha descrito para otros receptores de esta hormona. Además, induce la expresión génica en condiciones de estrés que actúan por rutas dependientes de ABA, como estrés hídrico y salino, aunque no puede asociarse a una respuesta general a los estreses abióticos. La sobreexpresión simultánea de PYL8 y FsPP2C1 suprime la insensibilidad al ABA, confirmando el papel de PYL8 como regulador positivo del ABA.

8.- Como conclusión final, podemos decir que los resultados presentados en esta memoria sobre los efectos del ABA en la germinación de semillas, así como en la regulación de estreses abióticos, nos han permitido demostrar la participación de la PYL8 como un regulador positivo de la ruta de señalización del ABA. La sobreexpresión de PYL8 en *Arabidopsis thaliana* y los análisis fenotípicos y moleculares realizados, nos han permitido comprobar la importancia de esta proteína en la señalización del ABA.



## **BIBLIOGRAFIA**





1. Abe H., Urao T., Ito T., Seki M., Shinozaki K. y Yamaguchi-Shinozaki K. 2003. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15: 63-78.
2. Aldasoro J.J., Matilla A. y Nicolás G. 1981. Effect of ABA, fusicoccin and thiourea on germination and K<sup>+</sup> and glucose uptake in chick-pea seeds at different temperatures. *Physiol. Plant.* 53: 139-145.
3. Alonso J.M., Hirayama T., Roman G., Nourizadeh S. y Ecker J.R. 1999. EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. *Science* 284: 2148-2152.
4. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402
5. Anderberg R.J. y Walker-Simmons M.K. 1992. Isolation of a wheat cDNA clone for an abscisic acid-inducible transcript with homology to deprotein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10183-10187.
6. Anderson B.E., Ward J.M. y Schroeder J.I. 1994. Evidence for an extracellular reception site for abscisic acid in *Commelina* guard cells. *Plant Physiol.* 104: 1177-1183.
7. Assmann S.M. 2004. Plant Gteins, phytohormones, and plasticity: three questions and a speculation. *Sci. STKE.* 264.
8. Azcon Bieto y Talon. 2008. *Fundamentos de fisiología vegetal.* McGraw Hill Interamerica.
9. Beaudoin N, Serizet C, Gosti F, Giraudat J (2000) Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell* 12: 1103–1115
10. Beaudoin N., Serizet C., Gosti F. y Giraudat J. 2000. Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell* 12: 1103-1115.
11. Bensmihen S, Rippha S, Lambert G, Jublot D, Pautot V, Granier F, Giraudat J, Parcy F (2002) The homologous ABI5 and EEL transcription

factors function antagonistically to fine-tune gene expression during late embryogenesis. *Plant Cell* 14: 1391–1403

12. Berrie A.M.M. y Robertson J. 1976. Abscisic acid as an endogenous component in lettuce fruits, *Lactuca sativa* L. cv. Grand Rapids. Does it control thermodormancy? *Planta* 131: 211-215.

13. Bewley J.D. 1980. Secondary dormancy (skotodormancy) in seeds of lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. Grand Rapids) and its release by light, gibberellic acid and benzyladenine. *Physiol. Plant.* 49: 277-280.

14. Bewley J.D. 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9: 1055-1066.

15. Bewley J.D. y Black M. 1994. Dormancy and the control of germination. En: "Seeds. Physiology of Development and Germination". (Bewley J.D. y Black M. eds.). Plenum Press, New York, pp: 199-272.

16. Bewley JD (1997) Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9: 1055–1066

17. Birnboim H.C. y Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* 7: 1513-1523.

18. Bleecker A.B. y Kende H. 2000. Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.* 16: 1-18.

19. Busk P.K. y Pagés M. 1997. Protein binding to the abscisic acid-responsive element is independent of VIVIPAROUS1 in vivo. *Plant Cell* 9: 2261-2270.

20. Busk P.K. y Pagés M. 1998. Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol. Biol.* 37: 425-435.

21. Calvo A.P. 2002. Regulación de la dormición de semillas de haya (*Fagus sylvatica* L.): Aislamiento y caracterización de clones implicados en la biosíntesis de etileno y giberelinas y en las respuestas de estas hormonas. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.

22. Calvo A.P., Jiménez J.A., Nicolás C., Nicolás G. y Rodríguez D.

2003. Isolation and characterization of genes related with the breaking of beechnuts dormancy and putatively involved in ethylene signal perception and transduction. En: "The Biology of Seeds: Recent Research Advances" (Nicolás G., Bradford K.J., Côme D. y Pritchard H. eds.). CAB International, Wallingford, U.K, pp: 141-149.
23. Calvo A.P., Nicolás C., Lorenzo O., Nicolás G. y Rodríguez, D. 2004a. Evidence for positive regulation by gibberellins and ethylene of ACC oxidase expression and activity during transition from dormancy to germination in *Fagus sylvatica* L. seeds. *J. Plant Growth Reg.* 23: 44-53.
24. Calvo A.P., Nicolás C., Nicolás G. y Rodríguez D. 2004b. Evidences of a cross talk between gibberellins and ethylene in the regulation of a GA 20-oxidase (FsGA20ox1) during the breaking of dormancy in *Fagus sylvatica* L. seeds. *Physiol. Plant.* 120: 623-630.
25. Campalans A, Messeguer R, Goday A, Pagès M (1999) Plant responses to drought, from ABA signal transduction events to the action of the induced proteins. *Plant Physiol Biochem* 37: 327–340
26. Campalans A., Messeguer R., Goday A. y Pagés M. 1999. Plant responses to drought, from ABA signal transduction events to the action of the induced proteins. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 327-340.
27. Chang C. y Shockey J.A. 1999. The ethylene-response pathway: signal perception to gene regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 352-358.
28. Chang C., Kwok S.F., Bleecker A.B. y Meyerowitz E.M. 1993. Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science* 262: 539-544.
29. Chang M., Wang B. Chen X. y Wu R. 1999. Molecular characterization of catalytic-subunit cDNA sequences encoding protein phosphatases 1 and 2A and study of their roles in the gibberellin-dependent Osamy-c expression in rice. *Plant Mol. Biol.* 39: 105-115.
30. Cheng A., Kaldis P. y Solomon M.J. 2000. Dephosphorylation of human cyclin-dependent kinases by protein phosphatase type 2C  $\alpha$  and  $\beta$  2 isoforms. *J. Biol. Chem.* 275: 34744-34749.

31. Cherel I, Michard E, Platet N, Mouline K, Alcon C, Sentenac H, Thibaud JB (2002) Physical and functional interaction of the Arabidopsis K<sup>+</sup> channel AKT2 and phosphatase AtPP2CA. *Plant Cell* 14: 1133–1146
32. Choi H, Hong J, Ha J, Kang J, Kim SY (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J Biol Chem* 275: 1723–1730
33. Christmann A, Moes D, Himmelbach A, Yang Y, Tang Y, Grill E (2006) Integration of abscisic acid signalling into plant responses. *Plant Biol (Stuttg)* 8: 314–325
34. Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 735–743
35. Cohen P. y Cohen P.T. 1989. Protein phosphatases come of age. *J. Biol. Chem.* 264: 21435-21438.
36. Cohen P.T. 1989. The structure and regulation of protein phosphatases. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 453-508.
37. Cohen P.T. 1997. Novel protein serine/threonine phosphatases variety in the spice of life. *Trends Biochem. Sci.* 22: 245-251.
38. Colorado P, Nicolás C., Nicolás G. y Rodríguez D. 1995. Expression of three ABA-regulated clones and their relationship to maturation processes during the embryogenesis of chick-pea seeds. *Physiol. Plant.* 94: 1-6.
39. Colorado P, Nicolás G. y Rodríguez D. 1991. Calcium dependence of the effects of abscisic acid on RNA synthesis during germination of *Cicer arietinum* seeds. *Physiol. Plant.* 83: 457-462.
40. Colorado P, Rodríguez A., Nicolás G. y Rodríguez D. 1994. Abscisic acid and stress regulate gene expression during germination of chick-pea seeds. Possible role of calcium. *Physiol. Plant.* 83: 461-467.
41. Corbineau F. y Côme D. 1992. Germination of sunflower seeds and its regulation by ethylene. En: "Advances in the Science and

Technology of Seeds” (Jiarui F. y Khan A.A. eds.). Science Press, Beijing, pp: 277-287.

42. Corbineau F., Bianco J., Garello G. y Côme D. 2002. Breakage of *Pseudotsuga menziesii* seed dormancy by cold treatment as related to changes in seed ABA sensitivity and ABA levels. *Physiol. Plant.* 114: 313-319.

43. Curtis MD, Grossniklaus U (2003) A Gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol* 133: 462–469

44. Cutler S, McCourt P (2005) Dude, where's my phenotype? Dealing with redundancy in signaling networks. *Plant Physiol* 138: 558–559

45. Davies J.K., Jensen E., Junttila O., Rivier L., and Crozier. 1985. Identification of endogenous gibberellins from *Salix pentandra*. *Plant Physiology.* 78: 473- 476.

46. Deblaere R, Bytebier B, De Greve H, Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, Leemans J (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res* 13: 4777–4788

47. Delseny M., Bies-Ethève N., Carles C., Hull G., Vicient C., Raynal M., Grellet F. y Aspart L. 2001. Late embryogenesis abundant (LEA) protein gene regulation during *Arabidopsis* seed maturation. *J. Plant. Physiol.* 158: 419-427.

48. Dulson J., Bewley J.D. y Johnston R.N. 1988. Abscisic acid is an endogenous inhibitor in the regulation of mannanase production by isolated lettuce (*Lactuca sativa* cv. Grand Rapids) endosperms. *Plant Physiol.* 87: 660-666.

49. Durand M., Thevenot C. y Côme D. 1975. Rôle des cotylédons dans la germination et la levée de dormance de l'axe embryonnaire de Pommier, après traitement de l'acide abscissique. *Physiol. Vég.* 13: 603-

610.

50. Dure L.S., Crouch M., Harada J., Ho T.H.D., Mundy J., Quatrano R., Thomas T. y Sung Z.R. 1989. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 12: 475-486.

51. Ecker J.R. 1995. The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* 268: 667-675.

52. Ecker J.R. y Davis R.W. 1987. Plant defense genes are regulated by ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5202-5206.

53. Faber C, Lindemann A, Sticht H, Ejchart A, Kungl A, Susani M, Frank RW, Kraft D, Breitenbach M, Rosch P (1996) Secondary structure and tertiary fold of the birch pollen allergen Bet v 1 in solution. *J Biol Chem* 271: 19243–19250

54. Fan L., Zheng S. y Wang X. 1997. Antisense suppression of phospholipase D $\alpha$  retards abscisic acid- and ethylene-promoted senescence of postharvest *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell* 9: 2183-2196.

55. Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C (2008) Molecular aspects of seed dormancy. *Annu Rev Plant Biol* 59: 387–415

56. Finkelstein R.R. 1994. Maternal effects govern variable dominance of two abscisic acid response mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 105: 1203-1208.

57. Finkelstein R.R. y Gibson S.I. 2002. ABA and sugar interactions regulating development: 'cross-talk' or 'voices in a crowd'? *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 26-32.

58. Finkelstein R.R. y Lynch T.J. 2000. The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* 12: 599-609.

59. Finkelstein R.R., Gampala S.S.L. y Rock C.D. 2002. ABA signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell.* 13: S15-S45.

60. Finkelstein R.R., Wang M.L., Lynch T.J., Rao S. y Goodman H.M. 1998. The *Arabidopsis* abscisic acid response locus *ABI4* encodes an

APETALA 2 domain protein. *Plant Cell* 10: 1043-1054.

61. Finkelstein RR, Gampala SS, Rock CD (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell (Suppl)* 14: S15–S45

62. Finkelstein RR, Lynch TJ (2000) The Arabidopsis abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* 12: 599–609

63. Finkelstein RR, Wang ML, Lynch TJ, Rao S, Goodman HM (1998) The Arabidopsis abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA 2 domain protein. *Plant Cell* 10: 1043–1054

64. Formstecher E, Aresta S, Collura V, Hamburger A, Meil A, Trehin A, Reverdy C, Betin V, Maire S, Brun C, et al (2005) Protein interaction mapping: a Drosophila case study. *Genome Res* 15: 376–384

65. Fromont-Racine M, Rain JC, Legrain P (1997) Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat Genet* 16: 277–282

66. Fujii H, Verslues PE, Zhu JK (2007) Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell* 19: 485–494

67. Ghassemian M, Nambara E, Cutler S, Kawaide H, Kamiya Y, McCourt P (2000) Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* 12: 1117–1126

68. Gilmour S.J. y Thomashow M.F. 1991. Cold acclimation and cold-regulated gene expression in ABA mutants of Arabidopsis thaliana. *Plant Mol. Biol.* 17: 1233-1240.

69. Gilroy S. y Jones R.L. 1992. Gibberellic acid and abscisic acid coordinately regulate cytoplasmic calcium and secretory activity in barley aleurone protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3591-3595.

70. Gilroy S. y Jones R.L. 1994. Perception of gibberellin and abscisic



acid at the external face of the plasma membrane of barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone protoplasts. *Plant Physiol.* 104: 1185-1192.

71. Gilroy S., Read N.D. y Trewavas A.J. 1990. Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol triphosphate initiates stomatal closure. *Nature* 346: 769-771.

72. Giraudat J, Hauge BM, Valon C, Smalle J, Parcy F, Goodman HM (1992) Isolation of the Arabidopsis ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell* 4: 1251–1261

73. Giraudat J. 1995. Abscisic acid signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 232-238.

74. Giraudat J., Hauge B.M., Valon C., Smalle J., Parcy F. y Goodman H.M. 1992. Isolation of the Arabidopsis ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell* 4: 1251-1261.

75. Giraudat J., Parcy F., Bertauche N., Gosti F., Leung J., Morris P.C., Bouvier-Durand M. y Vartanian N. 1994. Current advances in abscisic acid action and signaling. *Plant Mol. Biol.* 26: 1557-1577.

76. Goldberg J., Huang H., Kwan Y., Greengard P., Nairn A.C. y Kuryan J. 1995. Three dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase 1. *Nature* 376: 745-753.

77. Goldberg R.B., Barker S.J. y Pérez-Grau L. 1989. Regulation of gene expression during plant embryogenesis. *Cell* 56: 149-160.

78. González-García MP, Rodríguez D, Nicolás C, Rodríguez PL, Nicolás G, Lorenzo O (2003) Negative regulation of abscisic acid signaling by the *Fagus sylvatica* FsPP2C1 plays a role in seed dormancy regulation and promotion of seed germination. *Plant Physiol* 133: 135–144

79. González-Guzmán M, Apostolova N, Belles JM, Barrero JM, Piqueras P, Ponce MR, Micol JL, Serrano R, Rodríguez PL (2002) The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. *Plant Cell* 14: 1833–1846

80. González-Guzmán M., Apostolova N., Belles J.M., Barrero J.M.,

Piqueras P., Ponce M.R., Micol J.L., Serrano R. y Rodríguez P.L. 2002. The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. *Plant Cell* 14: 1833-1846.

81. Gosti F, Beaudoin N, Serizet C, Webb AA, Vartanian N, Giraudat J (1999) ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell* 11: 1897–1910

82. Gosti F., Beaudoin N., Serizet C., Webb A.A.R., Vartanian N. y Giraudat J. 1999. ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signalling. *Plant Cell* 11: 1897-1909.

83. Gosti F., Bertauche N., Vartanian N. y Giraudat J. 1995. Abscisic acid–dependent and –independent regulation of gene expression by progressive drought in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 246: 10-18.

84. Grabov A. y Blatt M.R. 1998. Membrane voltage initiates Ca<sup>2+</sup> waves and potentiates Ca<sup>2+</sup> increases with abscisic acid in stomatal guard cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 4778-4783.

85. Grabov A., Leung J., Giraudat J. y Blatt M.R. 1997. Alteration of anion channel kinetics in wild-type and *abi1-1* transgenic *Nicotiana benthamiana* guard cells by abscisic acid. *Plant J.* 12: 203-213.

86. Gubler F. y Jacobsen J.V. 1992. Gibberellin-responsive elements in the promoter of a barley high-pl  $\alpha$ -amylase gene. *Plant Cell* 4: 1435-1441.

87. Gubler F., Raventos D., Keys M., Watts R.M. y Jacobsen J.V. 1999. Target genes and regulatory domains of the GAMYB transcriptional activator in cereal aleurone. *Plant J.* 17: 1-9.

88. Guo Y, Xiong L, Song CP, Gong D, Halfter U, Zhu JK (2002) A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. *Dev Cell* 3: 233–244

89. Guo Y.L. y Roux S.J. 1996. Partial purification and characterization of a type 1 protein phosphatase in purified nuclei of pea plumules. *Biochem. J.* 319: 985-990.

90. Guo Y.L., Xiong L.M., Song C.P., Gong D., Halfter U. y Zhu J.K.

2002. A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signaling in Arabidopsis. *Dev. Cell* 3: 233-244.
91. Hamilton D.W., Hills A., Kohler B. y Blatt M.R. 2000. Ca<sup>2+</sup> channels at the plasma membrane of stomatal guard cells are activated by hyperpolarization and abscisic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4967-4972.
92. Hilhorst H.W.M. 1990a. Dose-response analysis of factors involved in germination and secondary dormancy of seeds of *Sisymbrium officinale*. I. Phytochrome. *Plant Physiol.* 94: 1090-1095.
93. Hilhorst H.W.M. 1990b. Dose-response analysis of factors involved in germination and secondary dormancy of seeds of *Sisymbrium officinale*. II. Nitrate. *Plant Physiol.* 94: 1096-1102.
94. Hilhorst H.W.M. 1995. A critical update on seed dormancy I. Primary dormancy. *Seed Sci. Res.* 5: 61-73.
95. Hilhorst H.W.M. y Karssen C.M. 1990. The role of light and nitrate in seed germination. En: "Recent Advances in Development and Germination of Seeds". (Taylorson R.B. ed.). NATO ASI Series A 187. Plenum Press, New York, pp: 191-205.
96. Hilhorst H.W.M. y Karssen C.M. 1992. Seed dormancy and germination: The role of abscisic acid and gibberellins and the importance of hormone mutants. *Plant Growth Reg.* 11: 225-238.
97. Himmelbach A, Hoffmann T, Leube M, Hohener B, Grill E (2002) Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in Arabidopsis. *EMBO J* 21: 3029–3038
98. Himmelbach A, Iten M, Grill E (1998) Signalling of abscisic acid to regulate plant growth. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353: 1439–1444
99. Himmelbach A., Hoffmann T., Leube M., Hohener B. y Grill E. 2002. Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in Arabidopsis. *EMBO J.* 21: 3029-3038.

100. Himmelbach A., Iten M. y Grill E. 1998 Signaling of abscisic acid to regulate plant growth. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 353: 1439-1444.
101. Hirayama T., Shinozaki K; 2007. Perception and transduction of abscisic acid signals: key to the versatile plant hormone ABA. *Trend Plant Sci* 12: 343-351.
102. Holappa L.D. y Walker-Simmons M.K. 1995. The wheat abscisic acid-responsive protein kinase mRNA, PKABA1, is up-regulated by dehydration, cold temperature, and osmotic stress. *Plant Physiol.* 108: 1203-1210.
103. Holappa L.D. y Walker-Simmons M.K. 1997. The wheat protein kinase gene, TaPK3, of the PKABA1 subfamily is differentially regulated in greening wheat seedlings. *Plant Mol. Biol.* 33: 935-941.
104. Holdsworth M., Lenton J., Flintham J., Gale M., Kurup S., McKibbin R., Bailey P., Larner V. y Russell L. 2001. Genetic control mechanisms regulating the initiation of germination. *J. Plant Physiol.* 158: 439-445.
105. Holdsworth MJ, Bentsink L, Soppe WJ (2008) Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytol* 179: 33-54
106. Huber S.C., Huber J.L. y McMichael B.W. 1994. Control of enzyme activity by reversible protein phosphorylation. *Int. Rev. Cytol.* 149: 47-98.
107. Hugouvieux V, Kwak JM, Schroeder JI (2001) An mRNA cap binding protein, ABH1, modulates early abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *Cell* 106: 477-487
108. Hugouvieux V., Kwak J.M. y Schroeder J.I. 2001. An mRNA cap binding protein, ABH1, modulates early abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *Cell* 106: 477-487
109. Huse M. y Kuriyan J. 2002. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* 109: 275-282.

110. Hwang, I. y Goodman H.M. 1995. An *Arabidopsis thaliana* root-specific kinase homolog is induced by dehydration, ABA, and NaCl. *Plant J.* 8: 37–43.
111. Inoue H., Nojima H. y Okayama H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
112. Iten M., Hoffmann T. y Grill E. 1999. Receptors and signalling components of plant hormones. *J. Recept. Signal Transd. Res.* 19: 41-58.
113. Iturriaga EA, Leech MJ, Barratt DH, Wang TL (1994) Two ABA-responsive proteins from pea (*Pisum sativum* L.) are closely related to intracellular pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol* 24: 235–240
114. Jacobsen J.V. y Beach L.R. 1985. Evidence for control of transcription of  $\alpha$ -amylase and ribosomal rRNA genes in barley aleurone protoplasts by gibberellic acid and abscisic acid. *Nature* 316: 275-277.
115. Jacobsen J.V., Gubler F. y Chandler P.M. 1995. Gibberellin action in germinated cereal grains. En: "Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology". (Davies P.J. ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp: 246-271.
116. Johnson L.N. and O'Reilly N. 1996. Control by phosphorylation. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 6: 762-769.
117. Johnson R.R., Wagner R.L., Verhey S.D. y Walker-Simmons M.K. 2002. The abscisic acid-responsive kinase PKABA1 interacts with a seed-specific abscisic acid response element-binding factor, TaABF, and phosphorylates TaABF peptide sequences. *Plant Physiol.* 130: 837-846.
118. Jones H.D., Smith S.J., Desikan R., Plakidou-Dymock S., Lovegrove A. y Hooley R. 1998. Heterotrimeric G proteins are implicated in gibberellin induction of  $\alpha$ -amylase gene expression in wild oat aleurone. *Plant Cell* 10: 245-254.
119. Karssen C.M. 1968. Light promoted germination of seeds of *Chenopodium album* L: II. Effects of (RS)- abscisic acid. *Acta Bot. Neerl.* 17: 293-298.
120. Karssen C.M. 1982a. Seasonal patterns of dormancy in weed

seeds. En: "The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination". (Khan A.A. ed.). Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, pp: 243-270.

121. Karssen C.M. 1982b. Indirect effect of abscisic acid on the induction of secondary dormancy in lettuce seeds. *Physiol. Plant.* 54: 258-266.

122. Karssen C.M. y Lacka E. 1986. A revision of the hormone balance theory of seed dormancy: studies on gibberellin and/or abscisic acid deficient mutants of *Arabidopsis thaliana*. En: "Plant Growth Substances". (Bopp M. ed.). Springer, Heidelberg, pp: 315-323.

123. Karssen C.M., Brinkhorts-van der Swan D.L.C., Breekland A.E. y Koornneef M. 1983. Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies on abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 157: 158-165.

124. Karssen C.M., Zagorski S., Kepczynski J. y Groot S.P.C. 1989. Key role of endogenous gibberellins in the control of seed germination. *Ann. Bot.* 63: 71-80.

125. Ken-Ichi M., Suke K, Kazuko Y-Shinozaki.,2009 Structural basis of abscisic acid signalling. *Nature* 462, 609-614.

126. Kohler B. y Blatt M.R. 2002. Protein phosphorylation activates the guard cell Ca<sup>2+</sup> channel and is a prerequisite for gating by abscisic acid. *Plant J.* 32: 185-194.

127. Koornneef M, Alonso-Blanco C, Blankestijn-de Vries H, Hanhart CJ, Peeters AJ (1998) Genetic interactions among late-flowering mutants of *Arabidopsis*. *Genetics* 148: 885–892

128. Koornneef M, Bentsink L, Hilhorst H (2002) Seed dormancy and germination. *Curr Opin Plant Biol* 5: 33–36

129. Koornneef M, Hanhart CJ, Hilhorst HW, Karssen CM (1989) In vivo inhibition of seed development and reserve protein accumulation in

recombinants of abscisic acid biosynthesis and responsiveness mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 90: 463–469

130. Koornneef M, Karssen CM (1994) Seed dormancy and germination. In EM Meyerowitz, CR Somerville, eds, *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 313–334

131. Koornneef M. y Karssen C.M. 1994. Seed dormancy and germination. En: “*Arabidopsis*”. (Meyerowitz E.M. y Somerville C.R. eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp 313-334.

132. Koornneef M. y Van der Veen J.H. 1980. Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. *Theor. Appl. Genet.* 58: 257-263.

133. Koornneef M., Bentsink L. y Hilhorst H. 2002. Seed dormancy and germination. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 33-36.

134. Koornneef M., Dellaert L.W.M., Van der Veen J.H. 1982. EMS- and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Mutat. Res.* 93: 109-123.

135. Koornneef M., Elgersman C.J., Van Loenen-Martinet E.P., Van Riin L. y Zeevaart J.A.D. 1985. A gibberellin insensitive mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant.* 65: 33-39.

136. Koornneef M., Hanhart C.J., Hilhorst H.W.M. y Karssen C.M. 1989. In vivo inhibition of seed development and reserve protein accumulation in recombinants of abscisic acid biosynthesis and responsiveness mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 90: 463-469.

137. Koornneef M., Reuling G. y Karssen C.M. 1984. The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 61: 377-383.

138. Kranz A.R. 1976. International cooperation in *Arabidopsis* research. *Arabid. Inf. Ser.* 134: 12-17.

139. Kranz A.R. y Kirchheim B. (1987). Genetic resources in

Arabidopsis. Arabid. Inf. Serv. Vol.24.

140. Kuhn JM, Boisson-Dernier A, Dizon MB, Maktabi MH, Schroeder JI (2006) The protein phosphatase AtPP2CA negatively regulates abscisic acid signal transduction in Arabidopsis, and effects of *abh1* on AtPP2CA mRNA. *Plant Physiol* 140: 127–139

141. Kyte J. y Doolittle R.F. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*157: 105-132.

142. Laby R.J., Kincaid M.S., Kim D. y Gibson S.I. 2000. The Arabidopsis sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. *Plant J.* 23: 587-596.

143. Lang V, Palva ET (1992) The expression of a rab-related gene, RAB18, is induced by abscisic acid during the cold acclimation process of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Mol Biol* 20: 951–962

144. Lang V. y Palva E.T. 1992 The expression of a rab-related gene, *rab18*, is induced by abscisic acid during the cold acclimation process of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Mol. Biol* 20: 951-962.

145. Le Page-Degivry M.T. 1973a. Influence de l'acide abscissique sur le developpement des embryons de *Taxus baccata* L. cultivés invitro. *Z. Pflanzenphysiol.* 70: 406-413.

146. Le Page-Degivry M.T. 1973b. Intervention d'un inhibiteur lié dans le dormance embryonnaire de *Taxus baccata* L.C.R. *Acad. Sci. Paris. Sér. D.* 277: 177-180.

147. Le Page-Degivry M.T. 1998. Hormonal mechanism of dormancy induction in developing seeds. *J. Crop Prod.* 1: 203-222.

148. Le Page-Degivry M.T. y Garello G. 1992. "In situ" abscisic acid synthesis. A requirement for induction of embryo dormancy in *Helianthus annuus* embryo dormancy. *Plant Physiol.* 98: 1386-1390.

149. Le Page-Degivry M.T., Barthe P. y Garello G. 1990. Involvement of endogenous abscisic acid in onset and release of *Helianthus annuus*. *Plant Physiol.* 98: 1386-1390.



150. Lee H., Xiong L.M., Gong Z., Ishitani M., Stevenson B. y Zhu J.K. 2001. The Arabidopsis HOS1 gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a RING finger protein that displays cold-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning. *Genes Dev.* 15: 912-924.
151. Lee S.H., Lee M.H., Chung W.I. y Liu J.R. 1998. WAPK, a ser/thr protein kinase gene of *Nicotiana tabacum*, is uniquely regulated by wounding, abscisic acid and methyl jasmonate. *Mol. Gen. Genet.* 259: 516-522.
152. Legrain P (2002) Protein domain networking. *Nat Biotechnol* 20: 128–129
153. Legrain P, Selig L (2000) Genome-wide protein interaction maps using two-hybrid systems. *FEBS Lett* 480: 32–36
154. Léon-Kloosterziel KM, Gil MA, Ruijs GJ, Jacobsen SE, Olszewski NE, Schwartz SH, Zeevaart JA, Koornneef M (1996) Isolation and characterization of abscisic acid-deficient *Arabidopsis* mutants at two new loci. *Plant J* 10: 655–661
155. Leung J, Bouvier-Durand M, Morris PC, Guerrier D, Cheddor F, Giraudat J (1994) *Arabidopsis* ABA response gene *ABI1*: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* 264: 1448–1452
156. Leung J, Giraudat J (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 199–222
157. Leung J, Merlot S, Giraudat J (1997) The *Arabidopsis* ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (*ABI2*) and *ABI1* genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell* 9: 759–771
158. Leung J. y Giraudat J. 1998. Abscisic acid signal transduction. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 19: 199-222.
159. Leung J., Bouvier-Durand M., Morris P.C., Guernier D., Cheddor F.

- y Giraudat J. 1994. Arabidopsis ABA response gene ABI1: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* 264: 1448-1452.
160. Leung J., Merlot S. y Giraudat J. 1997. The Arabidopsis ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (ABI2) and ABI1 genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell* 9: 759-771.
161. Liu J.H., Luo M., Cheng K.J., Mohapatra S.S. y Hill R.D. 1999. Identification and characterization of a novel barley gene that is ABA-inducible and expressed specifically in embryo and aleurone. *J. Exp. Bot.* 50: 727-728.
162. López-Molina L, Mongrand S, Chua NH (2001) A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 4782–4787
163. López-Molina L, Mongrand S, Kinoshita N, Chua NH (2003) AFP is a novel negative regulator of ABA signaling that promotes ABI5 protein degradation. *Genes Dev* 17: 410–418
164. López-Molina L., Mongrand S. y Chua N.H. 2001. A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 4782-4787.
165. Lorenzo O, Rodríguez D, Nicolás G, Rodríguez PL, Nicolás C (2001) A new protein phosphatase 2C (FsPP2C1) induced by abscisic acid is specifically expressed in dormant beechnut seeds. *Plant Physiol* 125: 1949–1956
166. Lorenzo O. 2000. Regulación hormonal de la dormición de semillas de haya (*Fagus sylvatica* L): Expresión de proteínas específicas relacionadas con la transducción de señales. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca.
167. Lorenzo O. y Solano R. 2004. Señalización de ácido jasmónico e

interacciones con otras hormonas. En: "Metabolismo y Modo de Acción de Fitohormonas". (Rodríguez D. y Nicolás C. eds.). Ediciones Universidad de Salamanca, pp: 79-98.

168. Lorenzo O., Chico J.M., Sanchez-Serrano J.J., Solano R. 2004. JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 16:1938-50.

169. Lorenzo O., Nicolás C., Nicolás G. y Rodríguez D. 2003. Characterization of a dual plant protein kinase (FsPK1) up-regulated by ABA and calcium and specifically expressed in dormant seeds of *Fagus sylvatica* L. *Seed Sci. Res.* 13: 261-271.

170. Lorenzo O., Nicolás C., Nicolás G., y Rodríguez D. 2002a. GA3-induced expression of a new functional AAA-ATPase (FsA1) is correlated with the onset of germination in *Fagus sylvatica* L. seeds (beechnuts). *Plant Cell Physiol.* 43: 27-34.

171. Lorenzo O., Nicolás C., Nicolás G., y Rodríguez D. 2002b. Molecular cloning of a functional protein phosphatase 2C (FsPP2C2) with unusual features and synergistically up-regulated by ABA and calcium in dormant seeds of *Fagus sylvatica*. *Physiol. Plant.* 114: 482-490.

172. Lorenzo O., Rodríguez D., Nicolás C. y Nicolás G. 2001. Characterization and expression of two protein kinase genes and an EIN3-like gene, which are regulated by ABA and GA3 in dormant *Fagus sylvatica* seeds. En: "Seed Biology: Advances and Applications". (Black M., Bradford K.J. y Vázquez-Ramos J. eds.). CABI Publishing, Wallingford, pp: 329-340.

173. Lorenzo O., Rodríguez D., Nicolás G., Rodríguez P.L. y Nicolás C. 2001. A new protein phosphatase 2C (FsPP2C1) induced by ABA is specifically expressed in dormant seeds of *Fagus sylvatica* L. *Plant Physiol.* 125: 1949-1956.

174. Lotan T., Ohto M.-A., Yee K.M., West M.A.L., Lo R., Kwong R.W., Yamagishi K., Fischer R.L., Goldberg R.B., y Harada, J.J. 1998. *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in

vegetative cells. *Cell* 93: 1195–1205.

175. Luerssen K., Kirik V., Herrmann P. y Misera S. 1998. FUSCA3 encodes a protein with a conserved VP1/ABI3-like B3 domain which is of functional importance for the regulation of seed maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 15: 755–764.

176. Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E (2009) Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324: 1064–1068

177. MacKintosh C. y Cohen P. 1989. Identification of high levels of type 1 and type 2A protein phosphatases in higher plants. *Biochem J.* 262:335-9.

178. Marion-Poll A. 1997. ABA and seed development. *Trends Plant Sci.* 2: 447-448.

179. Markovic-Housley Z, Degano M, Lamba D, von Roepenack-Lahaye E, Clemens S, Susani M, Ferreira F, Scheiner O, Breiteneder H (2003) Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier. *J Mol Biol* 325: 123–133

180. McCallum C.M., Comai L., Greene E.A. y Henikoff S. 2000. Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol.* 123: 439–442.

181. McCarty D.R., Hattori T., Carson C.B., Vasil V., Lazar M. y Vasil I.K. 1991. The Viviparous-1 developmental gene of maize encodes a novel transcriptional activator. *Cell* 66: 895-905.

182. McCourt P. 1999. Genetic analysis of hormone signalling. *Ann. Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 219-243.

183. Mckinney E.C., Ali N, Traut A, Feldmann K.A., Belostotsky D.A., Mcdowell J.M., Meagher R.B. 1995. Sequence-based identification of T-DNA insertion mutations in *arabidopsis* - actin mutants act2-1 and act4-1. *Plant J.* 8: 613-622.

184. Merlot S, Gosti F, Guerrier D, Vavasseur A, Giraudat J (2001) The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *Plant J* 25: 295–303
185. Meyer K, Leube MP, Grill E (1994) A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 264: 1452–1455
186. Meyer K., Leube M.P. y Grill E. 1994. A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 264: 1452-1455.
187. Miao Y, Lv D, Wang P, Wang XC, Chen J, Miao C, Song CP (2006) An *Arabidopsis* glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses. *Plant Cell* 18: 2749–2766
188. Moes D, Himmelbach A, Korte A, Haberer G, Grill E (2008) Nuclear localization of the mutant protein phosphatase *abi1* is required for insensitivity towards ABA responses in *Arabidopsis*. *Plant J* 54: 806–819
189. Mundy J. y Chua N.H. 1988. Abscisic-acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO J.* 7: 2279-2286.
190. Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco. *Physiol Plant* 15: 473–497
191. Mustilli AC, Merlot S, Vavasseur A, Fenzi F, Giraudat J (2002) *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* 14: 3089–3099
192. Nakamura S., Lynch T.J. y Finkelstein R.R. 2001. Physical interactions between ABA response loci of *Arabidopsis*. *Plant J.* 26: 627-

635.

193. Nambara E, Marion-Poll A (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol* 56: 165–185

194. Nambara E. y McCourt P. 1999. Protein farnesylation in plants: a greasy tale. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 388-392.

195. Nambara E., Kawaide H., Kamiya Y. y Naito S. 1998. Characterization of an *Arabidopsis thaliana* mutant that has a defect in ABA accumulation: ABA-dependent and ABA-independent accumulation of free amino acids during dehydration. *Plant Cell Physiol.* 39: 853-858.

196. Nemhauser JL, Hong F, Chory J (2006) Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell* 126: 467–475

197. Nicolás C., Nicolás G. y Rodríguez D. 1996. Antagonistic effects of abscisic acid and gibberellic acid on the breaking of dormancy of *Fagus sylvatica* seeds. *Physiol. Plant.* 96: 244-250.

198. Nicolás C., Nicolás G. y Rodríguez D. 1997a. Molecular approach to the role of ABA and GA3 in the dormancy of *Fagus sylvatica* seeds. En: "Basic and Applied Aspects of Seed Biology". (Ellis R.H., Black M., Murdoch A.J. y Hong T.D. eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp: 323-333.

199. Nicolás C., Nicolás G. y Rodríguez D. 1998. Transcripts of a gene, encoding a small GTP-binding protein from *Fagus sylvatica*, are induced by ABA and accumulated in embryonic axis of dormant seeds. *Plant Mol. Biol.* 36: 487-491.

200. Nicolás C., Rodríguez D., Poulsen F., Eriksen E.N. y Nicolás G. 1997b. The expression of an abscisic acid responsive glycine-rich protein coincides with the level of seed dormancy in *Fagus sylvatica*. *Plant Cell Physiol.* 38: 1303-1310.

201. Nishimura N, Yoshida T, Kitahata N, Asami T, Shinozaki K, Hirayama T (2007) ABA-Hypersensitive Germination1 encodes a protein

phosphatase 2C, an essential component of abscisic acid signaling in Arabidopsis seed. *Plant J* 50: 935–949

202. Nishimura N, Yoshida T, Murayama M, Asami T, Shinozaki K, Hirayama T (2004) Isolation and characterization of novel mutants affecting the abscisic acid sensitivity of Arabidopsis germination and seedling growth. *Plant Cell Physiol* 45: 1485–1499

203. Nylander M, Svensson J, Palva ET, Welin BV (2001) Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol* 45: 263–279

204. Ohta M, Guo Y, Halfter U, Zhu JK (2003) A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C ABI2. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 11771–11776

205. Orgad S., Brewis N.D., Alphey L., Axton J.M., Dudai Y. y Cohen P.T. 1990. The structure of protein phosphatases 2A is as highly conserved as that of protein phosphatases 1. *FEBS Lett.* 275: 44-48.

206. Pandey GK, Grant JJ, Cheong YH, Kim BG, Li L, Luan S (2005) ABR1, an APETALA2-domain transcription factor that functions as a repressor of ABA response in Arabidopsis. *Plant Physiol* 139: 1185–1193

207. Pandey S, Chen JG, Jones AM, Assmann SM (2006) G-protein complex mutants are hypersensitive to abscisic acid regulation of germination and postgermination development. *Plant Physiol* 141: 243–256

208. Pandey S, Nelson DC, Assmann SM (2009) Two novel GPCR-type G proteins are abscisic acid receptors in Arabidopsis. *Cell* 136: 136–148

209. Parcy F, Valon C, Raynal M, Gaubier-Comella P, Delseny M, Giraudat J (1994) Regulation of gene expression programs during Arabidopsis seed development: roles of the ABI3 locus and of endogenous abscisic acid. *Plant Cell* 6: 1567–1582

210. Parcy F. y Giraudat J. 1997. Interactions between the ABI1 and the ectopically expressed ABI3 genes in controlling abscisic acid responses in *Arabidopsis* vegetative tissues. *Plant J.* 11: 693-702.
211. Parcy F., Valon C., Raynal M., Gaubier-Comella P., Delseny M. y Giraudat J. 1994. Regulation of gene expression programs during *Arabidopsis* seed development: roles of the ABI3 locus and of endogenous abscisic acid. *Plant Cell* 6: 1567-1582.
212. Park MY, Chung MS, Koh HS, Lee DJ, Ahn SJ, Kim CS (2009a) Isolation and functional characterization of the *Arabidopsis* salt-tolerance 32 (AtSAT32) gene associated with salt tolerance and ABA signaling. *Physiol Plant* 135: 426–435
213. Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow TF, et al (2009b) Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324: 1068–1071
214. Park Y.S., Hong S.W., Oh S.A., Kwak J.M., Lee H.H. y Nam H.G. 1993. Two putative protein kinases from *Arabidopsis thaliana* contain highly acidic domains. *Plant Mol. Biol.* 22: 615-624.
215. Parker R.E. 1989. Utilización de la chi-cuadrado. Estadística para biólogos. Ediciones Omega, Barcelona, pp: 41-59.
216. Pawson T. 1995. Protein modules and signaling networks. *Nature* 373: 573-580.
217. Pei Z.M., Ghassemian M., Kwak C.M., McCourt P. y Schroeder J.I. 1998. Role of farnesyltransferase in ABA regulation of guard cell anion channels and plant water loss. *Science* 282: 287-290.
218. Pei Z.M., Kuchitsu K., Ward J.M., Schwarz M. y Schroeder J.I. 1997. Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in *Arabidopsis* wild-type and *abi1* and *abi2* mutants. *Plant Cell* 9: 409-423.
219. Pei Z.M., Murata Y., Benning G., Thomine S., Klusener B., Allen



- G.J., Grill E. y Schroeder J.I. 2000. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406: 731-734.
220. Pei ZM, Kuchitsu K (2005) Early ABA signaling events in guard cells. *J Plant Growth Regul* 24: 296–307
221. Pei ZM, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B, Allen GJ, Grill E, Schroeder JI (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406: 731–734
222. Radauer C, Lackner P, Breiteneder H (2008) The Bet v 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. *BMC Evol Biol* 8: 286
223. Rain JC, Selig L, De Reuse H, Battaglia V, Reverdy C, Simon S, Lenzen G, Petel F, Wojcik J, Schachter V, et al (2001) The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature* 409: 211–215
224. Raz V., Bergervoet J.H. y Koornneef M. 2001. Sequential steps for developmental arrest in *Arabidopsis* seeds. *Development* 128: 243-252.
225. Roberts E.H. y Smith P.D. 1977. Dormancy and the pentose phosphate pathway. En: "The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination". (Khan A.A. ed.). North Holland, Amsterdam, pp: 385-411.
226. Robertson D.S. 1955. The genetics of vivipary in maize. *Genetics* 40: 745-760.
227. Robichaud C.S., Wong J. y Sussex I.M. 1980. Control of in vitro growth of viviparous embryo mutants of maize by abscisic acid. *Dev. Genet.* 1: 325-330.
228. Rock C.D. 2000. Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytol.* 148: 357-396.
229. Rock C.D. y Quatrano R.S. 1995. The role of hormones during

seed development. En: "Plant Hormones Physiology, Biochemistry and Molecular Biology". (Davies P.J. ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp: 671-697.

230. Rodríguez D., Nicolás G., Aldasoro J.J., Hernández-Nistal J., Babiano M.J. y Matilla A. 1985. Altered development of polysomal RNA activity in chick-pea (*Cicer arietinum*) embryonic axes. Effect of abscisic acid and temperature. *Planta* 164: 517-523.

231. Rodríguez P.L. 1998. Protein phosphatases 2C (PP2C) function in higher plants. *Plant Mol. Biol.* 38: 919-927.

232. Rodríguez P.L., Benning G. y Grill E. 1998a. ABI2, a second protein phosphatase involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* 421: 185-190.

233. Rodríguez P.L., Leube M.P. y Grill E. 1998b. Molecular cloning in *Arabidopsis thaliana* of a new protein phosphatase 2C (PP2C) with homology to ABI1 and ABI2. *Plant Mol. Biol.* 38: 879-883.

234. Rodríguez PL (1998) Protein phosphatase 2C (PP2C) function in higher plants. *Plant Mol Biol* 38: 919–927

235. Rodríguez PL, Benning G, Grill E (1998a) ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 421: 185–190

236. Rodríguez PL, Leube MP, Grill E (1998b) Molecular cloning in *Arabidopsis thaliana* of a new protein phosphatase 2C (PP2C) with homology to ABI1 and ABI2. *Plant Mol Biol* 38: 879–883

237. Sáez A, Apostolova N, González-Guzmán M, González-García MP, Nicolás C, Lorenzo O, Rodríguez PL (2004) Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling. *Plant J* 37: 354–369

238. Sáez A, Robert N, Maktabi MH, Schroeder JI, Serrano R, Rodríguez PL (2006) Enhancement of abscisic acid sensitivity and

reduction of water consumption in Arabidopsis by combined inactivation of the protein phosphatases type 2C ABI1 and HAB1. *Plant Physiol* 141: 1389–1399

239. Sáez A, Rodrigues A, Santiago J, Rubio S, Rodriguez PL (2008) HAB1-SWI3B interaction reveals a link between abscisic acid signaling and putative SWI/SNF chromatin-remodeling complexes in Arabidopsis. *Plant Cell* 20: 2972–2988

240. Sáez A., Apostolova N., González-Guzmán M., González-García M.P., Nicolás C., Lorenzo O. y Rodríguez P.L. 2004. Gain of function and loss of function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant J.* 37: 354-369.

241. Sambrook J., Fritsch E. y Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York.

242. Santiago J, Rodrigues A, Saez A, Rubio S, Antoni R, Dupeux F, Park SY, Márquez JA, Cutler SR, Rodriguez PL (2009) Modulation of drought resistance by the abscisic acid-receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. *Plant J* 60: 575–588

243. Schwartz A., Wu W.H., Tucker E.B. y Assmann S.M. 1994. Inhibition of inward K<sup>+</sup> channels and stomatal response by abscisic-acid. An intracellular locus of phytohormone action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4019-4023.

244. Schwartz S.H., Léon-Kloosterziel K.M., Koornneef M. y Zeevaart J.A.D. 1997a. Biochemical characterization of the *aba2* and *aba3* mutants in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.* 114: 161-166.

245. Schwartz S.H., Tan B.C., Gage D.A., Zeevaart J.A.D. y McCarty D.R. 1997b. Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* 276: 1872-1874.

246. Schweighofer A, Hirt H, Meskiene I (2004) Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci* 9: 236–243

247. Schweighofer A., Hirt H. y Meskiene I. 2004 Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci.* 9: 236-243.
248. Segura J. 2000. Introducción al desarrollo. Concepto de hormona vegetal. En: "Fundamentos de Fisiología Vegetal" (Azcón-Bieto J. y Talón M. eds.). McGraw-Hill, Madrid, pp: 285-304.
249. Sheen J (1998) Mutational analysis of protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 975–980
250. Shinozaki E., Akhavan-Niski H., McGowan C.H. y Russell P. 1994. Proteín phosphatase 2C, encoded by *ptc1(+)*, is important in the heat shock response of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell Biol.* 14: 3742-3741.
251. Shinozaki K. y Yamaguchi-Shinozaki K. 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* 115: 327-334.
252. Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. and Seki M. 2003. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 410-417.
253. Skriver K, Mundy J (1990) Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* 2: 503–512
254. Skriver K. y Mundy J. 1990. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* 2: 503-512.
255. Skriver K., Olsen F.L., Rogers J.C. y Mundy J. 1991. Cis-acting DNA elements responsive to gibberellin and its antagonist abscisic-acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7266-7270.
256. Soderman E.M., Brocard I.M., Lynch T.J. y Finkelstein R.R. 2000. Regulation and function of the *Arabidopsis* ABA-insensitive4 gene in seed and abscisic acid response signaling networks. *Plant Physiol.* 124: 1752-65.

257. Song CP, Agarwal M, Ohta M, Guo Y, Halfter U, Wang P, Zhu JK (2005) Role of an Arabidopsis AP2/EREBP-type transcriptional repressor in abscisic acid and drought stress responses. *Plant Cell* 17: 2384–2396
258. Spangfort MD, Mirza O, Ipsen H, Van Neerven RJ, Gajhede M, Larsen JN (2003) Dominating IgE-binding epitope of Bet v 1, the major allergen of birch pollen, characterized by x-ray crystallography and site-directed mutagenesis. *J Immunol* 171: 3084–3090
259. Srivastava S, Rahman MH, Shah S, Kav NN (2006) Constitutive expression of the pea ABA-responsive 17 (ABR17) cDNA confers multiple stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnol J* 4: 529–549
260. Steber C.M. y McCourt P. 2001. A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 125: 763-769.
261. Stone J.M. y Walker J.C. 1995. Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiol.* 108: 451-457.
262. Stone R.L. y Dixon J.E. 1994. Protein-tyrosine phosphatases. *J. Biol. Chem.* 269: 31323-31326.
263. Stone S.L., Kwong L.W., Yee K.M., Pelletier J., Lepiniec L., Fischer R.L., Goldberg R.B. y Harada J.J.A. 2001. LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11806–11811.
264. Strizhov N, Abraham E, Okresz L, Blickling S, Zilberstein A, Schell J, Koncz C, Szabados L (1997) Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis*. *Plant J* 12: 557–569
265. Suzuki M, Kao CY, McCarty DR (1997) The conserved B3 domain of VIVIPAROUS1 has a cooperative DNA binding activity. *Plant Cell* 9: 799–807

266. Szostkiewicz I, Richter K, Kepka M, Demmel S, Ma Y, Korte A, Assaad FF, Christmann A, Grill E (2009) Closely related receptor complexes differ in their ABA selectivity and sensitivity. *Plant J*
267. Tahtiharju S, Palva T (2001) Antisense inhibition of protein phosphatase 2C accelerates cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 26: 461–470
268. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596–1599
269. Taylor M.A., Davies H.V., Smith B., Abruzzese A. y Gosting P.G. 1993. Cold induced changes in gene expression during dormancy breakage in seeds of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*). *J. Plant Physiol.* 142: 120-123.
270. Totterdell S. y Roberts E.H. 1980. Characteristics of alternating temperatures which stimulate loss of dormancy in seeds of *Rumex obtusifolius* L. and *Rumex crispus* L. *Plant Cell Environ.* 3: 3-12.
271. Toyomasu T., Tsuji H., Yamane H., Nakayama M., Yamaguchi Y., Murofishi N., Takayashi N. e Inoue Y. 1993. Light effects on endogenous levels of gibberellins in photoblastic lettuce seeds. *J. Plant Growth Reg.* 12: 85-90.
272. Trewavas A.J. 1988. Timing and memory processes in seed embryo dormancy. A conceptual paradigm for plant development questions. *Bioessays* 6: 87-92.
273. Trewavas A.J. 2002. Plant cell signal transduction: the emerging phenotype. *Plant Cell* 14: S3-S4.
274. Trewavas A.J. y Malho R. 1997. Signal perception and transduction: The origin of the phenotype. *Plant Cell* 9: 1181-1195.
275. Ullah H., Chen J.G., Young J.C., Im K.H., Sussman M.R. y Jones A.M. 2001. Modulation of cell proliferation by heterotrimeric G protein in *Arabidopsis*. *Science* 292: 2066-2069.

276. Umezawa T, Sugiyama N, Mizoguchi M, Hayashi S, Myouga F, Yamaguchi-Shinozaki K., 2009. Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in Arabidopsis. *Proc. Natl Acad. Sci.* 106:17588-17593.
277. Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11632–11637
278. Uno Y, Furihata T., Abe H., Yoshida R., Shinozaki K. y Yamaguchi-Shinozaki K. 2000. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 11632-11637.
279. Van Stevenick R.F.M. y Van Stevenick M.E. 1983. Abscisic acid and membrane transport. En: "Abscisic Acid". (Addicott F.T. ed.). Praeger Publishers, New York, pp: 171-236.
280. Verslues PE, Zhu JK (2005) Before and beyond ABA: upstream sensing and internal signals that determine ABA accumulation and response under abiotic stress. *Biochem Soc Trans* 33: 375–379
281. Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* 33: 949–956
282. Vranova E, Tahtiharju S, Sriprang R, Willekens H, Heino P, Palva ET, Inze D, Van Camp W (2001) The AKT3 potassium channel protein interacts with the AtPP2CA protein phosphatase 2C. *J Exp Bot* 52: 181–182
283. Walker-Simmons M.K. 1987. ABA levels and sensitivity in

developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars. *Plant Physiol.* 84: 61-66.

284. Walker-Simmons M.K. 1998. Protein kinases in seeds. *Seed Sci. Res.* 8: 193-200.

285. Wang H., Datla R., Georges F., Loewen M., y Cutler A.J. 1995. Promoters from kin1 and cor6.6, two homologous *Arabidopsis thaliana* genes: Transcriptional regulation and gene expression induced by low temperature, ABA, osmoticum and dehydration. *Plant Mol. Biol.* 28: 605-617.

286. Wang M., Heimovaara-Dijkstra S. y Van Duijn B. 1995. Modulation of germination of embryos isolated from dormant barley grains by manipulation of endogenous abscisic acid. *Planta* 195: 586-592.

287. Wang M., Van der Meulen R.M., Visser K., Van Schaik H.P., Van Duijn B. y de Boer A.H. 1998. Effects of dormancy-breaking chemicals on ABA levels in barley grain embryos. *Seed Sci. Res.* 8: 129-137.

288. Wang X.Q., Ullah H., Jones A.M. y Assmann S.M. 2001. G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Science* 292: 2070-2072.

289. Welin B.V., Olson A., Nylander M. y Palva E.T. 1994. Characterization and differential expression of dhn/lea/rab-like genes during cold acclimation and drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 26: 131-144.

290. Werner WE, Finkelstein R (1995) *Arabidopsis* mutants with reduced response to NaCl and osmotic stress. *Physiol Plant* 93: 659-666

291. Wobus U., y Weber H. 1999a. Maturation: genetic programmes and control signals. *Curr Opin Plant Biol.* 2: 33-38.

292. Wobus U., y Weber H. 1999b. Sugar as signal molecules in plant seed development. *Biol chem.* 380: 937- 944.

293. Wojcik J, Boneca IG, Legrain P (2002) Prediction, assessment and validation of protein interaction maps in bacteria. *J Mol Biol* 323: 763-770



294. Wu FQ, Xin Q, Cao Z, Liu ZQ, Du SY, Mei C, Zhao CX, Wang XF, Shang Y, Jiang T, et al (2009) The magnesium-chelatase H subunit binds abscisic acid and functions in abscisic acid signaling: new evidence in Arabidopsis. *Plant Physiol* 150: 1940–1954
295. Xiong L.M., Gong Z., Rock C.D, Subramaniam S., Guo Y., Galbraith D. y Zhu J.K. 2001a. Modulation of abscisic signal transduction and biosynthesis by an Sm-like protein in Arabidopsis. *Dev. Cell* 1: 771-781.
296. Xiong L.M., Ishitani M., Lee H. y Zhu J.K. 2001b. The Arabidopsis LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *Plant Cell* 13: 2063-2083.
297. Xiong L.M., Lee B.H., Ishitani M., Lee H., Zhang C.Q. y Zhu J.K. 2001c. FIERY1 encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in Arabidopsis. *Genes Dev.* 15: 1971-1984.
298. Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994) A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* 6: 251–264
299. Yamaguchi-Shinozaki K. y Shinozaki K. 1993. Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29 gene of Arabidopsis thaliana and analysis of its promoter in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.* 236: 331-340.
300. Yamaguchi-Shinozaki K., Mundy J. y Chua N.H. 1989. Four tightly linked rab genes are differentially expressed in rice. *Plant Mol. Biol.* 14: 29-39.
301. Yang W., Lee H., Hellinga H. y Yang J.J. 2002. Structural analysis, identification, and design of calcium-binding sites in proteins. *Proteins* 47: 344-356.
302. Yang Y, Sulpice R, Himmelbach A, Meinhard M, Christmann A, Grill E (2006) Fibrillin expression is regulated by abscisic acid response

regulators and is involved in abscisic acid-mediated photoprotection. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 6061–6066

303. Yoine M, Ohto MA, Onai K, Mita S, Nakamura K (2006) The lba1 mutation of UPF1 RNA helicase involved in nonsense-mediated mRNA decay causes pleiotropic phenotypic changes and altered sugar signalling in *Arabidopsis*. *Plant J* 47: 49–62

304. Yoon H.W., Kim M.C., Shin P.G., Kim J.S., Kim C.Y., Lee S.Y., Hwang I., Bahk J.D., Hong J.C., Han C. y Cho M.J. 1997. Differential expression of two functional serine/threonine protein kinases from soybean that have an unusual acidic domain at the carboxy terminus. *Mol. Gen. Genet.* 255: 359-371.

305. Yoshida R, Umezawa T, Mizoguchi T, Takahashi S, Takahashi F, Shinozaki K (2006a) The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 281: 5310–5318

306. Yoshida R., Hobo T., Ichimura K., Mizoguchi T., Takahashi F., Alonso J., Ecker J.R. y Shinozaki K. 2002. ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 43: 1473-1483.

307. Yoshida T, Nishimura N, Kitahata N, Kuromori T, Ito T, Asami T, Shinozaki K, Hirayama T (2006b) ABA-hypersensitive germination3 encodes a protein phosphatase 2C (AtPP2CA) that strongly regulates abscisic acid signaling during germination among *Arabidopsis* protein phosphatase 2Cs. *Plant Physiol* 140: 115–126

308. Zhang D.P., Wu Z.Y., Li X.Y. y Zhao Z.X. 2002. Purification and identification of a 42-kilodalton abscisic acid-specific-binding protein from epidermis of broad bean leaves. *Plant Physiol.* 128: 714-725.

309. Zhang D.P., Zhang Z.L., Chen J. y Jia W.S. 1999. Specific abscisic

acid-binding sites in mesocarp of grape berry: Properties and subcellular localization. *J. Plant Physiol* 155: 324-331.

310. Zhang S. y Klessig D.F. 2001. MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci.* 6: 520-527.

311. Zhang X, Garreton V, Chua NH (2005) The AIP2 E3 ligase acts as a novel negative regulator of ABA signaling by promoting ABI3 degradation. *Genes Dev* 19: 1532–1543

312. Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Henning L, Gruissem W (2004) GENEVESTIGATOR: Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* 136: 2621–2632