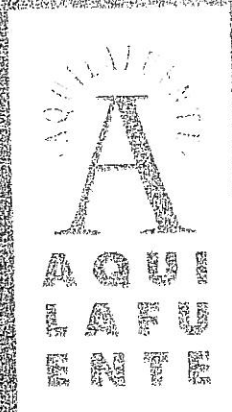


M.<sup>a</sup> DOLORES RODRIGUEZ MARTÍN  
CARLOS NICOLÁS RODRIGUEZ (I+D+D)

# METABOLISMO Y MODO DE ACCIÓN DE FITOHORMONAS



---

Editorial Universidad  
**Salamanca**

AQUILAFUENTE, 71

© Ediciones Universidad de Salamanca y los autores.

1.ª edición: Julio, 2004

I.S.B.N.: 84-7800-614-1

Depósito legal: S. 837-2004

/ Ediciones Universidad de Salamanca - <http://webeus.usal.es>  
/ Correo electrónico: [eus@usal.es](mailto:eus@usal.es)

*Impreso en España-Printed in Spain.* TRAFOTEX Fotocomposición, S. L.  
Teléfono: 923 22 81 03 - Salamanca (España)

*Impresión y encuadernación:*  
Imprenta Calatrava, Soc. Coop.  
Teléfono: 923 19 02 13  
Salamanca (España)

*Todos los derechos reservados. Ni la totalidad ni parte de este libro  
puede reproducirse ni transmitirse sin permiso escrito  
de Ediciones Universidad de Salamanca.*

**Título:** VIII Simposio. Metabolismo y modo de acción de Fitohormonas.

**©: Edita:**  
JUNTA DE ANDALUCÍA: Consejería de Agricultura y Pesca.

**Publica:**  
VICECONSEJERÍA. Servicio de Publicaciones y Divulgación.

**Colección:**  
CONGRESOS Y JORNADAS.

**Serie:**  
FISIOLOGÍA VEGETAL.

**Coordinador:**  
F. J. Cejudo Fernández.

**Autores:**  
Varios.

**Fotografía e ilustraciones:**  
Autores.

**I.S.B.N.:**  
84-8474-060-9

**Dep. Legal:**  
SE-2.172-2002

**Maquetación e Impresión:**  
A.G. Novograf, S.A. (Sevilla)

## SOBREEXPRESIÓN DE UNA PROTEÍNA FOSFATASA DE TIPO 2C (FsPP2C1) ESPECÍFICA DE SEMILLAS Y RELACIONADA CON LA DORMICIÓN, EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *Arabidopsis thaliana*

Mary-Paz González, Oscar Lorenzo, Carlos Nicolás, Gregorio Nicolás y Dolores Rodríguez

Dpto. Fisiología Vegetal, Fac. Biología, Universidad de Salamanca.  
Pl. de los Doctores de la Reina s/n. 37007 Salamanca.

E-mail: chos@usal.es; tfn: 923 294400 ext 1951

### Sinopsis

Mediante RT-PCR usando oligonucleótidos degenerados correspondientes a los dominios catalíticos 2 y 8 presentes en todas las serina/treonina proteína fosfatasa de tipo 2C descritas hasta el momento (Lorenzo et al., 2001), obtuvimos un fragmento de aproximadamente 550 pb, que presentaba una alta similitud con otros miembros de la familia de proteína fosfatasa de tipo 2C (ABI1, ABI2, AtPP2CA).

El clon completo, que codifica para una proteína que denominamos FsPP2C1, se aisló a partir de una librería de cDNA de semillas durmientes de haya (*Fagus sylvatica*) tratadas con ABA (Nicolás et al., 1997). Esta fosfatasa está claramente inducida por ABA, mientras que su expresión tiende a desaparecer en los tratamientos que eliminan la dormición, como la estratificación a 4 °C o el ácido giberélico (Nicolás et al., 1996). Además, el gen correspondiente se expresa específicamente en semillas y podría estar implicado en los mecanismos que regulan la dormición en semillas de haya (Lorenzo et al., 2001).

Para estudiar la función de FsPP2C1 en la dormición, el gen correspondiente ha sido sobreexpresado constitutivamente en *Arabidopsis thaliana*, (Col/35S::FsPP2C1), utilizando el vector PBI121 y el sistema *Agrobacterium* para la infección de tejidos vegetales y posterior obtención de plantas transgénicas.

## Introducción

La fosforilación/desfosforilación de proteínas es un mecanismo general de transmisión de señales, probablemente implicado en la regulación de la dormición de las semillas (Trewavas, 1987), en el cual tienen gran importancia la familia PP2C de serina/treonina proteína fosfatasa (Rodríguez, 1998).

En plantas, algunas de estas proteína fosfatasa, como ABI1 y ABI2, se consideran reguladores negativos en la ruta de señalización del ABA (Merlot et al, 2001), hormona implicada, entre otros procesos, en las respuestas a estrés ambiental y en el mantenimiento de la dormición. En este trabajo hemos pretendido profundizar en el posible papel de FsPP2C1 en la regulación de la dormición de semillas mediante la sobreexpresión del gen en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*.

## Resultados y discusión

En trabajos anteriores hemos observado que FsPP2C1 se expresa específicamente en semillas durmientes de haya tras la aplicación exógena de ABA, que mantiene las semillas en dormición, mientras que la estratificación a 4°C o la adición de giberelinas, tratamientos que eliminan la dormición (Nicolás et al, 1996), producen un descenso en los niveles de sus transcritos; es decir, la expresión de FsPP2C1 se correlaciona negativamente con la germinación de las semillas (Lorenzo et al., 2001). Adicionalmente, este gen se expresa exclusivamente en las semillas, a diferencia de otras PP2C vegetales que también se expresan en otros tejidos vegetativos y en respuesta a diferentes tipos de estrés, cosa que no ocurre con FsPP2C1. Por lo tanto, FsPP2C1 parece estar implicada en la dormición de semillas inducida por ABA, por lo que, y debido a la imposibilidad de obtener plantas transgénicas de *Fagus sylvatica*, hemos sobreexpresado FsPP2C1 en plantas de *Arabidopsis thaliana* con el objetivo de profundizar en el papel de esta proteína fosfatasa tanto en la dormición de semillas como en la ruta de transmisión de la señal del ácido abscísico.

Una vez obtenidas semillas transgénicas homocigotas para dicho gen, realizamos ensayos de dormición y sensibilidad al ABA, utilizando como controles semillas de *Arabidopsis thaliana* de tipo silvestre (ecotipo Columbia) y semillas de los mutantes *aba 2* (deficiente en ABA) y *abi1* y *abi2* (insensibles al ABA y que presentan alteraciones en proteína fosfatasa de tipo 2C).

En los ensayos de dormición se analizaron los porcentajes de germinación de diferentes semillas que primero fueron estratificadas durante 0, 24 y 120 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 presentan dormición, por lo que si no se estratifican apenas van a germinar, mientras que tras 120 horas de tratamiento frío se observan porcentajes de germinación cercanos al 60%. *Aba2*, por su parte, presenta porcentajes de germinación del 40% sin estratificar y valores cercanos al 100% tras 120 horas de tratamiento

frío. Por último, *abi1*, *abi2* y algunas de las líneas de FsPP2C1 presentan porcentajes de germinación del 80-90% tanto en las muestras estratificadas como en las que no habían sido sometidas a ningún tratamiento previo, lo que sugiere que estas semillas no presentan dormición.

También se analizaron los porcentajes de germinación de las semillas en presencia de diferentes concentraciones de ABA (0.5  $\mu\text{M}$  y 3  $\mu\text{M}$ ) para estudiar la sensibilidad al ABA. Con estos ensayos comprobamos que las semillas de tipo silvestre y las del mutante *aba2* (deficiente en ABA) eran capaces de germinar cuando las concentraciones de ABA eran muy bajas (0.5  $\mu\text{M}$ ), pero no lo hacían a concentraciones superiores (3  $\mu\text{M}$ ). Por su parte, las semillas de los mutantes *abi1* y *abi2* (insensibles al ABA) germinaban en su totalidad a bajas concentraciones de ABA, mientras que en concentraciones superiores (3  $\mu\text{M}$ ), presentaban valores de germinación entre el 50% y el 60%. Las semillas transgénicas FsPP2C1 germinan en su totalidad en concentraciones de ABA 0.5  $\mu\text{M}$  y alcanzan valores superiores el 80% de germinación en concentraciones 3  $\mu\text{M}$ , lo que indica una insensibilidad a la hormona similar a los mutantes ya descritos.

Todos estos datos indican la importancia de FsPP2C1 en los mecanismos que controlan la dormición de semillas, en la cual puede participar como un regulador negativo en la ruta de transducción de señales del ABA, aunque estos datos tendrán que ser corroborados mediante la correlación del fenotipo de las diferentes líneas con la expresión de FsPP2C1 por northern blot y la inducción de genes marcadores de la cascada de señalización del ABA, como ABI3 o Rab18 en un paso posterior al de la acción de las PP2Cs, en las plantas transgénicas.

## Bibliografía

- Merlot, S., Gosti, F., Guerrier, D., Vavasseur, A., Giraudat, J. (2001). *Plant J.* 25: 295-303.
- Nicolás, C., Nicolás, G., Rodríguez, D. (1996). *Physiol. Plant.* 96: 244-250.
- Nicolás, C., Rodríguez, D., Poulsen, F., Eriksen, E.N., Nicolás, G. (1997). *Plant Cell Physiol.* 38: 1303-1310.
- Lorenzo, O., Rodríguez, D., Nicolás, G., Rodríguez, P.L., Nicolás, C. (2001). *Plant Physiol.* 125: 1949-1956.
- Rodríguez, P.L. (1998). *Plant Mol. Biol.* 38: 919-927.
- Trewavas, A.J. (1987). *Bioassays* 6: 87-92.