



VNiVERSIDAD
D SALAMANCA

**Análisis funcional de proteín-fosfatasas de tipo
2-C en la dormición/germinación y las
respuestas a estrés en *Arabidopsis thaliana***

Abelardo Modrego Ruiz

Enero de 2016

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal
Facultad de Biología



UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA

**Análisis funcional de proteín-fosfatasas de tipo 2-C en la
dormición/germinación y las respuestas a estrés en
*Arabidopsis thaliana***

Tesis Doctoral, Mención *Doctor Europeus*

Abelardo Modrego Ruiz

Salamanca, Enero de 2016

D^a. M^a JESÚS ELÍAS RIVAS, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA Y FISIOLÓGÍA VEGETAL DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICO:

Que la presente Memoria titulada "**Análisis funcional de proteín-fosfatasa de tipo 2-C en la dormición/germinación y las respuestas a estrés en *Arabidopsis thaliana***" (**Functional analysis of PP2Cs in dormancy/germination and stress responses in *Arabidopsis thaliana***) ha sido realizada por el licenciado **D. Abelardo Modrego Ruiz** en el Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE) de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca, bajo la dirección de la Dra. D^a. M^a Dolores Rodríguez Martín y el Dr. D. Oscar Lorenzo Sánchez, y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas con Mención de "Doctor Europeus".

Para que así conste, firmo el presente certificado en Salamanca a 8 de Enero de 2016.

Fdo: Dra. D^a. M^a Jesús Elías Rivas

D^a. M^a DOLORES RODRÍGUEZ MARTÍN, CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA Y FISIOLOGÍA VEGETALDE Y **D. OSCAR LORENZO SÁNCHEZ**, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA Y FISIOLOGÍA VEGETAL DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAMOS:

Que la presente Memoria titulada "**Análisis funcional de proteín-fosfatasas de tipo 2-C en la dormición/germinación y las respuestas a estrés en *Arabidopsis thaliana***" (**Functional analysis of PP2Cs in dormancy/germination and stress responses in *Arabidopsis thaliana***) ha sido realizada por el licenciado **D. Abelardo Modrego Ruiz** en el Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE) de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca, bajo la dirección de la Dra. D^a. M^a Dolores Rodríguez Martín y el Dr. D. Oscar Lorenzo Sánchez, y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas con Mención de "Doctor Europeus".

Para que así conste, firmamos el presente certificado en Salamanca a 8 de Enero de 2016.

Fdo: Dra. D^a. M^a Dolores Rodríguez Martín

Fdo: Dr. D. Oscar Lorenzo Sánchez

Fdo: Abelardo Modrego Ruiz

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	3
2. DORMICIÓN Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS.	3
2.1. Etapas de la germinación y principales procesos celulares.....	4
2.2. Tipos y causas de la dormición	7
2.3. Regulación Hormonal de la dormición.	8
2.4. Metabolismo y expresión génica durante la dormición	13
2.5. Tratamientos y mecanismos de eliminación de la dormición.....	13
3. EL ÁCIDO ABCÍSIICO EN LA DORMICIÓN, GERMINACIÓN Y RESPUESTAS A ESTRÉS	17
3.1. El ABA en la dormición.....	17
3.2. El ABA en la germinación.....	18
3.3. El ABA en las respuestas de los tejidos vegetativos a estreses abióticos.....	22
4. SEÑALIZACIÓN DEL ABA. MECANISMOS DE RESPUESTA	24
4.1. Percepción de la señal	24
4.2. Transducción de la señal.....	26
4.3. Regulación de la expresión génica.....	28
5. PROTEÍN-FOSFATASAS DE TIPO 2C (PP2C)	30
5.1. Regulación de PP2Cs	32
5.2. Funciones de las PP2Cs en eucariotas.	32
5.3. Funciones de las PP2Cs en plantas.....	33
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	39
MATERIALES Y TÉCNICAS.....	
1. MATERIALES.....	43
1.1. Material vegetal	43
1.2. Microorganismos	43
1.3. Vectores plasmídicos.	45
1.4. Medios de cultivo	46
1.5. Oligonucleótidos	47
2. TÉCNICAS	49
2.1. Manipulación y cultivo de plantas.....	49
2.2. Manipulación y cultivo de microorganismos.....	49
2.3. Manipulación y análisis de ácidos nucleicos	50
2.4. Transformación de arabisopsis	54
2.5. Transformación transitoria de <i>N. benthamiana</i> : visualización de GFP y BiFC	54

ÍNDICE

2.6. Análisis de proteínas	54
2.7. Tinción histoquímica GUS (β -glucuronidasa)	54
2.8. Doble híbrido en levadura (yeast two hybrid, Y2H)	57
2.9. Obtención de imágenes.....	58
2.10. Herramientas informáticas y análisis estadísticos	58
CHAPTER 1. REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS) AND TYPE 2C PROTEIN PHOSPHATASES INTERACTION DURING SEED GERMINATION	
1. RESULTS	61
2. DISCUSIÓN.....	73
CHAPTER 2. SAURs ARE FUNCTIONAL INHIBITORS OF TYPE 2C PROTEIN PHOSPHATASES INVOLVED IN EARLY PLANT DEVELOPMENT	
1. RESULTS	81
2. DISCUSIÓN.....	113
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	
CONCLUSIONES	129
CONCLUSIONS.....	130
SUMMARY	
1. INTRODUCTION.....	131
2. CHAPTER 1. REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS) AND TYPE 2C PROTEIN PHOSPHATASES INTERACTION DURING SEED GERMINATION.....	136
3. CHAPTER 2. SAURs ARE FUNCTIONAL INHIBITORS OF TYPE 2C PROTEIN PHOSPHATASES INVOLVED IN EARLY PLANT DEVELOPMENT.....	144
<i>ADDENDUM</i>	
<i>ADDENDUM</i>	161
BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY	
BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY	179



INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La semilla es el resultado de la maduración de un óvulo y consta de un embrión rodeado por estructuras protectoras y un tejido de almacenamiento como el endospermo o el perispermo en aquellas especies cuyos cotiledones no acumulan sustancias de reserva. Tiene un papel fundamental en el ciclo de vida de las plantas, especialmente en la supervivencia y dispersión de las distintas especies, permitiéndoles colonizar nuevas localizaciones y sobrevivir a condiciones adversas.

Bajo las condiciones adecuadas, la semilla germinará y el embrión se desarrollará hasta dar lugar a una nueva plántula. Dichas condiciones incluyen tanto factores ambientales como internos y varían ampliamente de unas especies a otras. El factor interno más importante que regula la germinación de las semillas es, posiblemente, la dormición o dormición, que impide que la germinación se lleve a cabo aunque las condiciones ambientales sean adecuadas.

Desde hace tiempo, se tiene constancia de que el ácido abscísico (ABA), hormona vegetal implicada en diversos procesos durante el desarrollo y maduración de la semilla, desempeña un papel fundamental en la regulación de la germinación y la dormición de las semillas, bloqueando la primera y promoviendo la segunda. Mientras otras hormonas como las giberelinas (GAs) tienen un papel antagónico en dichos procesos.

Aunque las condiciones requeridas para germinar no son las mismas en todas las especies vegetales, todas ellas necesitan integrar las señales, tanto ambientales como hormonales, que les indicaran si el momento es el adecuado. Para ello, las células deben percibir los distintos estímulos, transmitir la información hasta el núcleo y regular la expresión de genes específicos. Dentro de este mecanismo general de transducción de señales, los procesos de fosforilación/desfosforilación tienen un papel clave en la regulación de la dormición y la germinación. El estudio de las proteínas implicadas en este mecanismo de regulación permitirá una mayor comprensión tanto de los procesos de germinación y dormición como en otros en los que estén implicados.

2. DORMICIÓN Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS

Por definición, la germinación incorpora los eventos que comienzan con la toma de agua (imbibición) por parte de una semilla quiescente seca y terminan con la elongación del eje embrionario, normalmente la raíz, hasta atravesar las estructuras que lo rodean (Bewley & Black, 1994, Bewley *et al.*, 2013). A partir de este momento comenzará el proceso de establecimiento de la nueva plántula, que incluirá la movilización de la mayor parte de las reservas desde los tejidos de almacenamiento, la división celular y el crecimiento de la plántula.

Debido al carácter sésil de las plantas, la regulación de la germinación adquiere vital importancia. Germinar bajo condiciones ambientales y espaciales adecuadas determinará la supervivencia o no de la nueva plántula, por ello, en las semillas se integra información de diversa índole, endógena y ambiental. Cuando las condiciones sean las adecuadas, la

semilla germinará. Sin embargo, no siempre es así, la dormición, definida como la incapacidad de una semilla viable para germinar bajo condiciones ideales es una característica intrínseca de algunas semillas (Hilhorst, 1995; Bewley, 1997; Li & Foley, 1997).

La dormición, en las semillas que la poseen, implica el bloqueo de la germinación por medio de diferentes mecanismos. La salida de la dormición podrá realizarse según se eliminen estos bloqueos, que no solo deberán tener lugar, sino que habrán de suceder en el orden adecuado. Teniendo esto en cuenta, podemos dar otra definición adicional al concepto de dormición, la propiedad innata de la semilla que define las condiciones ambientales que deben cumplirse antes de que la semilla pueda germinar (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006).

Existen varios tipos de dormición, que incluyen la producida por las coberturas del embrión, la incapacidad de germinar de un embrión inmaduro, o la represión por causas metabólicas. La salida de la dormición está determinada por señales ambientales, que incluyen la temperatura, luz, nitrato, y algunos componentes del humo. La ruptura de la dormición fisiológica y la inducción de la germinación están reguladas por vías de señalización hormonal, principalmente por las rutas catabólicas y biosintéticas de las giberelinas (GA) y el ácido abscísico (ABA). El balance ABA-GA es un núcleo de regulación clave que integra diferentes señales ambientales (Finkelstein *et al* 2008; Holdsworth *et al* 2008; Bentsink & Kornneeff, 2008).

2.1 Etapas de la germinación y principales procesos celulares

Con la imbibición de la semilla se inician una serie de complejos procesos, entre los que cabe destacar la puesta en marcha del metabolismo y el restablecimiento de las actividades celulares basales (Figura II), que darán como resultado la ya mencionada emergencia radicular y con ella el final de la germinación y el comienzo del desarrollo post-germinativo. Durante la imbibición se pueden distinguir 3 fases (Schopfer & Plachy, 1984; Manz *et al* ., 2005), gracias a las cuales la semilla ganará entre un 60 y un 95 % de agua:

- Fase I: Fase inicial, la semilla toma agua rápidamente debido a la diferencia de potencial hídrico con el medio. Es un proceso (principalmente) físico y no tiene relación con el estado de la semilla ni su viabilidad, el agua entra en la semilla por sus cubiertas permeables, si las tiene, o a través de regiones específicas (Hamly, 1932 Gama-Arachchige *et al.*, 2010; Turner *et al.*, 2009). La hidratación de los tejidos no sólo permite la activación del metabolismo y la reanudación de los procesos celulares, sino que también acarrea perjuicios para la semilla, pues dependiendo de la permeabilidad de las cubiertas se puede producir la pérdida de solutos como azúcares, proteínas o iones al medio. Además, si la imbibición se produce de forma brusca, habitual en semillas de gran tamaño o en aquellas con la testa dañada, la tensión física que se genera en el frente de humectación entre las células hidratadas e hinchadas y las secas/deshidratadas puede resultar en la rotura de paredes celulares, daño en la superficie de los cotiledones y extrusión celular.

- Fase II: Fase meseta/estabilización/estancamiento, el potencial hídrico está cerca de igualarse con el del medio, por tanto, la toma de agua se ralentiza hasta casi detenerse. Las células están totalmente hidratadas, y el ligero aumento de contenido hídrico se debe a la producción de solutos osmóticamente más activos que sus precursores. Durante esta fase tienen lugar importantes procesos metabólicos, como el inicio de la respiración celular, la restauración de la integridad celular, la reparación del ADN o procesos relacionados con la emergencia radicular, esto último únicamente en semillas sin dormición.

- Fase III: Fase final de la germinación, el incremento en la toma de agua está relacionado con el crecimiento del eje embrionario, por lo tanto, no se trata del proceso de imbibición *sensu stricto*.

La duración de cada una de estas fases es variable, dependiendo tanto de factores inherentes a la semilla (contenido de agua inicial, morfología, composición de las cubiertas, etc.), como de factores externos como la temperatura o la fuente de agua.

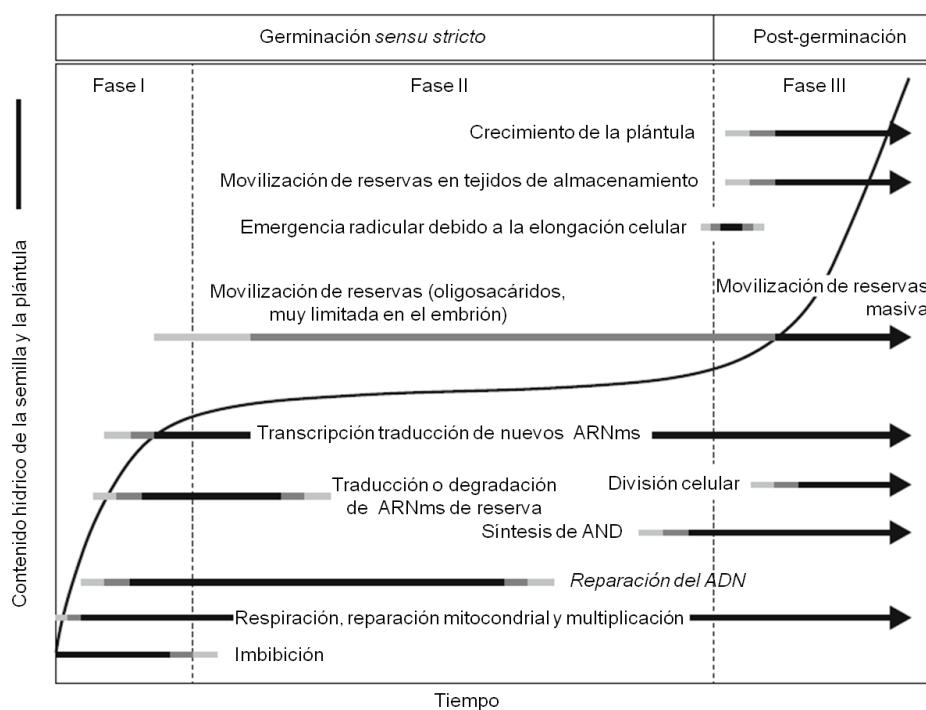


Figura II. Esquema de la relación temporal de la toma de agua por la semilla durante la germinación donde se indican los principales procesos celulares que tienen lugar durante la misma (Nonogaki *et al.*, 2010).

Como ya se ha mencionado anteriormente, la imbibición va acompañada del inicio de la respiración. Se han descrito tres vías respiratorias en semillas imbibidas, la glicólisis, la vía de las pentosas fosfato y la del ácido cítrico (ciclo de Krebs o ácido tricarbóxico). En semillas secas (aquellas con humedad <15%) la respiración es extremadamente baja, sin embargo, a los pocos minutos de la imbibición se produce un fuerte aumento del consumo de O₂ debido a la activación e hidratación de las enzimas mitocondriales. La respiración aumenta paulatinamente hasta que la hidratación de la semilla es total, momento en el cual se estabiliza o en el que incluso disminuye el consumo de oxígeno, se producirá un nuevo aumento con la proliferación de las mitocondrias y la mayor disponibilidad de oxígeno

cuando las cubiertas seminales sean perforadas. No es hasta que la emergencia radicular ha tenido lugar, que se produce la mayor parte de la movilización de las sustancias de reserva, sin embargo, la respiración requiere de sustratos para llevarse a cabo, y estos proceden de la hidrólisis de diversas moléculas, como los triacilglicéridos o los RFOs (Raffinose-Family Oligosaccharide) (Downie & Bewley, 2000; Bewley *et al.*, 2013).

El paso de un metabolismo latente a uno activo requiere de la síntesis de ARN y nuevas proteínas que lleven a cabo los numerosos cambios bioquímicos y estructurales que serán necesarios. Las semillas maduras de *arabidopsis* contienen más de 10.000 ARNms distintos, que reciben el nombre de ARNms residuales o de almacenamiento y se asocian en complejos de mensajeros ribonucleoproteicos (mRNPs). La mayor parte de estos transcritos pertenecen a las reservas de almacenamiento, proteínas de choque térmico, LEAs y enzimas biosintéticas de las reservas de almacenamiento, siendo un reflejo de la transcripción imperante en las últimas etapas de la maduración de la semilla. La mayor parte de estos transcritos serán degradados en las primeras etapas de la imbibición, sin embargo, algunos serán traducidos a proteínas, aunque la necesidad de este suceso aún permanezca sin esclarecerse. Es posible que la degradación de mensajeros relacionados con la represión de la germinación sea necesaria para que ésta se produzca.

Pero en las primeras etapas de la germinación, no sólo encontramos transcritos existentes en semillas secas, sino que tiene lugar la síntesis de transcripción *de novo*, principalmente de genes relacionados con el metabolismo basal y la recuperación de la actividad celular básica, como la respiración. Genes que tienen una alta tasa de transcripción durante la imbibición son los relacionados con la movilización de las sustancias de reserva, que tendrán un papel fundamental en las primeras etapas post-germinativas. Sin embargo, no está claro que esta síntesis *de novo* sea necesaria para la germinación, pues aún en ausencia de transcripción, ya sea por inhibidores químicos o por daño masivo en el ADN (inhibe la replicación celular, no la transcripción), ésta tiene lugar, tal vez debido a la traducción de ARNm residuales (Bassel *et al.*, 2011; Howell *et al.*, 2003; Rajjou *et al.*, 2004).

Aunque la transcripción no es esencial para la germinación, sí lo es la traducción. La inhibición de la síntesis de proteínas bloquea la expansión del embrión y con ello la germinación, lo que nos indica que en la semilla seca ya se encuentra toda la maquinaria necesaria para que se produzca la síntesis de proteínas *de novo*. Las nuevas proteínas suelen estar relacionadas con la movilización de reservas (aunque este proceso es escaso) y con la expansión celular, como la tubulina o las expansinas, éstas últimas relacionadas con la relajación de las paredes celulares para permitir su expansión. Otras enzimas relacionadas con modificaciones de la pared celular son las xiloglucanasas, celulasas, poligalacturonasas y pectinmetiltransferasas, cuya expresión en el endospermo micropilar facilitará la protusión de la radícula al debilitar las cubiertas que se oponen a la expansión celular del eje embrionario (Nonogaki *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2001; Ogawa *et al.*, 2003).

La replicación del ADN durante la germinación se produce en dos etapas. La primera de ellas tiene lugar durante las primeras etapas de la germinación y tiene por objeto reparar el material genético dañado durante la desecación de la semilla y la imbibición. La segunda

tiene lugar con posterioridad, casi al final de la germinación, siendo la antesala de la división celular que seguirá a la germinación (Sliwinska *et al.*, 2009).

2.2. Tipos y causas de la dormición

Existen diferentes criterios para diferenciar los tipos de dormición, uno de los más aceptados es el que hace referencia al momento en el que se induce la dormición, diferenciando la dormición primaria de la secundaria.

La dormición primaria es aquella que poseen las semillas maduras, permeables y recién recogidas de la planta madre. Se induce durante la maduración de la semilla en la planta madre y requiere la implicación del ABA (Hilhorst, 1995; Kucera *et al.*, 2005). La eliminación de esta dormición puede producirse por el *after-ripening* (almacenamiento seco) en el propio suelo tras la dispersión o a diferentes factores que afecten a la semilla hidratada, como la temperatura (frío o calor), la luz, hormonas (giberelinas...), componentes del humo y diferentes compuestos como el óxido nítrico (Kucera *et al.*, 2005; Krock *et al.*, 2002; Flematti *et al.*, 2004; Bailly, 2004; Bethke *et al.*, 2006).

La dormición secundaria puede inducirse en semillas con dormición fisiológica no profunda después de su dispersión. Normalmente está asociada con ciclos de dormición en el *seed bank* (reserva de semillas en el suelo) (Baskin & Baskin, 1998, 2004; Hilhorst, 1998; Fenner & Thompson, 2005). La inducción de esta dormición tendrá lugar si las condiciones para terminar la dormición primaria e iniciar la germinación no han terminado de llevarse a cabo, por ejemplo la luz o la temperatura (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). La dormición secundaria puede perderse e inducirse repetidamente hasta que las condiciones ambientales sean las adecuadas para que la germinación tenga lugar. Éste es un proceso dinámico, en el que la semilla puede encontrarse en estadios intermedios de dormición, ya sea porque está perdiendo la dormición o porque ésta es inducida de nuevo. La inducción de la dormición secundaria no requiere que la semilla haya perdido por completo la dormición, sino que podrá volver a inducirse aun cuando la semilla se encuentre en el proceso de salida de la misma si las condiciones ambientales varían.

Otro criterio de clasificación establece los distintos tipos de dormición basándose en las diferentes propiedades morfológicas y fisiológicas de la semilla (Nikolaeva, 1967, 2004, Baskin & Baskin, 1998, 2004). Atendiendo a este criterio tenemos las siguientes categorías: Dormición Fisiológica (DF), Dormición Morfológica (DM), Dormición Morfofisiológica (DMF), Dormición Física (DI) y Dormición Combinada (DF + DI).

Dormición Fisiológica (DF): es el tipo más frecuente y la tienen las semillas gimnospermas y la mayor parte de las angiospermas. Es la dormición más común en las especies presentes en los *seed banks* templados. Se puede dividir en 3 niveles: profunda, intermedia y no profunda (Baskin & Baskin, 2004).

- DF profunda: Los embriones separados de estas semillas no crecen o producen plántulas anormales. Los tratamientos con GAs no rompen su dormición, y son necesarios varios

meses de estratificación con frío (subtipo A) o calor (subtipo B) antes de que puedan germinar (Baskin & Baskin, 2004; Baskin *et al.* , 2005).

- DF no profunda: La mayor parte de las semillas tienen este tipo de dormición (Baskin & Baskin, 2004). Los embriones separados de las semillas dan lugar a plántulas normales. Tratamientos con GAs pueden romper su dormición y, dependiendo de la especie, la dormición puede romperse por escarificación, *after-ripening* en seco, o estratificación con frío o calor. Se han definido 5 subcategorías según los patrones de cambios en las respuestas fisiológicas a la temperatura. La mayor parte de las semillas pertenecen a los tipos 1 y 2, en los que el rango de temperatura en el cual la semilla puede germinar varía progresivamente durante el proceso de la pérdida de dormición no profunda de menor a mayor (tipo 1) o de mayor a menor temperatura (tipo 2). Además, la sensibilidad de las semillas a la luz y a las GAs aumenta a medida que la DF no profunda va disminuyendo progresivamente.

Dormición Morfológica (DM): la DM es evidente en semillas con embriones que están subdesarrollados, en términos de tamaño, aunque diferenciados (ej: en cotiledones, hipocotilo-radícula...). Estos embriones no son durmientes (fisiológicamente) pero necesitan tiempo para crecer y germinar.

Dormición Morfofisiológica (DMF): se da en semillas con embriones subdesarrollados que además tienen un componente fisiológico en su dormición (Baskin & Baskin, 2004). Estas semillas, por tanto, requieren un tratamiento de ruptura de la dormición, por ejemplo una combinación determinada de calor y/o frío (estratificación), que en algunos casos se puede reemplazar por la adición de GAs. Hay 8 niveles conocidos de DMF.

Dormición física (DI): es la causada por las cubiertas impermeables del parénquima en empalizada en la semilla o la cubierta del fruto que controla el movimiento del agua. La escarificación mecánica o química puede eliminarla. Sin embargo, algunos autores como Torbjørn Rage Paulsen (2013), defienden que las cubiertas impermeables servirían para evitar la emisión de volátiles y por tanto esconderse de los depredadores, y no serían un mecanismo de dormición.

Dormición Combinada (DF + DI): es característica de semillas semi-impermeables (como en DI) combinada con dormición fisiológica del embrión (Baskin & Baskin, 2004).

2.3. Regulación Hormonal de la dormición

La germinación de una semilla, al ser un evento único en su existencia, es un proceso clave para su supervivencia. La dormición establece las condiciones que han de cumplirse antes de que dicha semilla pueda germinar. Entre ellas, encontramos requerimientos de temperatura, lumínicos, hídricos u hormonales, que no solo deberán acontecer antes de que la semilla pueda germinar, sino que deberán suceder en un orden determinado (Baskin & Baskin, 1998).

Las hormonas juegan un papel fundamental en el mantenimiento o eliminación de la dormición en respuesta a las condiciones ambientales. Será tanto a través del metabolismo

como de la percepción y posterior señalización como las hormonas regulen la dormición. Algunos factores externos, como la luz (Hayes & Klein, 1974) o la temperatura (Kendall *et al.*, 2011), actuarán en parte a través de dichas rutas hormonales, y junto a la interacción existente entre las propias rutas se dibuja una compleja red de señales externas e internas que determinarán cuando la semilla pueda germinar.

Cuando se habla de dormición y hormonas, se habla de ABA y GA, y aunque otras hormonas, como el etileno o los brasinoesteroides, también tiene un papel en el proceso, quedan relegadas a un papel secundario ante las primeras (Ali-Rachedi *et al.*, 2004).

El balance entre los niveles de ABA, GA y su percepción se consideran clave en la regulación de la dormición/germinación. El ABA induce y mantiene la dormición, mientras las GAs promueven la germinación (Figura I3). La cantidad de estas hormonas en la semilla está regulada por sus tasas de síntesis y desactivación (Martin *et al.*, 2010).

Ácido Abscísico

El ABA se sintetiza por la vía de los carotenoides siendo el paso limitante la conversión de 9'-cis-neoxantina y 9-cis-violaxantina a xantoxina por la 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED). Por tanto, se considera a NCED la principal responsable de la síntesis de ABA en la regulación de la dormición (Schwartz *et al.*, 1997) (Figura I3).

El gen NCED, descubierto en maíz (Schwartz *et al.*, 1997), es un gen ampliamente representado en el reino vegetal. Es más, se conocen numerosos genes que forman parte de la familia NCED, lo que abre un amplio abanico de posibilidades de expresión espacio-temporal. En *arabidopsis*, se identificaron dos miembros de esta familia, NCED6 y NCED9, esenciales en la síntesis de ABA en el embrión y el endospermo durante la inducción de la dormición (Lefebvre *et al.*, 2006). Experimentos con inhibidores de la síntesis *de novo* de ABA, como el norfluorazon, demuestran que la síntesis de ABA es necesaria para el mantenimiento de la dormición al inducir la germinación de las semillas (Debeaujon & Koornneef, 2000; Ali-Rachedi *et al.*, 2004).

Es lógico pensar que la cantidad de ABA en la semilla no solo depende de la síntesis de la misma sino también de su catabolismo. En *arabidopsis*, la enzima responsable de esta disminución en los niveles de ABA durante el final de la maduración y la imbibición de la semilla es una 8'-hidroxilasa codificada por un miembro del citocromo P450, la CYP707A2 (Kushiro *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 2006).

La ruta de señalización del ABA se inicia con la percepción de la hormona por las proteínas PYR/PYL (Park *et al.*, 2009), a las cuales se une iniciando una cascada de modificaciones postraduccionales de varias proteínas. En ausencia de ABA, las proteínas fosfatasa tipo 2C del grupo A (PP2Cs) están reprimiendo a las *Sucrose non-fermenting-Related Protein Kinase 2* (SnRK2), reguladores positivos de la respuesta a ABA. La conformación de las proteínas PYR/PYL cambia tras su unión a la hormona permitiendo su unión a las PP2Cs, liberando a las SnRK2s de su inhibición. Las SnRK2s fosforilarán entonces a los Factores de Unión a ABRE (ABRE BINDING FACTOR, ABF), que

inducirán la respuesta a ABA (Kobayashi *et al.*, 2005; Umezawa *et al.*, 2010; Finkelstein, 2013).

Giberelinas

Las giberelinas (GAs) son una familia de 136 diterpenos tetracíclicos, la mayoría son moléculas inactivas de la ruta de síntesis y solo un pequeño grupo son hormonas activas en plantas, dependiendo de la especie será una u otra molécula de GA la mayoritaria (Thomas *et al.*, 2005) (Figura I3).

La ruta de síntesis de las GAs consta de numerosos pasos, teniendo como punto de partida el geranyl-geranyl difosfato (GGDP), que comparte con la ruta de síntesis del ABA, y como último paso de la ruta, y limitante, el catalizado por la GA3-oxidasa (GA3ox) que transforma GAs inactivas en activas, como GA9 a GA4 en *Arabidopsis* o GA20 a GA1 en lechuga (Hedden *et al.*, 1997; Nakaminami *et al.*, 2003). En *Arabidopsis*, hay 2 genes que codifican para GA3ox principalmente en semilla, *AtGA3ox1* y *AtGA3ox2*, ambos relacionados con la expansión celular en la zona de transición hipocotilo-radícula (Ogawa *et al.*, 2003).

Cuando la cantidad de GA activa es excesiva o ya no es necesaria se convierte en una forma inactiva. Este paso se realiza en gran medida gracias a la GA-2-oxidasa (GA2ox), que reduce la cantidad de GA activa en semilla y tiene un papel muy importante en la regulación de la germinación por luz (Rieu *et al.*, 2008). Otra enzima que puede catalizar este proceso es la GA metiltransferasa, aunque ésta última actúa principalmente durante el desarrollo de la semilla (Varbanova *et al.*, 2007).

La ruta de transducción de las giberelinas se encuentra bloqueada por las proteínas DELLA, que en ausencia de la hormona inhiben la transcripción de los genes de respuesta a GAs. En concreto, RGA-LIKE2 (RGL2) es la responsable de la inhibición de la germinación. Pero en presencia de GAs activas éstas se unirá a su receptor, GA-INSENSITIVE DWARF (GID1), que interactuará entonces con RGL2 permitiendo que sea reconocida por SLEEPY1 (SLY1), una E3-ubiquitín-ligasa que forma parte del complejo SCF (Skp, Cullin, and F-box), que añadirá residuos de ubiquitina a RGL2. La degradación de RGL2 por el proteosoma es un paso clave en la eliminación de la dormición y la inducción de la germinación (Tyler *et al.*, 2004).

Etileno

El etileno es una hormona promotora de la germinación y regula negativamente la dormición, muy posiblemente por medio de su interacción con el ABA (Corbineau & Côme, 1995; Beaudoin *et al.*, 2000; Matilla & Matilla-Vázquez, 2008; Linkies & Leubner-Metzger, 2012) (Figura I3). Se forma a partir de S-adenosilmetionina (SAM) gracias a la acción de la ACC sintasa (ACS) que convierte la SAM en ácido 1-aminociclopropano carboxilato (ACC), y la ACC oxidasa (ACO) que transforma este último en etileno. Mutantes de *Arabidopsis* afectados en estos pasos, como *aco*, tienen reducida su capacidad germinativa (Lin *et al.*, 2009), mientras las semillas tratadas con etileno ven ésta inducida. Además, se ha observado que la transcripción de genes que codifican para proteínas ACC

y ACO se ve incrementada durante la germinación de forma paralela a la expresión de GA3ox (Bewley *et al.*, 2012).

Cuando las moléculas de etileno se unen a sus receptores, las proteínas ETR o ETS, éstos liberan a CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1 (CTR1), una proteína-kinasa que estando unida a ETR inactiva a ETHYLENE INSENSITIVE 2 (EIN2), pero que al ser liberada permite a EIN2 inducir la síntesis de los Factores de Respuesta a Etileno (ERFs), que a su vez inducirán la transcripción de genes asociados con la respuesta a etileno y la inducción de la germinación (Wang *et al.*, 2002; Liu & Zhang., 2004; Rzewuski & Sauter, 2008; Yoo *et al.*, 2008; Stepanova & Alonso, 2009). Los mutantes *etr1* y *ein2* muestran mayor dormición que el ecotipo silvestre, relacionada con mayor sensibilidad al ABA en germinación y mayor síntesis de ABA (Beaudoin, *et al.*, 2000; Chiwocha *et al.*, 2005.; Ghassemian, *et al.*, 2000).

Brasinoesteroides

Los brasinoesteroides (BRs) son otra de las hormonas vegetales que afectan a la dormición/germinación de las semillas además de estar implicados en otros procesos (Clouse, 2001). Mutantes afectados en la síntesis y señalización de BRs muestran mayor sensibilidad a la inhibición de la germinación por ABA, sin embargo son capaces de germinar sin problemas, lo que indica que estas mutaciones afectan al potencial germinativo pero que los BRs no son estrictamente necesarios para la germinación (Clouse & Sasse, 1998; Steber & McCourt, 2001). Además, los BRs pueden inducir la germinación del mutante *sleepy* (Steber & McCourt, 2001), lo que también les relacionaría con las GAs, sin embargo, en tabaco se ha descrito que la inducción de la germinación por ambas hormonas se debe a mecanismos diferentes (Leubner-Metzger, 2001) (Figura I3).

Ambas hormonas (etileno y brasinoesteroides) inducen la expresión de genes relacionados con la elongación, lo que podría promover la germinación gracias al crecimiento del eje embrionario en ambos casos, sin embargo, lo hacen afectando a distintas familias de expansinas (Goda H *et al.*, 2002).

Auxinas

Recientemente se ha descrito que las auxinas mantienen la dormición gracias a la interacción con la ruta del ABA. Liu *et al.*, (2013) describen que semillas con la ruta de señalización de las auxinas no funcional debido a diferentes causas (sobreexpresión, silenciamiento, mutantes deficientes en la percepción o en la síntesis de la hormona) muestran pérdida de dormición muy acusada, mientras el aumento en la síntesis de auxina o en su transducción produce el efecto contrario. Esto se debe a la regulación de ABI3, un factor de transcripción de la ruta del ABA implicado en el mantenimiento de la dormición por parte de AUXIN RESPONSE FACTOR 10 (ARF10) y ARF16. Con niveles bajos de hormona, ARF10 y ARF16 son inactivados por los represores Aux/IAA AXR2 y AXR3 y la expresión de ABI3 se ve interrumpida promoviendo la salida de la dormición. sin embargo, en presencia de la hormona, ésta se une a su receptor formando el complejo

TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1 (TIR1)/ADDITIONAL F BOX PROTEIN (AFB)-AUX/INDOLE-3-ACETIC ACID (IAA)-AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) (Vanneste & Friml, 2009; Chapman & Estelle, 2009) y degrada a IAA7/AXR2 y IAA17/AXR3 dejando libres a ARF10 y ARF16, que se unirán al promotor de *ABI3* promoviendo su expresión y manteniendo la dormición (Figura I3)..

Óxido nítrico

El Óxido nítrico es una hormona gaseosa implicada en distintos procesos del crecimiento y desarrollo de las plantas, entre ellos en la eliminación de la dormición (Batak *et al.*, 2002; Bethke *et al.*, 2004: 2006a, b, 2007). Dicha afirmación se sustenta en que usando el secuestrador de NO 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido (cPTIO) se promueve el mantenimiento de la dormición (Bethke *et al.*, 2006). Además el NO induce la expresión de *CYP707A2*, gen implicado en el catabolismo del ABA (Liu *et al.*, 2009), y recientemente se ha descubierto que es capaz de nitrar a varios miembros de la familia de receptores del ABA PYR/PYL/RCAR, desactivándolos (Castillo *et al.*, 2015) y promoviendo así la salida de la dormición (Liu *et al.*, 2009) (Figura I3)..

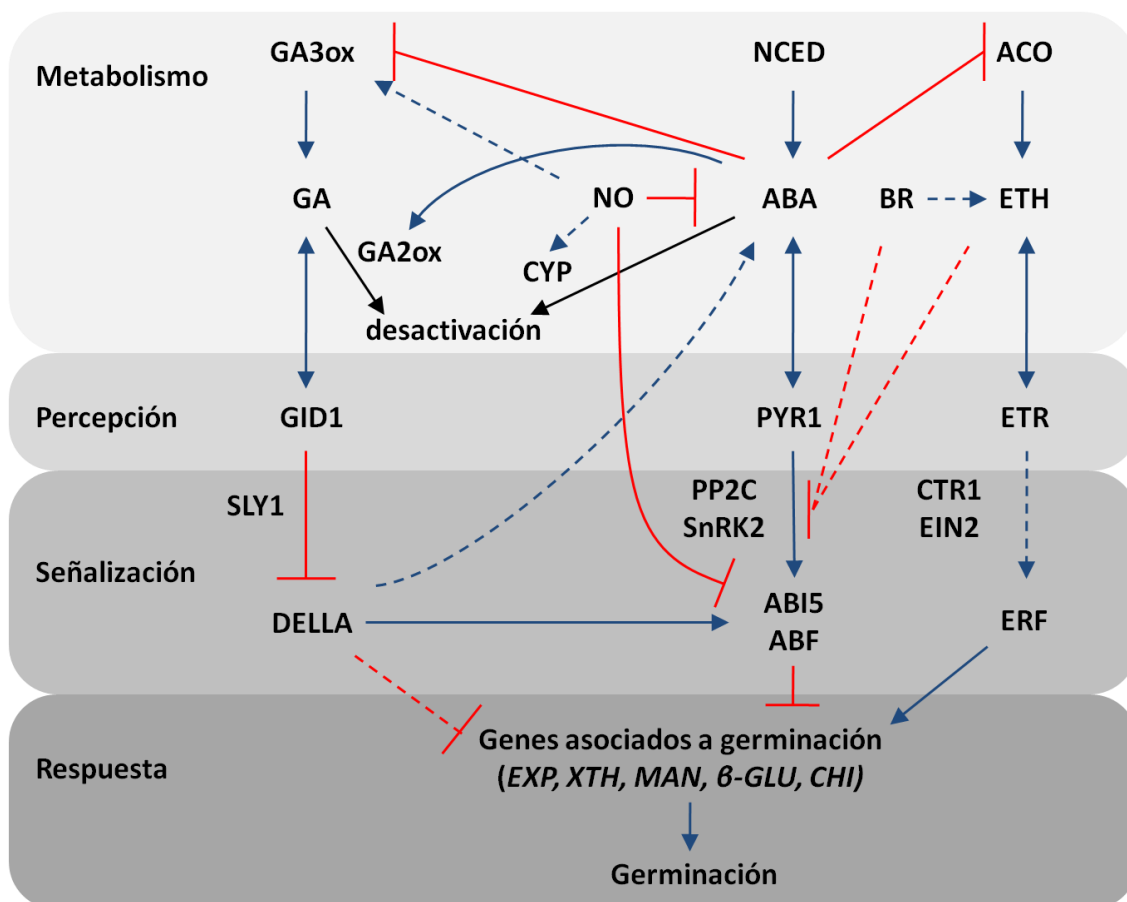


Figura I2.. Interacciones y cross-talk entre las rutas de síntesis, percepción, señalización, y respuesta de GA, ABA, Etileno, BR y NO. Las líneas azules indican activación/inducción y las líneas rojas reflejan represión. Las líneas discontinuas indican que el mecanismo de la interacción es desconocido. Adaptado de Bewley *et al.*, (2013).

2.4. Metabolismo y expresión génica durante la dormición

Aunque durante mucho tiempo se consideró a la semilla como una estructura inerte, la presencia de cavidades hidratadas (*hydrated pockets*), descubiertos por resonancia magnética nuclear (RMN, Bewley *et al.*, 2013), permitiría un metabolismo activo en algunas regiones muy concretas de las células (Bentsink & Koorneef, 2008), como puede ser la transcripción activa de algunos genes (Bove *et al.*, 2005, Leubner-Metzger, 2005) o la acumulación de proteínas (Chibani *et al.*, 2006). Por tanto, durante la dormición se podría estar regulando la expresión y transcripción de algunos genes, sin embargo, estos resultados deben analizarse en profundidad pues, si bien es cierto que ahora disponemos de evidencias de que en semillas durmientes hay metabolismo activo, los resultados obtenidos por RMN pueden ser engañosos al detectar como agua acúmulos de lípidos (Bewley *et al.*, 2013).

En estudios transcriptómicos realizados en el ecotipo Cabo Verde de *arabidopsis*, realizados con semillas durmientes y semillas con diferentes periodos de *after-ripening*, se obtuvieron datos que respaldan la existencia de una transcripción activa en semilla seca, revelando que el balance hormonal ABA-GA que regula la dormición depende de las rutas de síntesis y degradación de ambas hormonas (Cadman *et al.*, 2006). En estudios posteriores se reveló que durante la pérdida de dormición la semilla es capaz de responder con una expresión cuantitativa a diferentes estímulos externos, como las bajas temperaturas o la luz (Finch-Savage *et al.*, 2007).

Estudios realizados en semillas post-maduras indican que el número de transcritos cuya expresión disminuye es menor que el de aquellos que aumentan (Bove *et al.*, 2005; Leymarie *et al.*, 2007). Uno de los genes cuya transcripción disminuye es *DELAY OF GERMINATION 1 (DOG1)*, gen que codifica para una proteína de actividad desconocida (Alonso-Blanco *et al.*, 2003; Bentsink *et al.*, 2006) con un papel clave en la inducción y mantenimiento de la dormición de la semilla, como demuestra su mutante de pérdida de función de *arabidopsis dog1*, que carece de dormición (Bentsink *et al.*, 2006; Graeber *et al.*, 2012).

Gracias a aproximaciones de genética reversa se han identificado en *arabidopsis* dos nuevos genes relacionados estrechamente con la dormición. El primero de ellos, *DESPIERTO (DEP)*, codifica para un dedo de zinc C3HC4 de tipo RING (Really Interesting New Gene), que presenta su máxima expresión en las últimas etapas de la maduración de la semilla y su pérdida de función produce la pérdida de dormición (Barrero *et al.*, 2010). El segundo de estos genes es *ATHB20*, un gen que codifica para un factor de transcripción de tipo homeodominio-Zip. El mutante de inserción *athb20-1* presenta mayor grado de dormición que el ecotipo silvestre (Barrero *et al.*, 2010). Ambos genes modulan la sensibilidad a ABA.

2.5. Tratamientos y mecanismos de eliminación de la dormición

A continuación se describirán algunos de los factores externos más importantes que intervienen en la eliminación de la dormición. No debe olvidarse que, aunque se presenten

por separado, cada uno de ellos por si mismo puede no ser suficiente para suprimir la dormición.

Temperatura: after-ripening

El *after-ripening* es el periodo de almacenamiento en seco durante el cual la dormición disminuye progresivamente (Finkelstein *et al.*, 2008). En general, aunque no siempre, el *after-ripening* tiene lugar en plantas anuales de invierno, en las cuales la dormición se pierde con las altas temperaturas del verano para que puedan germinar a su término, mientras la estratificación con frío húmeda se da en plantas anuales de verano para romper la dormición durante los meses fríos de invierno (Probert, 2000).

El contenido de agua de la semilla deberá ser de entre un 5 y un 15 %, pues si la semilla está demasiado seca (menos de un 5 % de contenido hídrico) el *after-ripening* no se producirá (Probert, 2000), y si tiene demasiada agua (> 40 %) se podría inducir dormición secundaria. En el rango entre el 20 y el 40 % el *after-ripening* puede verse afectado, así como la viabilidad de la semilla.

Semillas de varias especies experimentan un descenso del contenido en ABA durante el *after-ripening*. Por ejemplo, en el ecotipo Cabo Verde (Cvi) de *Arabidopsis*, se observa un descenso del 10 % tras 6 meses de almacenamiento en semillas con dormición profunda (Ali-Rachedi S *et al.*, 2004), que es suficiente para eliminar por completo la dormición sugiriendo que la percepción del ABA también se ve modificada. Otro ejemplo se encuentra en *Nicotiana plumbaginifolia*, cuyas semillas almacenadas durante 10 meses pierden/disminuyen un 40 % de su contenido de ABA inicial, conjuntamente con una reducción en su tiempo de germinación y de la percepción de ABA tras la imbibición (Grappin P *et al.*, 2000). Pero no solo la percepción del ABA se ve afectada durante el *after-ripening*, en semillas imbibidas de *Sisymbrium officinale* almacenadas en seco se observa mayor sensibilidad a GAs, lo que les permite una germinación más rápida que las no almacenadas o las no tratadas (Iglesias-Fernández & Matilla, 2009).

Temperatura: Estratificación a baja temperatura

Como ya se ha comentado, algunas especies, normalmente anuales de verano, pierden la dormición si la semilla sufre un periodo de hidratación y bajas temperaturas (estratificación fría, Probert, 2000). Normalmente la temperatura para que dicha pérdida de dormición tenga lugar está entre 1 y 10 °C, sin embargo, puede llegar hasta los 15 °C en algunos casos (Bewley *et al.*, 2013).

La estratificación es efectiva en semillas con dormición del embrión (fisiológica), impuesta por las cubiertas, primaria y secundaria. En semillas de manzano, por ejemplo, se puede ver cómo los distintos componentes de la dormición son eliminados diferencialmente por la estratificación. Para eliminar la dormición del embrión se necesitan 50 días de estratificación a 5 °C, este tiempo se incrementa hasta los 60 días con el endospermo, y aún requiere más tiempo en semillas intactas (Visser, 1956).

Aunque se acepta que la temperatura más adecuada para la estratificación son aproximadamente 5 °C, Totterdell y Roberts (1979) demostraron que puede ser menor, como en el caso de *Rumex obtusifolius* que se sitúa en torno a los 1'5 °C.

El mecanismo por el cual la estratificación regula la dormición todavía no se ha desentrañado por completo y algunos puntos permanecen por completo desconocidos, por ejemplo, cuál es el mecanismo por el cual las plantas perciben la temperatura, sin embargo, si se tienen algunos datos. Por ejemplo, que los factores de transcripción *SPT* (*SPATULA*) y *PIL5* tienen un papel en la estratificación fría (Penfield *et al.* 2005). *SPT* es un regulador negativo de la germinación que pierde su papel represor tras la estratificación, mientras *PIL5* no responde a bajas temperaturas pero inhibe la germinación en oscuridad tras un tratamiento con frío. Ambos Factores de transcripción inhiben la biosíntesis de GAs reprimiendo la expresión de *GA3 OXIDASE 1* (*GA3OX1*) y *GA3OX2* (Penfield *et al.* 2005). Además, *PIL5* también promueve la expresión de *GA2ox2* (Oh *et al.*, 2006) y de *REPRESSOR OF GA1-3* (*RGA*) y *GA-INSENSITIVE* (*GAI*), 2 proteínas DELLA a través de la unión directa a su promotor en el caso de las dos últimas (Oh *et al.*, 2007).

En algunas semillas también se ha encontrado un efecto del *after-ripening* sobre el ABA, aunque no parece estar tan extendido como en el caso de las GAs. Por ejemplo, el contenido de ABA disminuye en semillas de *Pinus monticola* Douglas ex D. Don y *Fraxinus americana* L. durante la estratificación, reducción que no tiene lugar en las semillas no estratificadas (Sondheimer *et al.*, 1968, Feutado *et al.*, 2004). En otros casos, como en semillas de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco estratificadas a 5 °C durante 15 semanas, la disminución del contenido de ABA de la semilla tras su cambio a temperaturas más elevadas va acompañada de la disminución en la percepción de la hormona (Corbineau *et al.*, 2002). En semillas de haya estratificadas se produce la inducción de una proteína-fosfatasa tipo 2C (PP2C) cuya sobreexpresión en *Arabidopsis* reduce la dormición y la percepción del ABA en las semillas, lo que además indica que la fosforilación/desfosforilación de proteínas es un proceso implicado en la pérdida de dormición durante la estratificación (Reyes *et al.*, 2006).

En otros casos no son las elevadas o bajas temperaturas prolongadas, si no la alternancia entre ellas, por ejemplo las oscilaciones de temperatura que se pueden producir por el ciclo día-noche, la que disminuye la dormición, normalmente en semillas con dormición impuesta por las cubiertas. En semillas de *Rumex obtusifolius* L. es la alternancia frío-calor la que rompe la dormición (Totterdell & Roberts, 1980). en estos casos es importante, a parte de la alternancia entre altas y bajas temperaturas, que ambas superen un umbral límite, el tiempo en que las semillas están expuestas a cada una de ellas y el número de ciclos.

Luz

La luz es un factor muy importante para eliminar la dormición de las semillas. Casi todas las semillas con dormición impuesta por cubiertas tienen requerimientos de este tipo, algunas especies necesitan días largos o cortos para eliminar la dormición, y en muchos casos las necesidades lumínicas dependen de la temperatura.

En la naturaleza es la luz blanca, como la del Sol, la que rompe la dormición, siendo las longitudes de onda del rojo/naranja las más efectivas, en concreto las ondas de 660 nm (Borthwick *et al.*, 1954). Por el contrario, también existen longitudes de onda que inhiben la germinación, éstas se encuentran por encima de los 700 nm, en el rojo lejano, siendo 730 nm la longitud de onda con efectos más acusados (Borthwick *et al.*, 1954). Además, Borthwick *et al.*, (1952) descubrieron que la luz roja (R) y la roja lejana (FR) son antagonistas, pues en semillas de lechuga irradiadas alternativamente con ambas luces solo se eliminaba la dormición cuando el último pulso era de luz roja. La explicación molecular de este fenómeno se encuentra en los fitocromos, proteínas que actúan como fotorreceptores gracias a la posesión de un cromóforo. En *Arabidopsis* se han encontrado 5 genes que codifican para estos pigmentos, denominados *PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD* y *PHYE*. Cada una de las proteínas PHY codificadas por estos genes tienen sus propias características y patrones de acumulación diferenciales. Los fitocromos pueden encontrarse en dos formas, inactiva y activa. La primera tiene su rango de absorción a una longitud de onda de luz en el rojo y un pico a 660 nm, se designa Pr y podemos encontrarla en semillas durmientes. La segunda tiene su rango de absorción en la luz roja-lejana, con un máximo a 730 nm, y se denomina Pfr. Cuando cada uno de ellos es irradiado con luz en su rango de absorción cambia de forma, pasando de inactiva a activa alternativamente y determinando si la germinación podrá tener o no lugar.

Aparte de esta fotorreversión, existe otra, denominada reversión por oscuridad, descubierta en lechuga. En ella, semillas puestas en oscuridad con temperatura relativamente elevada tras haber sido irradiadas con luz roja no eran capaces de germinar (Scheibe & Lang, 1969). Esta inhibición de la germinación se debe al paso del fitocromo activo (Pfr) a inactivo (Pr) causado por la elevada temperatura y a la degradación de Pfr, mucho más lábil que Pr.

Por supuesto, en la naturaleza las semillas son irradiadas con ambos tipos de luz al mismo tiempo (los espectros de absorción se solapan, así que no hay 2 tipos de luz), por tanto, encontraremos fitocromo en forma Pr y Pfr al mismo tiempo, siendo la proporción entre ambas formas la que determinará la salida de la dormición bajo unas condiciones ambientales determinadas y en una cada especie en concreto.

La percepción de la luz a través de los fitocromos produce cambios en los niveles de las GAs y del ABA, regulando así la dormición/germinación. Esta regulación de los niveles hormonales no podría llevarse a cabo sin los genes phytochrome-interacting factors (*PIFs*). En concreto, la proteína PHYTOCHROMEINTERACTING FACTOR3-LIKE5 (*PIL5*) desempeña un papel fundamental en el proceso que nos ocupa. En el caso de las GAs, *PIL5* reprime la transcripción de los genes *GA3ox1* y *GA3ox2*, impidiendo la síntesis de GAs activas e induce la transcripción de *GA2ox2*, promoviendo la degradación de GAs activas. Sin embargo, cuando el fitocromo se encuentre en su forma Pfr se unirá *PIL5* promoviendo su degradación (Oh *et al.*, 2006) y con ello la acumulación de GAs activas. Por último, *PIL5* también induce la expresión de los genes *DELLA* a través de la unión directa a sus promotores, afectando así tanto a la acumulación de la hormona como a su señalización. En lo referente al ABA, la regulación de su metabolismo por *PIL5* también incluye la

inducción de genes implicados en la síntesis de la hormona, como *AtNCED6* en arábido, y la represión de otros implicados con su degradación, como *CYP707A2* (Oh *et al.* 2007).

Nitrato

El nitrato es otra molécula con repercusión en la dormición. Experimentos en *Sisymbrium officinale* demuestran que, junto con la luz, son los dos factores indispensables para romper la dormición. Es más, aún inhibiendo completamente la actividad nitrato reductasa en dicha especie, el nitrato es capaz de romper la dormición, indicando que el nitrato en su forma no-reducida es la propia señal para eliminar la dormición (Hilhorst, 1990).

En el ecotipo Cabo Verde de arábido, el nitrato es capaz de sustituir periodos largos de almacenamiento seco o varios días de estratificación fría, existiendo evidencias de que la señalización por nitrato afecta a las rutas de señalización del ABA y las GAs. La adición de nitrato a semillas de arábido produce la reducción de la cantidad de ABA, así mismo, induce la expresión del gen *CYP707A2*, que codifica para el citocromo P450 que cataliza la degradación del ABA (Matakiadis *et al.*, 2009).

3. EL ÁCIDO ABCÍSICO EN LA DORMICIÓN, GERMINACIÓN Y RESPUESTAS A ESTRÉS

3.1. El ABA en la dormición

Durante la maduración de las semillas se producen 2 picos en los niveles de ABA. El primero tiene su origen en los tejidos maternos (Karssen *et al.*, 1983; Kanno *et al.*, 2010), mientras el segundo, responsable de la inducción de la dormición en la fase de desecación de la semilla, tiene origen embrionario (Karssen *et al.*, 1983; Frey *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que en la regulación de los niveles de ABA en la semilla, que regularán la dormición y germinación en respuesta a las condiciones ambientales, tienen un papel fundamental la síntesis *de novo* de proteínas NCED y la degradación de la proteína CYP707A (Nambara & Marion-Poll, 2005; Seo *et al.*, 2009; Nambara *et al.*, 2010). De los 5 genes *NCED* de arábido, dos de ellos tienen elevados niveles de expresión en la semilla, *NCED6* que se expresa en el endospermo y *NCED9* que se expresa en testa y endospermo, contribuyendo ambos a la inducción de la dormición (Lefebvre *et al.*, 2006; Frey *et al.*, 2012). La degradación de ABA por CYP707A durante la maduración de la semilla también regula los niveles de ABA en semilla seca y el grado de dormición, como demuestra el análisis del mutante *cyp707a* (Okamoto *et al.*, 2006).

Tras la imbibición, el mantenimiento de la dormición también está regulado por la síntesis y el catabolismo del ABA. Durante la imbibición se ha observado una disminución en los niveles de ABA tanto en semillas durmientes como en no durmientes de varias especies. A pesar de ello, las semillas con dormición mantienen niveles de ABA más elevados y tiene menor cantidad de transcritos de CYP707A. Dichos resultados se han observado tanto en arábido como en cebada (Millar *et al.*, 2006).

La dormición secundaria debida a los ciclos estacionales también está relacionada con el metabolismo del ABA y su señalización. La dormición profunda inducida en invierno se ha relacionado con niveles elevados de ABA y la expresión de *NCED6* y *DOG1 (DELAY OF GERMINATION 1)*, y *MFT (MOTHER OF FLOWERING LOCUS T)*. *MFT* codifica una proteína de unión a fosfatidiletanolamina, la cual está regulada por *ABI3* y *ABI5*, y a su vez regula negativamente a *ABI5* reprimiendo la señal del ABA (Xi *et al.*, 2010). De forma opuesta, la dormición suave establecida en verano está relacionada con niveles reducidos de ABA y regulación positiva de *CYP707A2* y *ABI2*, reguladores negativos de la señalización de ABA (Footitt *et al.*, 2011).

Pese a que en *Arabidopsis* el endospermo está formado por una sola capa de células, en semillas maduras desempeña un papel fundamental en el control de la dormición y la germinación regulados por ABA. En primer lugar, así como la retirada de la cubierta completa de la semilla (endospermo y testa) libera de las restricciones mecánicas y permite el desarrollo a embriones diseccionados a partir de semillas durmientes, el mantenimiento del endospermo tras la retirada de la testa mantiene la dormición (Bethke *et al.*, 2007a). En segundo lugar, utilizando un lecho de cubiertas de semillas (coat bedding) se demostró que la difusión del ABA endospermico de semillas durmientes previene el crecimiento de embriones no durmientes incluso de mutantes *aba2*, deficientes en la síntesis de ABA (Lee *et al.* 2010). En embriones aislados, el ABA procedente de estas cubiertas fue capaz de inducir la acumulación de *ABI5*, cuyos niveles están relacionados con el mantenimiento de la dormición. La especificidad tisular de la sensibilidad a ABA probablemente también esté regulada por la expresión espaciotemporal de las proteínas PYR/PYL/RCAR y otros elementos de la ruta de señalización principal, como las PP2Cs o las SnRKs (Gonzalez-Guzman *et al.*, 2012M; Korneef *et al.*, 1984; Kim *et al.*, 2013; Fujii y Zhu., 2009; Nakashima *et al.*, 2009).

Además de la síntesis de ABA y los elementos de su ruta de señalización principal, existen otras proteínas que participan en la regulación de la dormición de la semilla mediada por ABA. El factor de transcripción *ABI4*, de tipo APETALA/ETHYLENE RESPONSE FACTOR (AP2/ERF), es un regulador positivo de la dormición, al inducir la biogénesis del ABA y reducir la de las GAs en semilla (Penfield *et al.*, 2006; Shu *et al.*, 2013). Otros genes implicados en la maduración de las semillas son *ABI3*, *FUSCA3 (FUS3)* y *LEAFYCOTYLEDON 2 (LEC2)*, que codifican factores de transcripción tipo B3, que controlan el almacenamiento de reservas y las proteínas LEA en la maduración de la semilla. Mutantes de estos genes presentan intolerancia a la desecación y germinación precoz debida probablemente a defectos durante la maduración (Gutierrez *et al.*, 2007; Finkelstein *et al.*, 2008; Santos-Mendoza *et al.*, 2008; Graeber *et al.*, 2012). Además, la mutación *fus3* altera los niveles de ABA en semillas en desarrollo (Gazzarrini *et al.*, 2004).

Los principales factores que afectan a la dormición relacionados con el ABA se recogen en el esquema de la figura I3.

3.2. El ABA en la germinación

La transición desde la maduración de la semilla y la dormición a la germinación refleja un cambio en el balance hormonal. Evidencias genéticas del antagonismo ABA-GA en el control de la germinación fueron encontradas gracias al aislamiento de mutantes deficientes en ABA (Koornneef *et al.*, 1982), y el mutante de respuesta a GAs *sleepy* como represor de *abi1-1* (Steber *et al.*, 1998).

El mantenimiento de la dormición está relacionado con la síntesis de ABA durante la imbibición, principalmente en el endospermo (Lee *et al.*, 2010), mientras en la salida de la dormición se produce un aumento en el catabolismo del ABA en el embrión y el endospermo mediado por CYP707A2 (Okamoto *et al.*, 2006) y el aumento de la síntesis de GAs dependiente del aumento en la transcripción de GA3ox1 y GA3ox2 y la disminución de la expresión de enzimas que inactivan las GA como GA2ox (Seo *et al.*, 2009). Los cambios en los niveles relativos de ABA y GA se acentúan gracias a la intervención de cada una de estas hormonas en la regulación del catabolismo de la otra. Por ejemplo, en *arabidopsis* los genes de biosíntesis de GAs se encuentran sobreexpresados en mutantes deficientes en ABA y reprimidos en mutantes que acumulan más ABA que el ecotipo silvestre (Seo *et al.*, 2009). De forma contraria, en ausencia de GA, las proteínas DELLA, como RLG2 inducen a XERICO, que codifica una proteína de tipo RING-finger (Really interesting New Gene) que promueve la síntesis de ABA, lo que a su vez incrementa la expresión de RGL2 y proteínas de señalización del ABA como ABI5, las GAs interrumpen el ciclo con la degradación de las proteínas DELLA (Piskurewicz *et al.*, 2008).

El balance ABA-GA refleja y de este modo media la regulación ambiental de la germinación. Dos de las principales señales para romper la dormición son el frío y la luz (Holdsworth *et al.*, 2008). Tanto la luz como el frío promueven la acumulación de GA incrementando los niveles de GA3ox y la represión de PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR3-LIKE5 (PIL5) y SPATULA, ambos factores bHLH que inhiben la expresión de GA3ox. PIL5, que es reprimido por luz, también promueve la expresión de enzimas de la síntesis de ABA, como NCED y SDR1, e inhibe la síntesis de CYP707A por medio de la activación de SOMNUS, un factor de transcripción de tipo dedo de Zinc, uniéndose a su promotor con la intervención de ABI3 (Park *et al.*, 2011), manteniendo niveles elevados de ABA en oscuridad. La luz también induce al factor de transcripción ATHB20 en el endospermo micropilar y el ápice de la raíz, lo que parece disminuir la sensibilidad a ABA en estos tejidos (Barrero *et al.*, 2010). Estudios de campo realizados recientemente sugieren que los elementos reguladores de la dormición varían con las estaciones: temperaturas frías se corresponden con estados elevados de dormición debidos al incremento en la expresión de genes implicados en la síntesis de ABA, catabolismo de GA, miembros de la familia de kinasas SnRK2, y *DELAY OF GERMINATION1 (DOG1)*, mientras en condiciones de temperaturas elevadas la dormición es menos profunda debido a PIL5 y a las proteínas DELLA, que pueden reprimirse rápidamente por exposición a la luz (Footitt *et al.*, 2011). Variaciones en la sensibilidad al frío durante la imbibición pueden achacarse a las diferencias de expresión de *FLOWERING LOCUS C (FLC)* durante la maduración; grandes cantidades de FLC promueven el catabolismo del ABA y la síntesis de GAs durante la imbibición en frío (Chiang *et al.*, 2009). Sin embargo, otro

regulador de la floración, FY, activa la dormición aparentemente inhibiendo la síntesis de GAs y promoviendo la expresión de ABI5 (Jiang *et al.*, 2012).

Los niveles de ABA también participan en la regulación de la germinación por disponibilidad de nutrientes. La adición de nitrato, tanto exógena en la germinación o vía materna durante el desarrollo de la semilla, conlleva el incremento de la expresión de *CYP707A2*, y con ello la disminución del ABA y de la dormición (Matakiadis *et al.*, 2009). Por otro lado, un amplio rango de concentraciones de azúcar (5-300 mM) retrasan la germinación de forma más prolongada que otros estreses osmóticos comparables y su efecto inhibitor del crecimiento en plántula es sinérgico con el del ABA (Laby *et al.*, 2000; Price *et al.*, 2003; Dekkers *et al.*, 2004). El mecanismo de inhibición por azúcares incluye la participación del ABA por aumento de su síntesis y disminución de su catabolismo (Xing *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2011) y la inducción y estabilización de reguladores de su ruta, como los factores de transcripción ABI (Arroyo *et al.*, 2003; Bossi *et al.*, 2009; Finkelstein *et al.*, 2011).

La relación del ABA con los nutrientes durante la germinación también incluye la inhibición de la movilización de los lípidos de reserva, aunque no la bloquea del todo, lo que conlleva la acumulación de sacarosa derivada del triacilglicerol (Pritchard *et al.*, 2002). Bajo condiciones de estrés, el catabolismo de los lípidos está limitado al endospermo debido a la represión del ABA por medio de ABI4, que sólo se expresa en el embrión, induciendo la quiescencia del embrión (Penfield *et al.*, 2006). De la misma forma, la inducción de ABI5 por bajos niveles de sacarosa y ABA está estrechamente relacionada con el mantenimiento de la tolerancia a la desecación de plántulas con desarrollo bloqueado (*arrested seedling*) (Lopez-Molina *et al.*, 2001). El ABA, ABI5 y posiblemente otros factores de transcripción prevengan la pérdida de la tolerancia a la desecación retrasando la salida de la fase dos de la germinación (el periodo tras la imbibición cuando el metabolismo se incrementa pero el crecimiento se detiene) en condiciones de baja humedad. A diferencia de ABI4, ABI5 se expresa en la región del endospermo micropilar, donde puede inhibir la expresión de enzimas requeridas para el ablandamiento de las cubiertas y limitar la emergencia radicular.

Se han identificado numerosos reguladores de la expresión, de la estabilidad y de la actividad de ABI5 que contribuyen a la regulación negativa de la señalización del ABA (revisado en Fujita *et al.*, 2011). Entre ellos encontramos varias E3 ligasas (KEG, DWA1, DWA2 y SIZ1) implicadas en la ubiquitinación y sumoilación de ABI5, la proteína MFT (MOTHER OF FT AND TFL1), que está inducida por las proteínas DELLA y por ABI5 y que, sin embargo, reprime la expresión de ABI5, y un grupo de proteínas de función desconocida (AFPs) que se cree que estabilizan ABI5 interaccionando con la proteína TOPLESS para inhibir la expresión de genes regulados por ABI5 (Lopez-Molina *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2008; Pauwels *et al.*, 2010). Aunque KEG se localiza en la red del aparato de Golgi, donde no debería tener acceso a proteínas nucleares como ABI5, en estudios recientes se ha demostrado que KEG tiene un papel importante en la degradación de ABI5 en el citoplasma, ya sea antes de la entrada al núcleo o tras su posterior salida (Liu & Stone, 2013).

En la regulación de la germinación también intervienen otras hormonas que interactúan con el ABA, como los brasinoesteroides (BR), el etileno, las auxinas o las citokinas.

Una de las mayores evidencias de la interacción del ABA con los BR fue el descubrimiento de que líneas deficientes en BR e insensibles a BR eran hipersensibles al ABA (Li *et al.*, 2001; Steber & McCourt, 2001). Desde entonces se ha descubierto que el ABA y los BR regulan cientos de genes conjuntamente, con efecto similar o contrario (Nemhauser *et al.*, 2006). Al menos parte de la convergencia en la señalización se debe a que el ABA regula componentes de la señalización de los BR por debajo de su percepción (Zhang *et al.*, 2009).

Fue en la búsqueda de supresores y activadores del efecto del ABA en la germinación donde se vio su interacción con el etileno, al aislarse nuevos alelos de genes de respuesta a etileno como *ETHYLENE INSENSITIVE 2 (EIN2)* y *CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1 (CTR1)* (Beaudoin *et al.*, 2000; Ghassemian *et al.*, 2000). Estudios en *Lepidium sativum* muestran que el etileno producido principalmente en la radícula induce genes de ablandamiento de las cubiertas seminales en el endospermo micropilar, actuando antagónicamente al ABA en este proceso (Linkies *et al.*, 2009). Estos efectos antagónicos se acentúan por la represión de la ACC oxidasa por parte del ABA (Cheng *et al.*, 2009; Linkies *et al.*, 2009) o por la represión de la familia de proteínas NCED y la inducción de varios miembros de la familia CYP707A en plántulas (Cheng *et al.*, 2009) aunque este efecto no se ha corroborado en la germinación (Linkies *et al.*, 2009).

La interacción entre el ABA y las auxinas en la germinación se puso de manifiesto debido a que la aplicación exógena de auxinas incrementa el efecto inhibitorio del ABA, y a que el factor de respuesta a ABA 10 (ARF10) aumenta la sensibilidad a ABA (Liu *et al.*, 2007).

Las citokinas activan la germinación, aunque el ABA inhibe la síntesis de citokinas reduciendo la expresión de los genes isopentenil transferasa expresados en semilla (Wang *et al.*, 2011). Las citokinas, por su parte, contrarrestan esta inhibición aumentando la expresión represores de la transcripción tipo A ARR (Arabidopsis Response Regulators), que reducen la expresión de elementos de la señalización del ABA como ABI5 (Finkesltein, 2013).

En la figura I3 se muestran esquemáticamente algunas de las interacciones hormonales y ambientales que regulan la dormición y la germinación de las semillas.

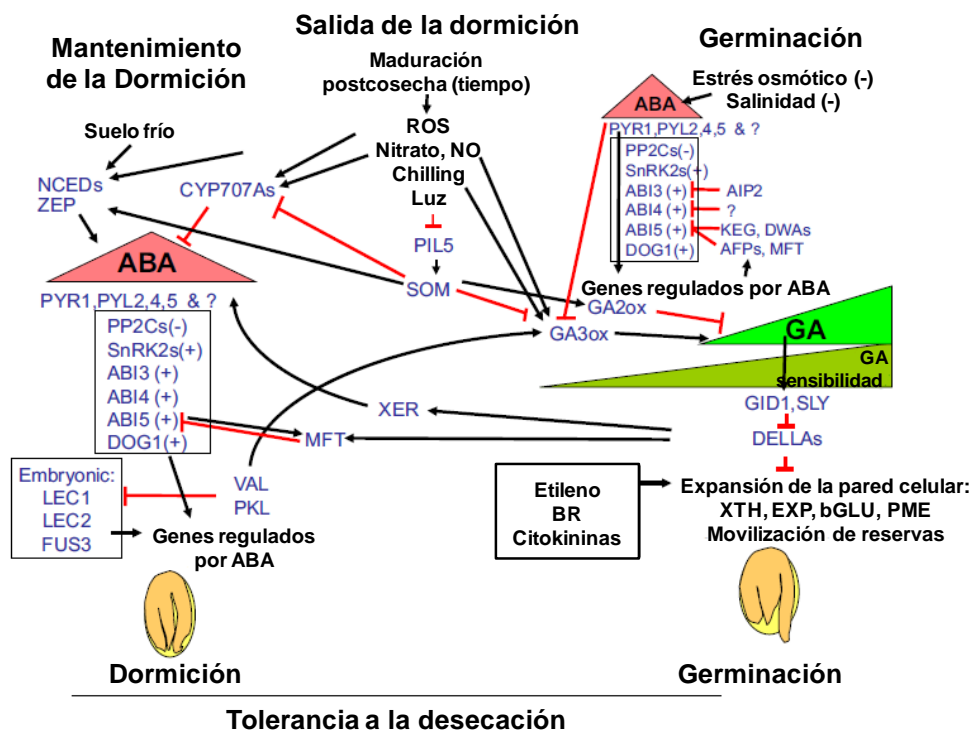


FIGURA I3. Representación esquemática de algunas de las interacciones hormonales y ambientales que regulan la dormición y la germinación de las semillas. Los receptores de ABA indicados son los más expresados en semillas secas e imbibidas. Los triángulos rojos representan la acumulación de ABA durante el mantenimiento de la dormición o en respuesta a estreses tras la salida de la dormición. Las flechas indican regulaciones positivas y las líneas rojas representan represión, ilustrando las distintas interacciones que controlan el balance ABA-GA y su feedback. Tomado de Finkelstein (2013).

3.3. El ABA en las respuestas de los tejidos vegetativos a estreses abióticos

Una función crucial del ABA durante el crecimiento vegetativo es mediar en la respuesta a los estreses medioambientales como la sequía, la salinidad y el frío (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006; Qin *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012). Estos estreses tienen en común causar estrés oxidativo y osmótico en las células, aunque se diferencian en otros efectos y, por tanto, la respuesta de la planta frente a ellos no es la misma. El ABA también está implicado en la respuesta a hipoxia por inundación, lo que conduce a la reducción de los niveles de ABA en los tejidos sumergidos y a incrementar sus niveles en la parte aérea de las plantas sumergidas (Hsu *et al.*, 2011). Esto puede explicar las observaciones donde la aplicación exógena de ABA aumentaba la tolerancia al estrés por hipoxia en raíces, pero no en tallos/brotes (Ellis *et al.* 1999), donde los niveles de ABA ya deberían ser elevados.

A nivel de planta entera, ligeros incrementos en los niveles de ABA (característicos del estrés hídrico moderado) promueven el crecimiento de la raíz pero inhiben el de la parte aérea incrementando la relación raíz-parte aérea. Estas raíces responden a los gradientes de humedad por "hidrotropismo" positivo (Moriwaki *et al.*, 2012). El ABA regula esta respuesta a través de su ruta de señalización principal (Antoni *et al.*, 2013). Sin embargo, el estrés hídrico severo inhibe el crecimiento tanto de las raíces como de los tallos/brotes, pero promueve la formación de raíces laterales, como en la rizogénesis inducida por sequía ("drought rhizogenesis") (Vartanian *et al.*, 1994). Gracias a estudios genéticos

sabemos que la rizogénesis inducida por sequía está regulada por ABA, auxinas y algunas giberelinas, y que no existe en el mutante *abi1-1* insensible a ABA, pero sí en los mutantes *abi2-1* o *abi3*.

El flujo de agua a través de las membranas celulares está regulado por las acuaporinas. Estas proteínas pueden localizarse en la membrana plasmática (PIPs, Plasma Membrane Intrinsic Proteins) o en el tonoplasto (TIPs, Tonoplast Intrinsic Protein) y su abundancia y actividad está regulada por diversos factores (revisado en Maurel *et al.*, 2008). En *Arabidopsis* hay varios representantes de cada una de estas familias con expresión diferencial en órganos y tejidos y diferente respuesta a tratamientos con ABA o estrés (Jang *et al.*, 2004 ; Alexandersson *et al.*, 2005). La expresión de la mayor parte de las acuaporinas está inhibida durante el estrés hídrico y el salino, lo que limitaría las pérdidas de agua. La desfosforilación de las acuaporinas mediada por ABA limitaría el flujo de agua tanto a nivel celular como en el sistema vascular de la planta (Kline *et al.*, 2011; Shatil-Cohen *et al.*, 2011). Sin embargo, dos de las PIPs de *Arabidopsis* (*EtPIP1;4* y *AtPIP2,5*) son inducidas por sequía y altamente expresadas en las células guarda (Alexandersson *et al.*, 2005; Winter *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008), lo que facilitaría la oclusión estomática.

Dentro de las células, el ABA induce la acumulación de protectores osmóticos, como pequeñas proteínas hidrofílicas, azúcares y prolina, o activa mecanismos de detoxificación que confieren tolerancia al estrés, regulando el balance redox o modificando el transporte de iones para restablecer la homeostasis celular. El estudio de la expresión de genes inducidos por ABA y estrés durante el crecimiento vegetativo nos ha señalado que existen 2 respuestas, una temprana y temporal, y una tardía y duradera. La respuesta temprana incluye la transcripción de genes que codifican para proteínas reguladoras como factores de transcripción, proteín-quinasas y fosfatasa y un surtido de genes de respuesta temprana a deshidratación (*erd*, *early response to dehydration*), muchos de los cuales codifican proteínas de función desconocida (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006; Fujita *et al.*, 2011). Los genes de la respuesta tardía reciben su nombre dependiendo del estrés en el que fueron identificados originalmente, por ejemplo los genes *rd* (*Responsive to Dehydration*) de respuesta a deshidratación o los *cor* (*cold-regulated*) regulados por frío. Entre estos genes encontramos algunos que codifican, entre otras, proteasas, chaperoninas, canales de agua e iones, enzimas que detoxifican especies reactivas de oxígeno, o proteínas con semejanzas estructurales con las proteínas LEA, que se acumulan durante la fase de adquisición de resistencia a la desecación en semillas y que podrían estar implicadas en aspectos adaptativos de tolerancia inducida (Ingram & Bartels, 1996).

Estudios transcriptómicos a gran escala han revelado que el 25-50 % de los genes regulados por ABA están también regulados por salinidad o sequía, cuya comparación entre ellos devuelve resultados incluso mejores (30-70 %), sin embargo en las comparativas con estrés por frío los resultados no señalan un nivel de solapamiento mucho menor, en parte porque hay muchos menos genes regulados por frío (Nakashima *et al.*, 2009; Matsui *et al.*, 2008; Zeller *et al.*, 2009).

Teniendo todos estos datos en cuenta, se han propuesto tres rutas de señalización para canalizar la respuesta al estrés por sequía y al salino y otro adicional para el estrés por frío (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006; Nakashima *et al.*, 2009 ; Zhou *et al.*, 2011) (Figura I4). La ruta dependiente de ABA está controlada principalmente por factores de transcripción bZIP, regulados por la ruta de señalización principal, aunque también intervienen los factores de transcripción NAC y MYC/MYB. La ruta independiente de ABA depende de los factores DREB, dedos de Zinc, homeodominios y NAC. Algunos de los miembros de la familia DREB1 también son conocidos como CBFs (Cold Response element binding Factors, factores de unión a elementos de respuesta a frío), reflejando su papel en la respuesta a frío, mientras otros miembros intervienen en la respuesta a salinidad.

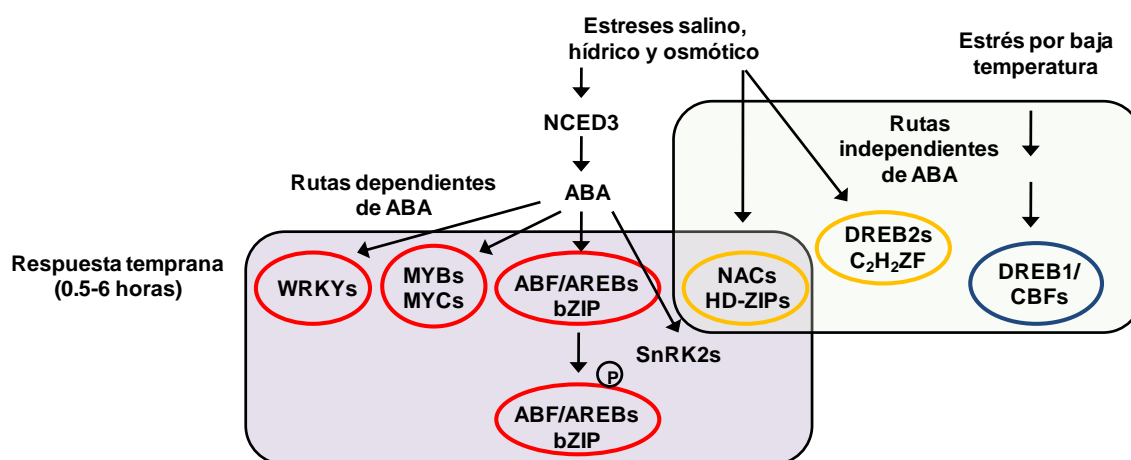


Figura I4. Esquema de las rutas dependientes e independientes al ABA en respuesta a estreses abióticos. Adaptado de Finkelstein (2013).

4. SEÑALIZACIÓN DEL ABA. MECANISMOS DE RESPUESTA

4.1. Percepción de la señal

Durante los últimos 50 años se han realizado grandes esfuerzos para identificar las moléculas receptoras del ácido abscísico, identificando más de 200 genes implicados en el metabolismo y la respuesta a ABA (Finkelstein, 2013). Sin embargo, ha sido durante los últimos años cuando se han descrito 3 clases de receptores de ABA, cada uno de ellos con una localización celular diferente, lo que concordaría con los estudios que han demostrado que la percepción del ABA sucede tanto a nivel intracelular como extracelular (Allan *et al.*, 1994; Schwartz *et al.*, 1994; Jeannette *et al.*, 1999).

Los receptores mejor caracterizados son los miembros de una familia de proteínas denominada PYR (pyrabactin resistant), PYLs (PYR-Like) o RCARs (Regulatory component of ABA receptor), que constituyen el núcleo de la ruta de señalización de ABA (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009). 13 miembros de los 14 de los que consta esta familia funcionan como receptores de ABA (Fujii *et al.*, 2009). El ABA se une a estas proteínas, localizadas en núcleo y citoplasma (Ma *et al.*, 2009; Cutler *et al.*, 2010; Saavedra *et al.*, 2010), cambiando su conformación y permitiendo su unión a las proteín-fosfatasa de tipo

2C (PP2Cs), conocidas como reguladores negativos de su ruta de señalización, inhibiendo su actividad. La unión del ABA a estas proteínas no solo se ha descrito sino que gracias a estudios de cristalografía se conocen cuales son los residuos clave para que se lleve a cabo y qué cambios conformacionales tienen lugar en los receptores tras la unión (Yin *et al.*, 2009) (Figura I5).

Otro receptor de ABA es la subunidad H de la Mg-quelatasa (CHLH), proteína requerida en la síntesis de protoporfirina (Shen *et al.*, 2006). Dicha proteína se encuentra localizada en los plastos y su papel como receptor de ABA ha sido puesto en entredicho por varios trabajos posteriores (Mülller y Hansson, 2009; Tsuzuki *et al.*, 2011). Esta discrepancia puede deberse a la complejidad para llevar a cabo los experimentos expuestos en el artículo inicial. En cualquier caso su método de actuación incluye la unión a varios factores de transcripción de la familia WRKY en presencia de ABA, evitando que éstos migren al núcleo y repriman la expresión de genes de respuesta a ABA, incluyendo la represión de varios factores de transcripción ABI (Shang *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012).

Por último, gracias a una aproximación bioinformática, se ha descrito que dos proteínas GTG (G-protein coupled receptor (GPCR)-type G-proteins), GTG1 y GTG2, pueden unir ABA (Pandey *et al.*, 2009). Este resultado ha sido corroborado por estudios realizados en levadura e *in vitro* (Kharenko *et al.*, 2013). Experimentos de localización subcelular la sitúan en la membrana plasmática (Pandey *et al.*, 2009), en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (Jaffé *et al.*, 2012). Aunque en los estudios de Pandey *et al.*, (2009) el doble mutante de pérdida de función de los genes *GTG* mostraba un fenotipo de insensibilidad parcial a ABA, nuevos estudios realizados con otros alelos mutantes *gtg* no corroboran dichos resultados (Jaffé *et al.*, 2012), con lo que se requieren mas investigaciones para confirmar o negar el papel de ambas proteínas GTG como receptores de ABA.

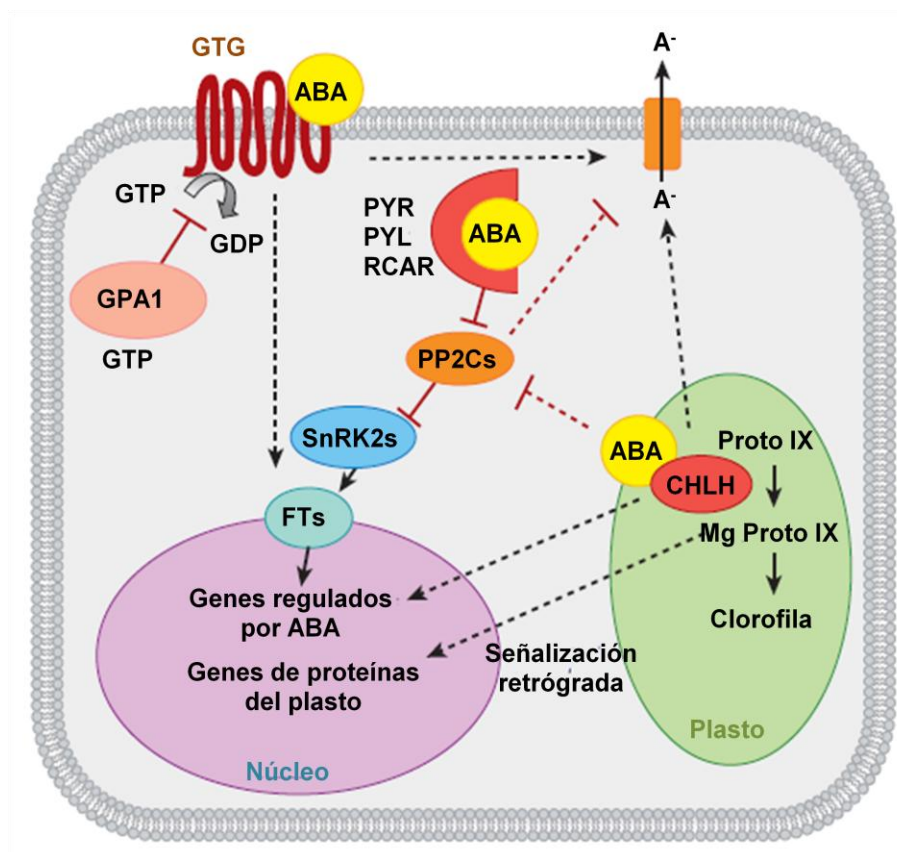


Figura I5. Modelo de interacción del ABA con las tres clases de receptores descritos en la actualidad: PYR/PYL/RCAR (Pyrabactin resistant/PYR-Like/Regulatory component of ABA receptor), CHLH (subunidad H de la Mg-quelatasa) y GTG (G-protein coupled receptor (GPCR)-type G-proteins). Todos participan en la respuesta génica y el control de las células guarda (indicado como A-channel). Las líneas continuas indican interacciones directas y las líneas discontinuas interacciones desconocidas. Las flechas indican interacciones positivas y las barras negativas. Tomado de Cutler *et al.*, (2010).

4.2. Transducción de la señal

La señalización del ABA comienza con la percepción de la hormona por parte de los receptores PYR/PYL/RCAR (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009) e implica a un amplio abanico de componentes, entre los que podemos encontrar segundos mensajeros (Ca^{2+} , NO, IP₃, GMPc...), fosfatasas, kinasas, factores de transcripción... (Finkelstein, 2013)

Mensajeros secundarios

Entre los segundos mensajeros del ABA se encuentran derivados de fosfolípidos, Ca^{2+} , óxido nítrico (NO), ADP-ribosa cíclico, GMP cíclico y especies reactivas de oxígeno (ROS). Varios de estos mensajeros producirán cambios en la concentración de Ca^{2+} del citosol, ya sea por liberación de Ca^{2+} desde compartimentos intracelulares, como los fosfoinosítidos o el propio Ca^{2+} , o activando los canales de la membrana plasmática, como sucede con los ROS.

La producción de IP₃ en plantas se debe a la actividad de la fosfolipasa C (PLC), que se convierte rápidamente en IP₆ y contribuye a la inhibición de la apertura estomática por

ABA promoviendo la liberación de Ca^{2+} y la inhibición de los canales de entrada de K^{+} (Berridge, 1993). El diacilglicerol (DAG), el otro producto de la actividad de PLC, puede ser fosforilado para producir ácido fosfatídico (PA) (Lee & Assmann, 1991). Por otra parte el PA se produce también por la actividad de la fosfolipasa D (PLD) (Fan *et al.*, 1997). Además de las múltiples rutas metabólicas que interconectan estas señales potenciales, la mayoría de estas enzimas pertenecen a familias génicas. Muchas de las PLD se inducen por estreses (Wang *et al.*, 2000) pero solo la expresión y actividad de la PLD α 1 y PLD δ aumentan por ABA (Uraji *et al.*, 2012). Las líneas mutantes de estos genes son insensibles al cierre estomático y la inhibición de la germinación inducidos por ABA. Además el PA se une a ABI1 (PP2C-ABI1) reteniéndolo en la membrana plasmática y bloqueando su capacidad para interferir en la respuesta a ABA. Otro ejemplo del efecto del PA es la producción de NO y ROS promovida por ABA, que resulta en el cierre estomático a través de los canales iónicos (Jacob *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2009).

El ABA puede inducir el cierre estomático por aumento del Ca^{2+} citosólico, por un aumento en la sensibilidad de la señalización del calcio o por una ruta independiente (Siegele *et al.*, 2009). Existen diferentes proteínas de unión a calcio, calmodulinas (CaM), proteínas-quinasas dependientes de calcio (CDPK/CPKs) y calcineurina B-like proteins (CBLs), que permiten a este mensajero secundario participar de forma específica en diferentes procesos (Luan, 2009; Weinl & Kudla, 2009).

El cierre estomático inducido por ABA también depende, parcialmente, de la alcalinización que precede a la producción tanto de ROS como de NO (Irving *et al.*, 1992). En este proceso es fundamental la SnRK2 OST1 (SNF1 related protein kinase 2 OST1), que pertenece a la ruta de señalización principal del ABA. Este proceso de alcalinización es necesario aunque insuficiente para que tengan lugar los cambios en la expresión génica inducidos por ABA (van der Veen *et al.*, 1992).

Ruta principal de señalización

Durante años las PP2Cs del cluster A fueron conocidas como reguladores negativos de la señalización del ABA tanto en semillas como en tejidos vegetativos (Koornneef *et al.*, 1984, 2002; Leung *et al.*, 1994, 1997; Meyer *et al.*, 1994; Rodríguez *et al.*, 1998a, 1998b). Posteriormente, se descubrió que las proteínas PYR/PYL/RCAR eran las responsables de la percepción del ABA (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009). Este hecho permitió describir un modelo mediante el cual en ausencia de ABA, las PP2Cs inactivaban de forma continua a SnRK2, un regulador positivo esencial de la ruta del ABA, por desfosforilación (Yoshida *et al.*, 2006; Vlad *et al.*, 2009; Umezawa *et al.*, 2009). Por su parte las PYR/PYL/RCAR se encuentran en el núcleo y el citoplasma como monómeros o formando homodímeros o heterodímeros (Yin *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2013). En presencia de ABA, los receptores se unen a las PP2Cs inhibiendo su actividad y permitiendo la autofosforilación y consecuente activación de SnRK2. Una vez activadas, las SnRK2s fosforilan a sus sustratos, elementos posteriores de la ruta del ABA, entre los que se encuentran las proteínas AREB (ABA Responsive Element-Binding), los ABF (ABA Responsive Element-Factor) y los factores de transcripción B-zip que activan la transcripción de los genes de respuesta a ABA y los

procesos regulados por ABA (Kobayashi *et al.*, 2005; Umezawa *et al.*, 2010; Finkelstein, 2013) (Figura I6)

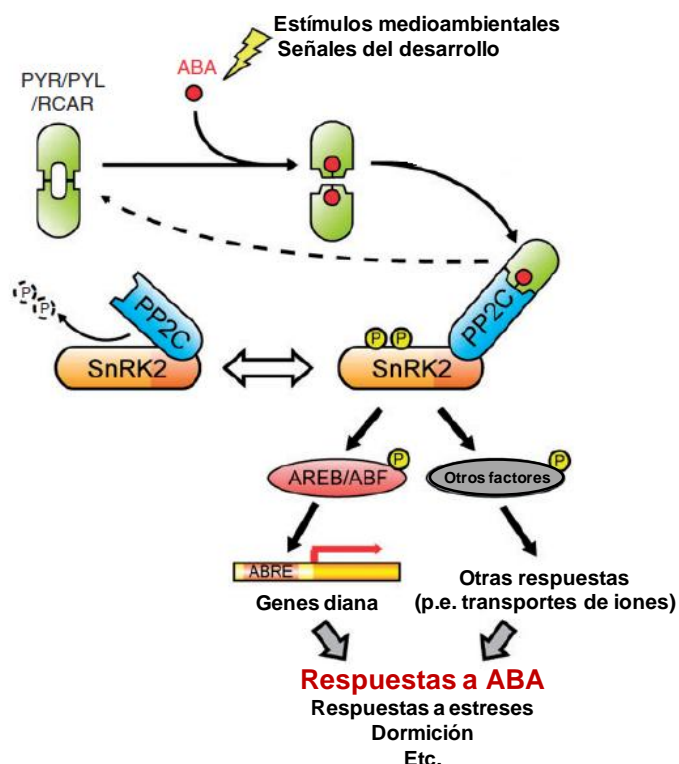


Figura I6. Esquema resumen de la ruta de señalización principal del ABA. Adaptado de Umezawa *et al.*, (2010).

Mediante estudios *in vitro* Fujii *et al.* (2009) demostraron que combinando PYR1, ABI1, SnRK2.6 y ABF2 se conseguía la fosforilación de ABF2 inducida por ABA, demostrando así que estas 4 proteínas son los componentes principales de la ruta de señalización fundamental del ABA.

Gracias a estudios de cristalografía se descubrió que la unión del ABA induce un cambio conformacional en las proteínas PYR/PYL/RCAR que permite su unión a las PP2C-A de manera estable. Las proteínas PYR/PYL son láminas beta con 7 cadenas que forman una cavidad central. La superficie de dicha cavidad contiene hélices alfa que junto con la parte interna de la lámina beta forma el sitio de unión a ABA. Dos bucles beta altamente conservados hacen las veces de tapa de la cavidad, los cuales en ausencia de ABA están abiertos y permiten al ABA acceder a la cavidad. Cuando se produce la unión del ABA, los bucles adquieren la conformación de tapa cerrada, creando en su exterior el sitio de unión a las PP2Cs. La interacción resulta en las hélices beta cubriendo el sitio activo de las PP2Cs inactivándolas. Esto sugiere que los receptores de ABA actúan como inhibidores de PP2Cs de manera dependiente de ABA (Nishimura *et al.*, 2009; Miyazono *et al.*, 2009; Melcher *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2009).

4.3. Regulación de la expresión génica

La respuesta al ABA incluye cambios en la expresión génica, que pueden incluir desde cambios en la transcripción a cambios en el procesamiento del transcrito y su estabilidad. Los cambios específicos dependen del tipo celular y de su estadio de desarrollo. No existe un conjunto universal de genes regulados por ABA, pero normalmente incluye aquellos que contribuyen a la adquisición de tolerancia a la deshidratación. La deshidratación puede estar determinada por el desarrollo, como en la desecación de la semilla o el polen, o en respuesta a estreses ambientales, tales como sequía, salinidad o bajas temperaturas (Cutler *et al.*, 2010).

El ABA altera de manera sustancial la expresión génica, como se ha demostrado mediante análisis transcriptómicos (Sekiet *al.*, 2002). Mediante secuenciación masiva de transcritos de *Arabidopsis* se identificaron más de 1300 genes regulados por ABA, de los cuales la mitad tenían la expresión reducida por ABA (Hothet *al.*, 2002). En el mutante *abi-1* la expresión del 90% de estos 1300 genes está afectada, lo que indica la importancia del locus ABI1, una PP2C del complejo receptor, en la transducción de la señal inducida por ABA. Entre los intermediarios de las respuestas inducidas por ABA se encuentran el regulador transcripcional VIVIPAROUS1 (VP1)/ABI3 y los factores de transcripción tipo (AP2) bZIP y APETALA2 (Finkelstein *et al.*, 2002).

Los elementos reguladores responsables de mediar los cambios inducidos por ABA en la expresión génica se han identificado mediante aproximaciones genéticas y bioquímicas. Las clases más comunes de secuencias reguladoras en el genoma que confieren inducibilidad por ABA son los *G-box* ABA response elements (ABREs) a los que se unen factores de transcripción de la familia de cremalleras básicas de leucina (bZIP). Además, muchos genes regulados por ABA tiene sitios de unión para las proteínas de las familias MYC y MYB. Las secuencias ricas en guanina y citosina que se encuentran en los *Drought Response Elements* (DREs) o los Coupling Elements (CEs) a los que se unen las proteínas de la familia Apetala 2, como las *Drought Response Element Binding* (DREBs), o los motivos RY/Sph a los que se unen proteínas con dominio B3 como ABA-INSENSITIVE3/VIVIPAROUS1 (ABI3/VP1).

Las proteínas de unión a elementos ABRE (AREB o ABF) se aislaron mediante técnicas de híbrido simple usando como cebo las secuencias ABRE. Las bZIP forman una subfamilia con 9 homólogos en *Arabidopsis* con un dominio bZIP altamente conservado y 3 regiones terminales en la región N-terminal denominadas C1, C2 y C3 (Jakobi *et al.*, 2002). Estos 9 homólogos se pueden dividir en 2 grupos, la familia ABI5 (ABI5, EEL, DPBF2, DPBF4 y AREB3), que se expresan principalmente en semillas y están implicados en el desarrollo y la germinación de las semillas (Bensmihen *et al.*, 2005; Bensmihen *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002), y la familia AREB/ABF (ABF1, AREB1/ABF2, AREB2/ABF4 y ABF3), cuyos miembros se expresan principalmente en tejidos vegetativos bajo estreses abióticos.

Los factores de transcripción bZIP interactúan con los elementos *cis* ABRE (ABA-Responsive Elements), que son *G-boxes* con el motivo ACGT en zonas promotoras (Hattori *et al.*, 2002). Sin embargo para que se produzca una respuesta óptima a ABA es necesario

un segundo elemento *cis*, el *coupling element* (CE), que es similar a los elementos ABRE y DRE (*Dehydration-Responsive Element*) (Kizis & Pagès, 2002; Narusaka *et al.*, 2003).

AREB1 requiere de la presencia de ABA para conseguir una activación total que se regula por la fosforilación múltiple del dominio conservado AREB1 de manera dependiente de ABA por las SnRK2.2, 2.3 y 2.6 (Furihata *et al.*, 2006). Mutantes de pérdida de función de SnRK2.2 y 2.3 ven reducida la fosforilación de ABF y el triple mutante SnRK2.2, 2.3 y 2.6. carece de respuesta génica inducida por ABA.

ABI3, ABI4 y ABI5 son factores de transcripción fundamentales de la respuesta a ABA, ABI4 es del tipo AP2-like, ABI5 es de tipo bZIP y ABI3 es de tipo B3 (Finkelstein *et al.*, 1998; Finkelstein *et al.*, 2000; López-Molina *et al.*, 2000).

ABI4 es un factor de transcripción AP2 que participa en la señalización de ABA durante el desarrollo de la semilla y la germinación (Finkelstein *et al.*, 1998) y en la respuesta a azúcar. Las plantas mutantes *abi4* son más tolerantes que el genotipo silvestre a estrés osmótico y salino durante la germinación y el desarrollo temprano de la plántula (Quesada *et al.*, 2000). ABI4 se une directamente a la región promotora CE de tres genes activando su expresión: *ABI5* y *SBE2.2* en la ruta de respuesta a azúcar y *ABI4* autoregulándose (Bossi *et al.*, 2009). *ABI4* también regula la dormición positivamente induciendo la síntesis de ABA (Shu *et al.*, 2013).

ABI3, también llamado ViviParous1 (VP1), se une a elementos *cis* RY/Sph y actúa como intermediario de la respuesta a ABA en semilla. Promueve la deposición de sustancias de reserva, la adquisición de tolerancia a la desecación y la dormición (McCarthy, 1995).

ABI5 es un factor de transcripción bZIP que se une a la G-box CACGTG (Lee *et al.*, 2012) y se induce fuertemente por ABA pero no por otros estreses durante una ventana de desarrollo muy concreta, dos días después de la estratificación (Brocard *et al.*, 2002). ABI5 regula de forma individual o mediante interacción la dormición, la germinación y otros procesos de desarrollo (Finkelstein *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2012; Brocard *et al.*, 2002; López-Molina *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2014; Reeves *et al.*, 2011).

Además, existen otros factores de transcripción que participan en las respuestas a ABA, como algunos miembros de las siguientes familias: Cremallera de homeodominio de leucina (HD-ZIP) (Ariel *et al.*, 2007), *No Apical Meristem/ATAF/CUP-Shaped Cotyledons* (NAC) (Fujita *et al.*, 2004), WRKY (Jiang & Yu, 2009; Xie *et al.*, 2005), non-MYC *basi helix-loop-helix* (bHLH) (Li *et al.*, 2007) y dedos de Zinc.

Como muestra de la complejidad del sistema se han encontrado más de 200 factores de transcripción regulados por ABA que forman parte de 20 familias en un solo estadio de desarrollo (Nemhauser *et al.*, 2006).

5. PROTEÍN-FOSFATASAS DE TIPO 2C (PP2C)

La fosforilación reversible de proteínas es un mecanismo universal en la regulación de la mayoría de los procesos celulares y rutas de transducción (Moorhead *et al.*, 2009; Uhrig *et al.*, 2013). El proceso de fosforilación y su complementario de desfosforilación lo llevan a cabo las proteín-quinasas y las proteín-fosfatasa, respectivamente, de manera coordinada y supone un medio general para la transducción de señales desde el exterior al interior celular (Rodríguez, 1998).

Pese a que en un principio los estudios acerca de la fosforilación se enfocaron en su papel en la modificación de la actividad enzimática, se ha ido viendo que también desempeña un papel fundamental en la localización de proteínas, su *turnover* y la generación de sitios específicos para la interacción con otras proteínas (Cohen, 2000).

Resulta en primer lugar sorprendente el número de genes dedicados en plantas a estos procesos de señalización y regulación: en *Arabidopsis* se han identificado más de 1000 genes correspondientes a proteín-quinasas (Wang *et al.*, 2003), mientras que este número es mucho menor en otros organismos como levadura (130), mosca (251), ratón (561) o humanos (518) (Bogre *et al.*, 2003).

En cuanto a la abundancia de fosfatasa, en *Arabidopsis* se han identificado 112 secuencias correspondientes al dominio catalítico de estas enzimas (Kerk *et al.*, 2002). Por el contrario, se han identificado sólo siete en levadura, diez en mosca, ocho en gusano y 15 en humanos. Como se puede ver, el número de kinasas supera en gran medida al de fosfatasa, lo que llevó a pensar que las primeras eran mucho más específicas, aunque actualmente esto parece no estar tan claro.

Clasificación

Las proteín-fosfatasa se dividen en dos clases principales según los aminoácidos sobre los que actúan: proteín-tirosín-fosfatasa (PTPs) y proteín-serín/treonín-fosfatasa.

Las PP2C pertenecen a este último, son enzimas monoméricas, que requieren Mn^{2+}/Mg^{2+} para su funcionamiento, y no están reguladas por subunidades o proteínas inhibitoras. Son insensibles a ácido okadaico y cantaridina.

Las PP2C son la familia más amplia de fosfatasa en plantas, con 76 enzimas descritas en *Arabidopsis thaliana*. Por el contrario, se han identificado sólo 15 en humanos, 8 en gusano, 10 en mosca y 7 en levaduras. Esto sugiere que estas fosfatasa tienen una diversidad funcional más amplia en plantas que en otros organismos eucariotas (Schweighofer *et al.*, 2004).

Todas ellas presentan 11 subdominios característicos en el sitio catalítico (Bork *et al.*, 1996). Éste puede aparecer situado bien en el extremo N-terminal o bien en el extremo C-terminal, y contener extensiones implicadas en su regulación, especificidad de sustrato y localización subcelular (dominios MAPK, dominios bipartitos de localización nuclear, dominios FHA (*Fork-Head Associated domain*) de interacción con fosfoproteínas, regiones ricas en serina o en lisina o dominios de unión a ATP/GTP (Schweighofer *et al.*, 2004).

Mediante estudios filogenéticos han sido agrupadas en 10 grupos (A-J), con 6 fosfatasa no incluidas en ninguno de ellos (Schweighofer *et al.*, 2004).

El grupo A engloba la mayoría de PP2Cs implicadas en la ruta señalización del ácido abscísico (ABA), como ABI1, ABI2 (Gosti, *et al.*, 1999; Merlot *et al.*, 2001), HAB1, HAB2 (Saez *et al.*, 2004) y AtPP2CA (Sheen, 1998).

El grupo B se caracteriza por presentar homología con MP2C, una PP2C de alfalfa que regula la señalización de MAPK (Meskiene *et al.*, 1998).

En cuanto al grupo C, en él se incluyen las fosfatasa 2C de tipo POL (POLTERGEIST), implicadas en el desarrollo floral. El gen POL es una fosfatasa con acción reguladora sobre los receptores kinasa CLV1 (Yu, Miller *et al.*, 2003).

5.1. Regulación de PP2Cs

Pese a que las PP2Cs no tienen homología de secuencia con otras fosfatasa, las semejanzas en su estructura tridimensional indican un mecanismo catalítico semejante (Das *et al.*, 1996), debido posiblemente a mecanismos de convergencia evolutiva (Schweighofer *et al.*, 2004).

Como ya se ha mencionado, las PP2Cs son enzimas monoméricas, no reguladas mediante proteínas inhibitoras o subunidades propias. Sin embargo, se ha propuesto que estas enzimas pueden ser reguladas mediante interacción con sustratos específicos u otros componentes de las rutas señalización en las que estén implicadas. Asimismo, la actividad de estas enzimas también puede regularse mediante regulación de su expresión, compartimentalización, proteólisis o segundos mensajeros (Schweighofer *et al.*, 2004).

El balance redox celular también podría desempeñar un papel en la regulación de las PP2Cs. De hecho, se ha descrito la inactivación reversible de ABI1 y ABI2 por peróxido de hidrógeno *in vitro*, debido al parecer a la oxidación de residuos de cisteína fundamentales (Meinhard *et al.*, 2002).

También se ha descrito la regulación por medio del complejo Ca^{2+} /calmodulina de la fosfatasa PCaMPP de *Physcomitrella patens* (Takezawa, 2003).

Otro posible mecanismo de regulación podría ser el llevado a cabo por mensajeros lipídicos, ya que se ha demostrado que MP2C y ABI2 son muy sensibles a la presencia de ácidos grasos insaturados (Baudouin *et al.*, 1999). Esto contribuye a la activación de MAPKs, dado que la producción de ácidos grasos libres aumenta en respuesta a heridas mecánicas, así como también lo hacen el Ca^{2+} y las propias MAPKs.

5.2. Funciones de las PP2Cs en eucariotas

En eucariotas, uno de los papeles principales de las PP2C es actuar como antagonistas en la cascada de proteína-kinasas de respuesta a estrés, desfosforilando las RLKs y MAPKK

quinasas.

Uno de los procesos más importantes en los que realizan su función es en la regulación del ciclo celular desfosforilando las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) tanto en levaduras como en humanos. La CDK de levadura, CDC28, se activa por fosforilación en el residuo Thr161, siendo desfosforilada por la PP2C Ptc2p y Ptc3p, que la inactivan (Cheng *et al.*, 1999). En humanos, la PP2Ca y la PP2Cb2 desfosforilan la quinaasa Cdk2/Cdk6. En ratones se ha descrito el efecto regulador de las PP2C en ciclo celular, ya que una de ellas, *FIN3*, se expresa al final de G1 inhibiendo el paso de G1 a S (Guthridge *et al.*, 1997), habiéndose descrito fosfatasaas similares en anfibios y mamíferos, lo cual indicaría que es una función evolutivamente conservada (Menges *et al.*, 2002).

5.3. Funciones de las PP2Cs en plantas

PP2Cs en respuesta a estrés abiótico

En plantas, las PP2C son componentes muy importantes de la transducción de señales de estrés.

Las PP2C del grupo A (PP2C-A) forman parte del complejo receptor del ABA como elemento inhibidor de la respuesta, como se ha comentado en capítulos anteriores (Ruta principal de la señalización de ABA).

Varios miembros de las PP2C-A regulan la señalización del ABA inducida por estrés abiótico. ABI1 y ABI2 son dos de las PP2C más estudiadas y conocidas, se han caracterizado como las principales fosfatasaas en respuesta a estrés abiótico y durante el desarrollo (Fuchs *et al.*, 2013; Singh & Pandey, 2012). Los mutantes dominantes *abi1* y *abi2* tienen un residuo de glicina sustituido por aspartato muy cerca del sitio de unión a Mg²⁺ de la proteína, reduciendo dramáticamente la actividad de la proteína y provocando fenotipos de insensibilidad a ABA, pérdida de dormición, cierre estomático irregular y poca tolerancia a la desecación (Leung *et al.*, 1997). La mayoría de las PP2C-A se inducen por ABA y estrés (Fujita *et al.*, 2011). Su papel fundamental es el de regular la actividad quinaasa de SnRK2s (SnRK2.2, SnRK2.3 y SnRK2.6), que son reguladores positivos de la ruta del ABA (Umezawa *et al.*, 2009; Soon *et al.*, 2012). También se ha descubierto que las PP2C-A, ABI1 y PP2CA, regulan a SNRK1s en condiciones de estrés relacionado con sacarosa por la ruta del ABA (Rodrigues *et al.*, 2013). Esto indicaría que las PP2C-A regulan respuestas a estrés inducidas por ABA en dos vías diferentes.

Las PP2Cs también regulan rutas de señalización de MAPKs en plantas de forma similar a como ocurre en mamíferos (Danquah *et al.*, 2014), desactivándolas vía desfosforilación y bloqueando así la ruta de señalización aguas abajo (Smékalová *et al.*, 2014). Por ejemplo, MP2C (Medicago Truncatula Phosphatase 2C) controla la actividad de la MAPK inducida por estrés (SIMK) desfosforilando el residuo pThr del motivo de activación pTEpY.

PP2Cs en respuesta a estrés biótico

Las PP2Cs también colaboran en la respuesta al ataque de patógenos. Uno de los mecanismos de respuesta es el cierre estomático en respuesta a patógenos, que también está regulado por ABA (Zeng *et al.*, 2011). Recientemente se ha descubierto que RCAR3 y PP2CA participan en la respuesta mediada por ABA a *Pseudomonas syringae* pv. Tomato DC3000 (PstDC3000) (Li *et al.*, 2014). Al inocular Pst DC3000, la expresión de RCAR3 disminuye, mientras que la de PP2CA y otras PP2C como *HABI* y *AHG1* aumentan gradualmente desde las 12 a las 24 horas tras producirse la inoculación. PP2CA interactúa con RCAR3 y el nivel de sensibilidad al ABA de diversas líneas de mutantes de pérdida y ganancia de función se puede correlacionar con el cierre y apertura estomático en respuesta a Pst DC3000.

AP2C1, una de las pocas PP2Cs del grupo B bien caracterizada, regula respuestas a patógenos y a herida desfosforilando e inactivando a MAPK4 y MAPK6, conocidos reguladores positivos de estas señales. La sobreexpresión de *AP2C1* provoca una baja actividad de MAPK, una baja respuesta a herida y bajos niveles de etileno (Schweighofer *et al.*, 2007). AP2C1 es por tanto, un regulador negativo de la señalización de MAPKs y controla el nivel de defensa de la planta.

Otra fosfatasa, PIA1 (PP2C induced by AvrRpm1), que pertenece al poco caracterizado grupo F, también participa en la respuesta a Pst DC3000. PIA1 se induce en respuesta a AvrRpm1 (efector bacteriano de tipo III) (Widjaja *et al.*, 2010). La línea de pérdida de función de *PIA1* es resistente a infecciones de Pst DC3000 pero no a otras cepas de *Pseudomonas syringae*. Además, los niveles de etileno y ácido salicílico, fundamentales en la respuesta a patógenos, se encuentran drásticamente reducidos en la línea mutante. Todo esto sugiere que PIA1 participa en la respuesta a estrés y regula también la síntesis de hormonas de respuesta a patógenos.

PP2Cs en funciones de desarrollo

Aunque las PP2Cs se asocian con procesos de estrés, hay varias que se han relacionado con procesos de desarrollo, las más conocidas son KAPP and POL (POLTERGEIST). Ambas participan en la ruta de señalización de CLAVATA1 (CLV1, un Receptor Like Kinase) que regula el desarrollo floral en arabidopsis (Luan, 2003). KAPP, mediante su dominio FHA (forkhead-associated domain), interactúa con CLV1. Por su parte, POL participa en el proceso modulando la actividad del factor de transcripción WUSCHEL (WUS), aunque se han descrito efectos de POL de manera independiente a WUS (Yu *et al.*, 2003). Además, POL no sólo está implicado en desarrollo floral sino también en meristemo apical y radicular, así como en el desarrollo embrionario (Song & Clark, 2005; Wang *et al.*, 2007), participando en la división asimétrica de las células madre de los meristemas, controlando tanto a WUS como a CLE40 (CLV3/ESR (*endosperm surrounding region-related* 40)/WOX5 (*WUSCHEL-related homeobox* 5) (Gagne & Clark, 2010; Song *et al.*, 2008), que participan en la división asimétrica de células madre y en el mantenimiento de su polaridad (Fuchs *et al.*, 2013).

Recientemente, se ha descubierto un nuevo mecanismo de acción de las PP2Cs del grupo D (PP2Cs-D), hasta entonces no caracterizado, como intermediarios en desarrollo vegetal. Spartz *et al* en 2014, describieron que PP2Cs-D interaccionaban con la proteína SAUR19 (SMALL AUXIN UP RNA 19), inducida por auxinas. SAUR19 aumenta la actividad de la H⁺-ATPasa, localizada en la membrana plasmática, promoviendo su fosforilación en el dominio autoinhibitorio que posee en la zona C terminal. La activación de la H⁺-ATPasa promueve la expansión celular al activar el flujo de protones hacia el apoplasto y facilita la toma de solutos y agua. Las PP2Cs-D actúan de forma contraria a SAUR, ya que interaccionan desfosforilando e inactivando las H⁺-ATPasas. Consecuentemente, líneas mutantes de pérdida de función de PP2C-D y plantas sobreexpresoras de SAUR19 muestran fenotipo de hipocotilos elongados, mientras que la sobreexpresión de PP2C-D provoca hipocotilos reducidos y plántulas enanas. Así pues, las PP2C-D son moduladoras de la expansión celular regulada por auxinas en el crecimiento vegetal.

Otra fosfatasa recientemente caracterizada es AtPP2CF1, perteneciente al desconocido grupo E. AtPP2CF1 activa la proliferación y expansión celular acelerando el desarrollo de la inflorescencia, de manera que las líneas con sobreexpresión de *AtPP2CF1* generan niveles superiores de biomasa (Sugimoto *et al.*, 2014).



ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Durante mucho tiempo, la línea principal de investigación de nuestro laboratorio ha sido desentrañar los procesos que subyacen en la transición de dormición a germinación de la semilla de haya (*Fagus sylvatica*), centrándose en la importancia del balance ABA-GAs y en los procesos de fosforilación-desfosforilación que lo regulan. Como resultado se aislaron dos fosfatasa inducidas por ABA, FsPP2C1 (Lorenzo *et al.*, 2001) y FsPP2C2 (Lorenzo *et al.*, 2002). FsPP2C1 fue descrita como uno de los componentes de la ruta de señalización del ABA, actuando como regulador negativo, gracias al desarrollo de líneas transgénicas que presentaron fenotipos de insensibilidad a la hormona (González-García *et al.*, 2003; Saavedra *et al.*, 2010). Sin embargo, FsPP2C2 se describió como un regulador positivo del ABA, ya que plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con dicha proteína bajo el control de un promotor constitutivo presentaron mayor sensibilidad a la hormona que el ecotipo silvestre Col-0 (Reyes *et al.*, 2006).

FsPP2C1 pertenece al cluster A de fosfatasa tipo 2C, del que también son miembros las fosfatasa ABI1, HAB1 o PP2CA de arábido (Schweighofer *et al.*, 2004), y como tal, es capaz de interactuar con las proteínas PYR/PYL/RCAR, más concretamente con PYL8 y PYL7, interacciones descubiertas gracias a un escrutinio de doble híbrido en levadura. El estudio posterior de PYL8 con líneas sobreexpresoras de esta proteína reveló que era clave en la regulación de la dormición y la germinación en *Arabidopsis thaliana* y en la respuesta a estrés salino y osmótico durante estos procesos (Saavedra *et al.*, 2010). Además, plantas capaces de sobreexpresar al mismo tiempo FsPP2C1 y PYL8 mostraron fenotipos de sensibilidad al ABA similares a los mostrados por las plantas *35S:PYL8* y lejos de los fenotipos de insensibilidad de las líneas *35S:FSP2C1*, sirviendo como evidencia funcional de la interacción y del papel antagónico que estas proteínas desempeñan en la señalización del ABA, además de demostrar que el mecanismo de percepción y transducción de la señal del ABA está conservado en distintas especies (Saavedra *et al.*, 2010).

Por su parte, FsPP2C2 presenta un alto porcentaje de similitud con las fosfatasa del cluster D de arábido, sin embargo ningún estudio realizado hasta el comienzo de esta Tesis Doctoral relacionaba a estas proteínas con la señalización o la respuesta al ABA, ni se habían descrito proteínas interactoras.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo general fue proseguir con el estudio de estas fosfatasa de haya, sus ortólogos en arábido y las proteínas con las que interactúan. A tal efecto se plantearon los siguientes objetivos:

- 1) Estudio del metabolismo de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y su relación con la señalización del ABA a nivel de percepción (PP2Cs del clúster A y PYR/PYL/RCAR), gracias al estudio de sus distintos mutantes, al análisis de la interacción mediante Y2H y la medición de las actividades de varias enzimas relacionadas con el metabolismo de ROS (Superóxido Dismutasa, Glutatión Reductasa y Catalasa) durante la germinación.

2) Búsqueda de proteínas interactoras de D-PP2Cs (FsPP2C2 y ortólogos de *Arabidopsis thaliana*) mediante la técnica de doble híbrido en levadura (Y2H) y su posterior confirmación *in planta* mediante Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC).

3) Caracterización bioquímica *in vitro* de las interacciones, mediante el análisis de la actividad fosfatasa de FsPP2C2, para determinar su funcionalidad como sustratos o modificadores de la actividad proteín-fosfatasas.

4) Caracterización fisiológica de mutantes de pérdida de función de los ortólogos de FsPP2C2 en *arabidopsis* y molecular mediante análisis transcriptómico utilizando microordenamientos de oligonucleótidos del genoma completo de *arabidopsis*.



MATERIALES Y TÉCNICAS

MATERIALES Y TÉCNICAS

1. MATERIALES

1.1 Material Vegetal

Para la realización del presente trabajo se ha empleado la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh ecotipo Columbia (Col-0) y Landsberg *erecta* (Ler-0) en los diversos estudios fenotípicos y enzimáticos llevados a cabo.

Los ensayos de localización subcelular y complementación bimolecular fluorescente (BiFC) se realizaron en hojas de tabaco (*Nicotiana benthamiana* Domin).

Las diferentes líneas de ambas especies empleadas se recogen, junto con algunas de sus características, en la tabla M.1.

Tabla M.1. Líneas vegetales empleadas en la realización de la presente memoria. Sul: sulfadiazina, Kan: kanamicina, BASTA: glufosinato de amonio.

Especie (línea vegetal)	Características	Referencia
<i>A. thaliana</i> (Columbia 0, Col-0; Landsberg <i>erecta</i> , Ler-0)	Ecotipos silvestres	Rédei, 1992
<i>A. thaliana</i> (SALK_118712)	Inserción de ADN-T en AT5G66080, Kan ^R	Alonso <i>et al.</i> , 2003
<i>A. thaliana</i> (GABI-Kat 330E08)	Inserción de ADN-T en AT4G38520, Sul ^R	Kleinboelting <i>et al.</i> , 2012
<i>A. thaliana</i> (SAIL_171_H03.v1)	Inserción de ADN-T en AT3G51370, BASTA ^R	Sessions <i>et al.</i> , 2002
<i>A. thaliana</i> 35S::FsPP2C1	35S::FsPP2C1, Kan ^R , Insensible a ABA	González-García <i>et al.</i> , 2003
<i>A. thaliana</i> ein 2.5	Mutación en AT5G03280, Insensible a etileno	Guzman & Ecker., 1990
<i>N. benthamiana</i>	Ecotipo silvestre	Domin, 1921
<i>N. benthamiana</i> (H2B::RFP)	Histona H2B marcada con proteína roja fluorescente (RFP)	Martin <i>et al.</i> , 2009

1.2 Microorganismos

La bacteria *Escherichia coli* (Castellani y Chalmers, 1919) se empleó para la clonación y amplificación rutinaria de fragmentos de ADN y vectores plasmídicos, así como para la obtención de proteínas recombinantes.

La bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (Sawada *et al.*, 1993) se utilizó en los ensayos de transformación, transitoria en tabaco y estable en arábido.

Los estudios de doble híbrido en levadura se llevaron a cabo en la especie *Saccharomyces cerevisiae* (Hansen, 1883).

La tabla M.2 muestra las diferentes cepas de cada uno de los microorganismos utilizados.

Tabla M.2. Microorganismos empleados, principales características, uso y referencia de cada uno de ellos.

Microorganismo y cepa	Características	Uso	Referencia
<i>E. coli</i> BI21(DE3)	F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Sobreexpresión de proteínas para su purificación	Studier y Moffatt, 1986
<i>E. coli</i> DB3.1	F- gyrA462 endA1 glnV44 Δ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r _B , m _B) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm ^R) xyl5 Δ leu mtl1	Amplificación de plásmidos que contienen el gen <i>ccdB</i>	Bernard y Couturier, 1992; Miki <i>et al.</i> , 1992
<i>E. coli</i> DH5 α	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deo ^R nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ -	Amplificación de vectores y subclonación de fragmentos de ADN en células competentes	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> OmniMAX2	F' {proAB+ lacIq lacZ Δ M15 Tn10(Tet ^R) Δ (ccdAB)} mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80(lacZ) Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA panD	Amplificación de vectores derivados de pDONR/Zeo	Life Technologies
<i>E. coli</i> TOP10	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str ^R) endA1 λ	Amplificación de vectores y subclonación de fragmentos de ADN en células competentes	Life Technologies
<i>E. coli</i> XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^R)]	Mutagénesis dirigida de plásmidos	Stratagene
<i>A. tumefaciens</i> C58C1	Rif ^R , contiene el plásmido binario pGV2260 cb ^R	Transformación transitoria de <i>N. benthamiana</i> y estable de <i>A. thaliana</i>	Deblaere <i>et al.</i> , 1985
<i>S. cerevisiae</i> L40 Δ Gal4 (MAT α)	MAT α leu2 his3 trp1 ade2 GAL4 gal80 LYS2::(lexAop)4-HIS3 URA3::(lexAop)s-lacZ	Búsqueda de interactores mediante doble híbrido en levadura	Baumgartner <i>et al.</i> , 1999
<i>S. cerevisiae</i> pJ694 (MAT α)	MAT α trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 ga14 Δ gal80 Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ	Ensayos dirigidos de doble híbrido en levadura	James <i>et al.</i> , 1996
<i>S. cerevisiae</i> Y187 (MAT α)	MAT α , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 Δ , met-, gal80 Δ , MEL1,URA3::GAL1UAS - GAL1TATA-lacZ	Búsqueda de interactores mediante doble híbrido en levadura	Fromont-Racine <i>et al.</i> , 1997
<i>S. cerevisiae</i> YM4271 (MAT α)	MAT α ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801 ade5 trp1-901 leu2-3, 112 gal4- Δ 512 gal80- Δ 538 tyr1-501 ade5::hisG	Ensayos dirigidos de doble híbrido en levadura	Liu <i>et al.</i> , 1993

1.3 Vectores plasmídicos

Los vectores empleados para la realización de las distintas construcciones y sus características más relevantes se indican en la tabla M.3.

Tabla M.3. Vectores plasmídicos empleados, características más relevantes, uso y referencia de los mismos. AD: dominio de activación, Amp: ampicilina, BASTA: glufosinato de amonio, BD: dominio de unión a ADN, BiFC: complementación bimolecular fluorescente, Cm: cloranfenicol, Euc: eucariota, Gm: gentamicina, GW: tecnología Gateway (Invitrogen™), His: histidina, Hyg: higromicina, Kan: kanamicina, MBP: proteína de unión a maltosa, MCS: sitio de clonación múltiple, Prc: procariota, Spt: espectinomomicina, YFP(C/N): proteína amarilla fluorescente (extremo carboxilo/amino), Zeo: zeocina.

Plásmido	Resistencia/Auxotrofia/Epítomos/Regiones de interés	Uso	Referencia
pB27	Amp ^R (Prc), Triptófano (Euc), MCS, LexA-BD en amino	Búsqueda de interactores por doble híbrido en levadura	Derivado de pBTM116 (Vojtek y Hollenberg, 1995)
PCR8®/GW/TOPO®	Spt ^R (Prc), GW, Timinas terminales para clonación de productos de PCR	Subclonación de fragmentos de ADN en células competentes	Invitrogen™
pDEST17	Amp ^R (Prc), Cm ^R (Prc), GW, 6xHis en amino	Expresión y purificación de proteínas en <i>E. coli</i>	Invitrogen™
pDEST22	Amp ^R (Prc), Cm ^R (Prc), Triptófano (Euc), GW, Gal4-AD en amino	Ensayos de doble híbrido dirigido en levadura	Invitrogen™
pDEST32	Gm ^R (Prc), Cm ^R (Prc), Leucina (Euc), GW, Gal4-BD en amino	Ensayos de doble híbrido dirigido en levadura	Invitrogen™
pDONR/Zeo	Zeo ^R (Prc), Cm ^R (Prc), GW	Subclonación de fragmentos de ADN en células competentes	Invitrogen™
pEarlyGate203	Kan ^R (Prc), Cm ^R (Prc), BASTA ^R (Euc), GW, promotor 35s, cMYC tag en amino	Transformación de <i>A. thaliana</i>	Earley <i>et al.</i> , 2006
pMDC163	Kan ^R (Prc), Cm ^R (Prc), Hyg ^R (Euc), GW, β-glucuronidasa en amino	Transformación de <i>A. thaliana</i>	Curtis y Grossniklaus, 2003
pMDC43	Kan ^R (Prc), Cm ^R (Prc), GW, promotor 35s, GFP en extremo amino	Ensayos de localización subcelular mediante fluorescencia.	Curtis y Grossniklaus, 2003

pMGWA	Amp ^R (Prc), Cm ^R (Prc),GW, MBP en amino, 6xHis en carboxilo	Expresión y purificación de proteínas en <i>E. coli</i>	Busso <i>et al.</i> , 2005
pP6	Amp ^R (Prc), Leucina (Euc), MCS , GAL4-AD en amino	Búsqueda de interactores por doble híbrido en levadura	Derivado de pGADGH (Bartel <i>et al.</i> , 1993).
pYFPC43	Kan ^R (Prc), Cm ^R (Prc),GW, YFPN en amino	Ensayos de BiFC en tabaco	Derivado de pMDC43
pYFPN43	Kan ^R (Prc), Cm ^R (Prc), GW, YFPC en amino	Ensayos de BiFC en tabaco	Derivado de pMDC43

1.4 Medios de cultivo

Medio Lysogeny Broth (LB, Bertani, 1951, 2004)

Empleado para el cultivo de *E. coli* y *A. tumefaciens*.

- Triptona 1 % p/v, extracto de levadura 0.5 % p/v, NaCl* 1 % p/v, agar bacteriológico 1.5 % p/v.

Ajustar a pH 7 con NaOH y autoclavar 20 min a 121 °C.

Cuando fue necesario se añadió antibiótico al medio según las concentraciones siguientes: ampicilina 100 µg/ml, cloranfenicol 30 µg/ml, espectinomicina 100 µg/ml, gentamicina 30 µg/ml, kanamicina 50 µg/ml, rifampicina 50 µg/ml y zeocina* 50 µg/ml.

Algunos ensayos requirieron la adición de hormonas vegetales, como pueden ser ABA, IAA, GA₃, etc. o compuestos químicos como PAC, MV, ACC, etc. En tales casos el compuesto se añadió después de autoclavar a partir de una solución esterilizada por filtración, la concentración de cada uno de ellos se detalla en el ensayo correspondiente.

*Para la selección de *E. coli* con zeocina se empleó LB bajo en sales (NaCl 0.5 % p/v, pH 7.5).

Medio Murashige & Skoog (MS, Murashige y Skoog, 1962)

Empleado para el cultivo *in vitro* de arabisopsis.

- MS comercial (con MES) 0.4905 % p/v, sacarosa 2 % p/v, agar bacteriológico* 0.6 % p/v.

- Ajustar a pH 5.7 con KOH y autoclavar 20 min a 121 °C.

Las concentraciones de los antibióticos o herbicidas que se añadieron al medio, según los requerimientos del ensayo, fueron las siguientes: BASTA (glufosinato de amonio)

20 µg/ml, higromicina 40 µg/ml (Phytigel™ al 0.3 % p/v como agente solidificante), sulfadiazina 5.25 µg/ml y kanamicina 50 µg/ml.

MS Root growth

Utilizado en los ensayos cuantitativos de crecimiento de raíz.

- MS comercial (con MES) 0.23 % p/v, sacarosa 0.75 % p/v, agar bacteriológico 1.5 % p/v.

-Ajustar a pH 5.8 con KOH y autoclavar 20 min a 121 °C.

YPD/YPDA-Broth (Yeast Extract Peptone Dextrose medium, Sambrook *et al.*, 1989)

Empleado para el cultivo de *S. cerevisiae*.

- Peptona 2 % p/v, extracto de levadura 1 % p/v, glucosa* 2 % p/v, agar bacteriológico 1.8 % p/v.

El medio YPDA consiste en medio YPD suplementado con adenina 0.004 % p/v.

-Ajustar a pH 5.8 con HCl y autoclavar 10 min a 121 °C.

*Añadida después de autoclavar a partir de una solución esterilizada por filtración.

NZY⁺ Broth

Empleado para la transformación de *E. coli* en la mutagénesis dirigida de plásmidos.

- NZ amina (caseína hidrolizada enzimáticamente) 1 % p/v, extracto de levadura 0.5 % p/v, NaCl 0.5 % p/v, MgCl₂* 12.5 mM, MgSO₄* 12.5 mM, glucosa 0.4 % p/v.

- Ajustar a pH 7.5 con NaOH y autoclavar 20 min a 121 °C.

*Añadido a partir de soluciones concentradas esterilizadas por filtración antes de usar.

Medio Drop Out Base (DOB) con aminoácidos (CSM, Complete Supplement Mixture)

Utilizado para la selección por auxotrofia de *S. cerevisiae* transformado y en los estudios de doble híbrido en levadura. La mezcla de aminoácidos (CSM, MP Biomedical) se añadió en la proporción indicada por el fabricante para cada uno de los "drop outs" específicos.

- DOB 2.7 % p/v, mezcla específica de aminoácidos CSM (-W 0.074 % p/v; -L 0.069 % p/v; -L-W 0.064 % p/v; -H-L-W 0.062 % p/v), agar 1.8 % p/v.

- Autoclavar 10 min a 121 °C.

1.5 Oligonucleótidos

En la tabla M.4 se detallan los oligonucleótidos empleados junto a su región de anillamiento y su secuencia.

Tabla M.4. Oligonucleótidos empleados, se especifica la finalidad, el amplicón o región de anillamiento, la orientación (Sentido: S o Antisentido: A) y la secuencia de nucleótidos.

Finalidad	Amplicón o región de anillamiento	Orientación y secuencia 5'--3'
Clonación	APD3 (At3g51370)	(S) ATGTTATCAACGTTAATGAAACTC
		(A) GGAGTATCTTAGATTTTCTTGGGG
	APD6 (At4g38520)	(S) ATGCTATCTGGGTTGATGAATTTTC
		(A) TCAGGAGGCGCCAGCAGCAG
	BRUTUS (At3g18290)	(S) GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGATGGCGACGCCGTTACCA
		(A) GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAGGATGAGGTTGAAGCAGTCC
	BRUTUS SID (At3g18290)	(S) CCTTTCCAGCATTCAATTAAGCC
		(A) GCGTCTGTTCCATGCACGAGTAGG
FsPP2C2 (AJ277744)	(S) ATGTTTTCGGAGTTGATGAAC	
	(A) TTAGGTGCTGCCAACTTCCA	
p2Kb::SAUR16 (At4g38860)	(S) GAAGGAGGCAAGAGTAACATGGG	
	(A) TCTGATCATGGATGTTAGAGAGAG	
SAUR16 (At4g38860)	(S) ATGGCGGTAAAGAGATCTTC	
	(A) CTCTCTATTATTTTCTCATCTG	
Genotipado	APD3 (At3g51370)	(S) TGTTTACACATCAGCTACTCC
		(A) TGCATATATCATTCAAGTTTCC
	APD6 (At4g38520)	(S) TTCTGAAACATAACGTCTGGC
		(A) CTAGTAGTACAAACAGAGTGG
	APD9 (AT5G66080)	(S) AAAGGTCATCAAGGCCACAGG
		(A) AGGAAGAGGACGACCACAGTG
LB-GABI (LB-GABI)	(S) ATATTGACCATCATACTCATTGC	
LB-SAIL (LB-SAIL)	(S) GCTTCCTATTATATCTTCCCA	
LB-SALK (LB-SALK)	(S) CTGTTGCCCGTCTCACTGGTG	
Mutagénesis dirigida	APD3 (At3g51370)	(S) CTATGATGGCCATGACGGGCCTGAGACGT
		(A) ACGTCTCAGGCCCGTCATGGCCATCATAG
	FsPP2C2 (AJ277744)	(S) ACGACGGGCATGAGGGCCCTGAGAC
		(A) GTCTCAGGGCCCTCATGCCCGTCGT
Secuenciación	"nosT"	(A) CATCGCAAGACCGGCAACAGG
	BRUTUS (At3g18290)	(S) ACTTCTGTTAGCCAGCACTTG
		(S) TAAATCGGATGTTGCTCTCG
		(S) GGAAAGCTCATTGATTGCGA
		(S) TGTGGGTCGTATAATCGGAA
		(S) GCTTCGAGCTGCTTGTTGTG
		(S) CATTTTCTGAAGAGCACGATG
	(A) CCGGCTTTGCGTCCTTTGC	
	GAL4-AD	(S) TATAACGCGTTTGAATCACT
GAL4-BD	(S) GACAGCATAGAATAAGTGCGAC	
GFP	(S) ATTACCTGTCCACACAATCTGCCC	
GUS	(A) CACCAACGCTGATCAATTCCAC	

M13F	(S) TGTA AACGACGGCCAGT
MBP	(S) GCTTTCTGGTATGCCGTGCG
p2Kb::SAUR16 (At4g38860)	(S) GGGAAGCTCGAGATCGTGAGAC
	(A) GAGGCATGTGACAGTGTGGG
pDEST22/32	(A) AGCCGACAACCTTGATTGGAGAC
pYFC43-YFP ^C	(S) CCTGCTGGAGTTCGTGACC
pYFN43-YFP ^N	(S) CGACGGCAACTACAAGACCCG
TOPO-F	(S) GTTGCAACAAATTGATGAGCAATGC
TOPO-R	(A) CGTTGCAACAAATTGATGAGCAATTA

2. TÉCNICAS

2.1 Manipulación y cultivo de plantas

2.1.1 Esterilización, cultivo *in vitro*, crecimiento en tierra y cruzamiento de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh se almacenaron en sobres de papel a una temperatura de 20-22 °C.

Todas las semillas utilizadas para ensayos/cultivos *in vitro* se esterilizaron 5 min con una solución de hipoclorito sódico comercial al 75 % v/v y Tritón X-100 al 0.01% v/v. Tras lo cual se lavaron 3 veces con agua estéril y se estratificaron 2-3 días a 4 °C para eliminar la dormición. A continuación se sembraron con ayuda de agarosa 0.15% p/v en placas de MS suplementado según los requerimientos del experimento y se cultivaron a 22 °C con un fotoperiodo de 16 h de luz (80-100 µE/m²/s) y 8 h de oscuridad durante el tiempo especificado según los casos.

En los ensayos de germinación no se utilizó medio MS, en su lugar las semillas se sembraron sobre papel de filtro estéril y húmedo.

El cultivo en invernadero se realizó en un sustrato de tierra y vermiculita (3:1). A las 3-6 semanas las plantas se tutoraron para facilitar la recogida de las semillas.

Para obtener los cruces de *Arabidopsis* se procedió a la polinización de flores emasculadas antes de la antesis con polen maduro del parental masculino. En la generación F2 se analizó la segregación mediante genotipado (PCR) de las distintas plantas y en la generación F3 se recomprobó por resistencia a antibiótico/herbicida los resultados obtenidos de la F2.

2.1.2 Cultivo de *Nicotiana benthamiana* Domin

Las semillas de *Nicotiana benthamiana* Domin se conservaron en sobres de papel a temperatura ambiente.

Las semillas de tabaco fueron embebidas en agua y estratificadas 3 días a 4 °C, tras lo cual se sembraron directamente en tierra y se cultivaron en el invernadero hasta su uso o recolección.

2.2 Manipulación y cultivo de microorganismos

2.2.1 Preparación y transformación de células competentes de *Escherichia coli*

Para la preparación de células competentes de *E. coli* se siguió el protocolo establecido por Lederberg y Cohen (1974), tras lo cual se añadió glicerol hasta una concentración del 20 % v/v y se hicieron alícuotas de 50 µl que se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

La transformación de células competentes con ADN plasmídico se realizó mediante choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989).

E. coli se conservó a corto plazo en estrías a 4 °C mientras su conservación a largo plazo fue en LB-glicerol 20 % a -80 °C.

2.2.2 Preparación y transformación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

La preparación de células competentes de *A. tumefaciens* se llevó a cabo realizando un preinóculo a partir de una colonia individual en un volumen de 10 ml de LB-Rif y se dejó crecer toda la noche a 28 °C con agitación (200 rpm). Se inoculó un cultivo de 200 ml de LB-Rif con el preinóculo, cuando la DO₆₀₀ fue de 0.7-0.9 se centrifugó el cultivo 5 min a 4000 rpm y 4 °C y se resuspendió el sedimento en 100 ml de TRIS-HCl 10 mM a pH 8 y frío. Se centrifugó de nuevo 5 min a 4000 rpm y 4 °C y se resuspendió el sedimento en 2 ml de LB-Glicerol 10 % v/v, se hicieron alícuotas de 200 µl que se congelaron en nitrógeno líquido. La conservación de estas alícuotas a -80 °C permite el almacenamiento durante largos periodos de tiempo sin pérdidas significativas de viabilidad ni competencia.

La transformación de *A. tumefaciens* se realizó de acuerdo con An *et al.* (1988).

La bacteria se conservó en estrías a 4 °C para periodos cortos de tiempo o LB-glicerol 20 % v/v a -80 °C para un almacenamiento prolongado.

2.2.3 Preparación y transformación de células competentes de *Saccharomyces cerevisiae*

La transformación de *S. cerevisiae* se realizó siguiendo un protocolo simplificado del establecido por Schiestl y Gietz (1989). Se cultivaron 10-15 ml de levadura en YPDA a 28 °C con agitación (250 rpm) durante una noche y se centrifugaron 0.5 ml de cultivo a 11000 rpm durante 5 s por cada transformación a realizar. Se resuspendió en un volumen de

acetato de litio 100 mM, se incubó 5 min a 40 °C, se centrifugó de nuevo y se resuspendió en un volumen de acetato de litio 0.1 M, 34.3 % p/v PEG-4000, 143 µg/µl ssADN. Se añadieron 250 µg de la construcción, se agitó 1 min en vórtex y se incubó 20 min a 42 °C. Se dejó toda la noche a temperatura ambiente, se centrifugó y resuspendió en 0.2 volúmenes de agua estéril antes de plaquear en medio selectivo. Se incubó a 28 °C hasta la aparición de colonias (24-48 h).

S. cerevisiae se conservó en YPD-glicerol 20 % v/v a -80 °C (periodos largos de tiempo) o en estrías a 4 °C (periodos cortos de tiempo).

2.3 Manipulación y análisis de ácidos nucleicos

2.3.1 Aislamiento, purificación y análisis de ADN

El ADN de *A. thaliana* se obtuvo conforme al protocolo propuesto por Doyle y Doyle (1990), con la salvedad del uso de acetato de litio en lugar de acetato de amonio.

El ADN plasmídico de *E. coli* se extrajo con el kit NucleoSpin® Plasmid de MACHEREY-NAGEL de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El ADN plasmídico de *Saccharomyces cerevisiae* se purificó con el kit Zymoprep™ Yeast Plasmid Miniprep II (Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante. Debido a la baja cantidad de ADN obtenido, para su estudio posterior fue necesaria la amplificación en *E. coli*.

La purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se realizó con el kit GENE CLEAN® Turbo Kit de Qbiogene.

Todas las muestras fueron analizadas para comprobar su calidad y concentración tanto en gel de agarosa (agarosa 1 % p/v en tampón TBE, 1 µg/ml bromuro de etidio. Tampón de Carga 10x: 50% v/v glicerol, 0.25 % p/v azul de bromofenol, TBE 10x. Resueltos a 80-100 V), como por espectrofotometría.

Todo el ADN aislado se almacenó a -20 °C.

2.3.1 Aislamiento, purificación y análisis de ARN

El ARN de *A. thaliana* se aisló con el método de TRI Reagent® (Ambion) según sus indicaciones. Cuando la aplicación lo requirió, el ARN obtenido fue sometido a un paso adicional de purificación por columna (RNeasy Mini Kit de QIAGEN).

Todos los ARNs extraídos fueron comprobados y cuantificados en geles de agarosa (agarosa 1 % p/v en tampón TBE, 1 µg/ml bromuro de etidio. Tampón de Carga 10x: 50% v/v glicerol, 0.25 % p/v azul de bromofenol, TBE 10x. Resueltos a 80-100 V) y mediante espectrofotometría

Las diferentes muestras de ARN se almacenaron a -80 °C.

2.3.2 Amplificación de fragmentos de ADN por PCR

Para la amplificación de fragmentos de ADN se empleó la técnica de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) desarrollada por Mullis y Faloona (1987). Como ADN molde se empleó ADN genómico o ADN copia (ADNc) sintetizado a partir de ARN de *Arabidopsis*. Las condiciones de la PCR estuvieron determinadas por el fabricante de la enzima empleada, Taq ADN Polymerase (Roche), utilizándose una temperatura de anillamiento estándar de 55 °C y 29 ciclos de amplificación.

Los oligonucleótidos empleados se recogen en la tabla M.4.

2.3.4 Síntesis de ADN copia mediante RT-PCR

Para la obtención del ADNc se utilizó ARN de *A. thaliana* y el kit First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV, Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ADNc obtenido se empleó en la cuantificación de la expresión génica (qRT-PCR), como molde para la amplificación de fragmentos de ADN para su clonación en vectores de entrada y para la comprobación de la segregación en líneas mutantes de inserción de ADN-T.

2.3.5 Construcción de vectores plasmídicos

Para la realización de las diferentes construcciones empleadas en esta memoria se utilizó, siempre que fue posible, la tecnología GATEWAY (Life Technologies).

Para la obtención de los vectores de entrada (pENTR) se emplearon 3 estrategias diferentes:

- Kit PCR[®]8/GW/TOPO[®] TA Cloning (Invitrogen) para la ligación de un producto de PCR y un vector lineal (PCR[®]8), obteniendo los vectores de entrada de los CDSs de los genes FsPP2C2, APD6, APD3 y SAUR16 a partir de ADNc sintetizado utilizando ARN de *Arabidopsis*, y el promotor de 2 K pgsb de SAUR16 a partir de ADN genómico.

- Reacción de recombinación de un producto de PCR con un vector donador (pDONRTM/Zeo) para la obtención de pENTR-BRUTUS, la recombinación se realizó con kit Gateway[®] BP Clonase[®] II Enzyme mix (Invitrogen).

- Los vectores pENTR_FsPP2C2^{89E} y pENTR_APD3^{G87D} se obtuvieron por mutagénesis dirigida de los vectores pENTR_FsPP2C2 y pENTR_APD3 gracias al kit QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies).

Los vectores de expresión se generaron a partir de la recombinación de los vectores de entrada (pENTR) y los vectores de destino (pDEST) usando el kit Gateway[®] LR Clonase[®] Enzyme mix (Invitrogen).

Todas las ligaciones y recombinaciones se llevaron a cabo conforme a las instrucciones del fabricante, los oligonucleótidos empleados para las amplificaciones de fragmentos de ADN por PCR, los vectores empleados y las distintas cepas de *E. coli* utilizadas se muestran en las tablas M.4, M.3 y M.2, respectivamente.

Todas las construcciones, tras su amplificación y purificación fueron comprobadas mediante análisis de restricción y secuenciación.

2.3.6 Digestión de ADN con enzimas de restricción

El análisis de restricción de los distintos vectores de entrada y de expresión se realizó con endonucleasas de restricción de tipo II, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche).

Las reacciones de restricción se resolvieron en geles de agarosa al 0.8-1.2 % p/v en tampón TBE, 1 µg/ml bromuro de etidio. Tampón de Carga 10x: 50 % glicerol v/v, 0.25 % p/v azul de bromofenol, TBE 10x. Resueltos a 100 V.

2.3.7 Secuenciación de ADN

La determinación de la secuencia de nucleótidos de los diferentes vectores se llevó a cabo en el servicio de secuenciación de ADN de la Universidad de Salamanca, que emplea para ello un secuenciador automático capilar 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystem). La preparación de las muestras por parte del usuario solo requiere del envío de 100-500 ng de ADN y 3.2 pmol de oligonucleótido cebador en un volumen de 8 µl de agua estéril.

Los cebadores empleados se detallan en la tabla M.4.

2.3.8. Análisis de la expresión génica

MICROARRAY (Microordenamientos de ADN)

En el estudio de la expresión génica por microarray se utilizaron plantas días de arabidopsis de 10 crecidas en medio MS agar en día largo. Los ARNs se extrajeron de plantas completas de acuerdo al apartado 2.3.1, procediéndose después a su purificación por columna (RNeasy Mini Kit de QIAGEN).

Previamente a la hibridación de los arrays, se comprobó la integridad y pureza de los ARNs con el Bioanalyzer2100 disponible en la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB).

El marcaje del ARN con biotina y la hibridación de los arrays (GeneChip Arabidopsis ATH1 Genome Array de Affymetrix) se llevo a cabo el CNB, que cuenta con una Estación de fluidos 450 así como con un Scanner 3000 7G para la captura de imágenes.

Los resultados se suministraron mediante una carpeta del visualizador FIESTA (Oliveros, 2007) desarrollado en el CNB.

2.4 Transformación de *arabidopsis*

Para la transformación de *A. thaliana* Col-0 mediante inmersión floral (Clough y Bent, 1998) se emplearon plantas de 4-6 semanas de edad, sumergiéndose los meristemos apicales en una suspensión de *A. tumefaciens* con la construcción de interés en MS con sacarosa 5 % p/v, BAP 11 ng/ml y Silwet L-77 0.02 % v/v. La selección de plantas transformadas (T1) se hizo en MS con el antibiótico/herbicida correspondiente. En la generación T2 se contó la proporción de plantas sensibles frente a resistentes para determinar el número de inserciones (prueba estadística Chi cuadrado) y en la generación T3 se seleccionaron las líneas homocigotas.

2.5 Transformación transitoria de *N. benthamiana*: visualización de GFP y BiFC

Para la visualización de proteínas fluorescentes en hojas de tabaco se utilizó la técnica de agroinfiltración según se describe en Voinnet *et al.* (2003) y Santiago *et al.* (2009), infiltrándose la suspensión de *A. tumefaciens* a una DO_{600} de 0.5.

Para determinar la localización de las distintas proteínas estudiadas se optó por su fusión a la proteína verde fluorescente (GFP, Shimomura *et al.*, 1962) en amino con el vector pMDC43 (detalles en tabla M3, Curtis y Grossniklaus, 2003).

La complementación bimolecular fluorescente (BiFC, Hu *et al.*, 2002) se empleó para la confirmación de la interacción *in planta* de los positivos obtenidos mediante Y2H. Además, gracias a ella, se pudo determinar la localización subcelular de la interacción entre las proteínas objeto de estudio. Las características de los vectores empleados, pYFPN/C (Curtis y Grossniklaus, 2003) se detallan en la tabla M3.

Las muestras de GFP y BiFC se analizaron en un microscopio confocal Leica TCS SP2, que dispone de un laser de argón y objetivos de 10, 20, 40 y 63 aumentos. Las preparaciones con GFP se observaron empleando filtros de emisión de 500-570 nm con una fuente de excitación de 488 nm. Las preparaciones con YFP se excitaron a 514 nm y se registró la emisión comprendida entre 520 y 580 nm. Las muestras con RFP se excitaron a 488 nm y se registró la emisión comprendida entre 600 y 670 nm.

2.6 Análisis de proteínas

2.6.1 Extracción, purificación y cuantificación de proteínas

La extracción de proteínas vegetales para su análisis por western blot se realizó según Fernández-Marcos *et al.* (2011).

Para los ensayos enzimáticos, las proteínas de arabisopsis fueron extraídas según Bailly *et al.* (1996).

Las proteínas recombinantes fusionadas a MBP (pMGWA) y a colas de histidina (pDEST17) fueron expresadas en *E. coli* y purificadas por la empresa Biomedal. Las principales características de los vectores están recogidas en la tabla M.3. Dichas proteínas se emplearon en los ensayos de actividad proteín-fosfatasa *in vitro*.

La extracción y purificación de proteínas recombinantes con colas de histidina también se llevo a cabo en el laboratorio de la Dra. M. Pagés (CRAG, Barcelona). Para ello, primero se procedió a la inducción de la proteína recombinante y a la extracción de proteínas totales de *E. coli*. Se realizó un preinóculo de *E. coli* con la construcción de interés en 30 ml de LB con el que se inoculó un cultivo de 0.5 L de LB con el antibiótico correspondiente. Cuando la DO₆₀₀ del cultivo fue de 0.6-0.9 se añadió IPTG (0.4 mM) y se incubó 5-6 h, tras lo cual se centrifugó a 8000 rpm 15 min y se resuspendió en 25 ml de tampón de lisis (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 1 μM, PMSF 1mM, aprotinina 10 μg/ml, E-64 1 μg/ml, leupeptina 10 μg/ml y pepsatina 1 μg/ml, lisozima 1 mg/ml, pH 7.9). Se incubó 1 h en hielo agitando 3-4 veces, se añadió tritón X-100 0.001 % v/v y se incubó 5 min en hielo. La suspensión se sonicó 2 veces durante 30 s (intervalos de 1 s a 35 W) y se centrifugó a 8000 rpm a 4 °C durante 45 min. Se recuperó el sobrenadante y se pasó 2 veces por una columna de NiSO₄-Sepharaosa previamente preparada según las instrucciones del fabricante (GE Healthcare Life Sciences). Por último, se eluyó la proteína recombinante con concentraciones crecientes de imidazol, resolviéndose una alícuota de cada concentración en un gel de poliacrilamida para elegir la fracción más enriquecida en la proteína recombinante a emplear en ensayos posteriores.

La cuantificación de proteínas se realizó con el Bio-Rad Protein Assay basado en el método de Bradford (Bradford, 1976).

2.6.2 Electroforesis monodimensional: SDS-PAGE

La electroforesis monodimensional se realizó según Laemmli (1970). El gel concentrante se realizó al 4 % y el separador al 10 % de acrilamida, con un grosor de 0.75-1 mm. Se cargaron 40-100 μg de proteína por pocillo. La electroforesis se resolvió a 60 V hasta que la muestra penetró en el gel separador, momento en que el voltaje se aumentó a 100 V.

2.6.3 Inmunoblot (transferencia y detección)

La técnica western blot o inmunoblot (Renart *et al.*, 1979) se llevó a cabo siguiendo estos pasos:

- Transferencia de las proteínas del gel a una membrana de PVDF en un Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (BIORAD). La disposición del "sándwich" de transferencia desde el ánodo al cátodo fue la siguiente: 4 papeles Whatman embebidos en 300 mM Tris Base, 20 % v/v metanol; 2 papeles Whatman embebidos en 25 mM Tris Base,

20 % v/v metanol; membrana de PVDF previamente activada durante 5 min en metanol; gel de poliacrilamida y 6 papeles Whatman embebidos en 40 mM ácido aminocaproico, 25 mM Tris Base, 20 % v/v metanol. La corriente aplicada durante 20 min tuvo una tensión máxima de 25 V y una intensidad constante de 2 A.

- En la detección se bloqueó la membrana durante 1 h con una solución de leche desnatada en polvo al 5 % p/v en TBS con 0.1% v/v Tween-20 (TBS-T). Se incubó la membrana en una solución de leche desnatada en polvo al 1 % p/v en TBS-T con el anticuerpo primario a la titulación indicada por el fabricante durante 2-3 h a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 10 min con TBS-T. Se incubó la membrana en una solución de leche desnatada en polvo al 1 % p/v en TBS-T con el anticuerpo secundario a la titulación indicada por el fabricante durante 1-2 h a temperatura ambiente. Se realizaron 2 lavados de 10 min con TBS-T y se mantuvo la membrana en TBS hasta realizar el revelado con el kit Amersham™ ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences) según las instrucciones del fabricante y mediante el sistema de detección LAS1000 (Fujifilm).

Los anticuerpos empleados fueron: anticuerpo primario anti-GFP (Living Colors® A.v. Monoclonal Antibody JL-8, Clontech, dilución de trabajo 1:1000) y anticuerpo secundario anti-ratón (Donkey antimouse immunoglobulines, HRP-conjugated, Amersham).

2.6.4 Fosforilación *in vitro* de proteínas

La fosforilación *in vitro* se llevó a cabo según Vilela *et al.* (2013). Se empleó 1 µg de 6xHis-SAUR16 en cada reacción y las proteín-quinasas SnRK2, CK2 y AMPK.

La radioactividad se detectó utilizando un GE STORM 820 Phosphorimager (GE Healthcare).

2.6.5 Ensayo de actividad proteín-kinasa en gel (*In Gel Kinase Assay*)

El ensayo de actividad proteín-kinasa en gel se llevó a cabo en el laboratorio de la Dra. M. Pagés (CRAG, Barcelona) siguiendo los pasos propuestos en Vilela *et al.* (2013). El gel de poliacrilamida se imbuyó con 1 mg de 6xHis-SAUR16 y 50 µg de extracto proteico de plantas de arabisopsis de 10 días con distintos tratamientos hormonales (4 h en medio MS líquido) fueron cargados por pocillo.

La radioactividad se detectó utilizando un GE STORM 820 Phosphorimager (GE Healthcare).

2.6.6 Actividad proteín-fosfatasa *in vitro*

Los ensayos de actividad proteín-fosfatasa *in vitro* de proteínas se realizaron con el kit Serine/Threonine Phosphatase Assay System (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usaron 100 ng de proteína FsPP2C2 y 200-300 ng de proteína SAUR16

purificadas de *E. coli*. La incubación se realizó a 30°C con una duración de 30 min. Los resultados del ensayo se obtuvieron con un espectrofotómetro Multiskan GO a 600 nm (Thermo Scientific).

2.6.7 Actividad enzimática (SOD, GR y Catalasa)

Las medidas de actividad enzimática se realizaron en el laboratorio de la Dra. Françoise Corbineau (UPMC, Paris) según las técnicas descritas en Bailly *et al.* (1996). Se emplearon 100 mg de semillas imbibidas de arabidopsis por tratamiento, y se midieron las actividades superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa (GR) y catalasa.

2.7 Tinción histoquímica GUS (β -glucuronidasa)

La tinción GUS se realizó según describieron Jefferson *et al.* (1987) con ligeras modificaciones en la solución de tinte (50 mM tampón fosfato potásico pH 7.0, 0.05 % Triton X-100, 1 mM $K_3Fe(CN)_6$, 1 mM $K_4Fe(CN)_6$, 0.05 % EDTA y 1 mg/ml X-gluc).

La observación de las muestras y la captura de imágenes se realizó en una lupa Leica MZ16 FA dotada de un objetivo 1.0x apocromático y una cámara Leica DFC490.

2.8 Doble híbrido en levadura (yeast two hybrid, Y2H)

La búsqueda de interactores de FsPP2C2 fue llevada a cabo por la empresa Hybrigenics S.A. (<http://www.hybrigenics.com/>). Para ello, emplearon la región codificante de FsPP2C2 fusionada al dominio de unión (BD) a ADN de LexA en el vector pB27, derivado de pBTM116 (Vojtek y Hollenberg, 1995), y se enfrentó a una genoteca de ADNc de *A. thaliana* clonada en fase con el dominio de activación (AD) de GAL4 en el vector pP6, que deriva del pGADGH (Bartel *et al.*, 1993).

La cepa de levadura L40 Δ Gal4 (MAT α) se transformó con BD-FsPP2C2 y la genoteca se introdujo en la cepa Y187 (MAT α). Las interacciones se testaron por la aproximación del *mating* (Fromont-Racine *et al.*, 1997).

Las interacciones se detectaron por auxotrofia, empleando el gen reportador *HIS3*, que permite el crecimiento de la levadura en un medio sin histidina. Los diploides se testaron en medio sin leucina ni triptófano (control positivo de *mating*), y en el mismo medio sin histidina y concentraciones crecientes de 3-Aminotriazol (1, 5, 10 y 100 mM).

Para los ensayos de doble híbrido dirigido, llevados a cabo en el laboratorio, se clonaron los CDSs de las proteínas en estudio en los vectores pDEST22 y pDEST32 (Life Technologies, tabla M.3), empleándose las cepas de *S. cerevisiae* pJ694 (MAT α) y YM4271 (MAT α). El resto del proceso fue similar al expuesto anteriormente.

2.9 Obtención de imágenes

Las imágenes de doble híbrido en levadura y placas de cultivo *in vitro* de arabisopsis se obtuvieron con una cámara Nikon DC90 con un objetivo 18-105 mm.

Las fotos de tejidos con actividad β -GUS se realizaron con una lupa Leica MZ16 FA dotada de un objetivo 1.0x apocromático y una cámara Leica DFC490.

2.10 Herramientas informáticas y análisis estadísticos

Para la realización y redacción de esta memoria se han empleado un amplio abanico de herramientas de software. Entre ellas cabe destacar el paquete Microsoft Office (procesador de texto, hoja de cálculo...), Adobe Photoshop e ImageJ (editores gráficos), Geneious, Bioedit y MEGA (análisis bioinformático), R (software estadística) y EndNote (gestor bibliográfico). Así mismo, se han utilizado diversas bases de datos y herramientas disponibles *on line* como: Bio-Analytic Resource (www.bar.utoronto.ca), Arabidopsis Information Resource (TAIR, www.arabidopsis.org) y SIB Bioinformatic Resource Portal (www.expasy.org). Para la comparación estadística de muestras se ha utilizado la T de student de doble cola para la comparación de una muestra problema con su control. El análisis y comparación de varias muestras con un control se ha llevado a cabo con el test de Dunnet, cuando las condiciones de normalidad y homocedasticidad así lo permitían, o el test no paramétrico KrusKal cuando alguna de éstas condiciones no se cumplía (Crawley, 2007).



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAPHY

BIBLIOGRAFÍA/ BIBLIOGRAPHY

- Abeles FB, Morgan PW, Saltveit ME** (1992) Ethylene in Plant Biology. Elsevier
- Alexandersson E, Fraysse L, Sjövall-Larsen S, Gustavsson S, Fellert M, Karlsson M, Johanson U, Kjellbom P** (2005) Whole Gene Family Expression and Drought Stress Regulation of Aquaporins. *Plant Mol Biol* **59**: 469–484
- Ali-Rachedi S, Bouinot D, Wagner M-H, Bonnet M, Sotta B, Grappin P, Jullien M** (2004) Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **219**: 479–88
- Allan AC, Fricker MD, Ward JL, Beale MH, Trewavas AJ** (1994) Two Transduction Pathways Mediate Rapid Effects of Abscisic Acid in *Commelina* Guard Cells. *Plant Cell* **6**: 1319–1328
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, et al** (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* (80-) **301**: 653–657
- Alonso-Blanco C, Bentsink L, Hanhart CJ, Blankestijn-de Vries H, Koornneef M** (2003) Analysis of natural allelic variation at seed dormancy loci of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **164**: 711–29
- An G, Ebert PR, Mitra A, Ha SBP** (1988) Direct *Agrobacterium* transformation: freeze-thaw method. *Plant Mol Biol Man* 1–19
- Antoni R, Gonzalez-Guzman M, Rodriguez L, Peirats-Llobet M, Pizzio GA, Fernandez MA, De Winne N, De Jaeger G, Dietrich D, Bennett MJ, et al** (2013) PYRABACTIN RESISTANCE1-LIKE8 plays an important role for the regulation of abscisic acid signaling in root. *Plant Physiol* **161**: 931–41
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 373–99
- Arabidopsis Interactome Mapping Consortium** (2011) Evidence for network evolution in an *Arabidopsis* interactome map. *Science* **333**: 601–7
- Ariel FD, Manavella PA, Dezar CA, Chan RL** (2007) The true story of the HD-Zip family. *Trends Plant Sci* **12**: 419–26
- Arroyo A, Bossi F, Finkelstein RR, Leon P** (2003) Three Genes That Affect Sugar Sensing (Abscisic Acid Insensitive 4, Abscisic Acid Insensitive 5, and Constitutive Triple Response 1) Are Differentially Regulated by Glucose in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **133**: 231–242
- Baena-González E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J** (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* **448**: 938–42
- Bailly C** (2004) Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci Res* **14**: 93–107
- Bailly C, Benamar A, Corbineau F, Come D** (1996) Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. *Physiol Plant* **97**: 104–110
- Bailly C, El Maarouf Bouteau H, Corbineau F** (2008) [Seed dormancy alleviation and oxidative signaling]. *J la Société Biol* **202**: 241–8
- Barkan A, Small I** (2014) Pentatricopeptide repeat proteins in plants. *Annu Rev Plant Biol* **65**: 415–42
- Barkan A, Walker M, Nolasco M, Johnson D** (1994) A nuclear mutation in maize blocks the processing and translation of several chloroplast mRNAs and provides evidence for the differential translation of alternative mRNA forms. *EMBO J* **13**: 3170–81

- Barrero JM, Millar AA, Griffiths J, Czechowski T, Scheible WR, Udvardi M, Reid JB, Ross JJ, Jacobsen J V, Gubler F** (2010) Gene expression profiling identifies two regulatory genes controlling dormancy and ABA sensitivity in *Arabidopsis* seeds. *Plant J* **61**: 611–22
- Bartel P, Chien CT, Sternglanz R, Fields S** (1993) Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* **14**: 920–924
- Bartel PL, Roecklein JA, SenGupta D, Fields S** (1996) A protein linkage map of *Escherichia coli* bacteriophage T7. *Nat Genet* **12**: 72–7
- Baskin JM, Baskin CC** (2005) Underdeveloped embryos in dwarf seeds and implications for assignment to dormancy class. *Seed Sci Res* **15**: 357–360
- Baskin JM, Baskin CC** (2004) A classification system for seed dormancy. *Seed Sci Res* **14**: 1–16
- Baskin JM, Baskin CC** (1998) Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination.
- Bassel GW, Lan H, Glaab E, Gibbs DJ, Gerjets T, Krasnogor N, Bonner AJ, Holdsworth MJ, Provart NJ** (2011) Genome-wide network model capturing seed germination reveals coordinated regulation of plant cellular phase transitions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 9709–14
- Batak I, Dević M, Giba Z, Grubišić a., Poff KL, Konjević R** (2002) The effects of potassium nitrate and NO-donors on phytochrome A- and phytochrome B-specific induced germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Seed Sci Res* **12**: 253–259
- Baudouin E, Meskiene I, Hirt H** (1999) Unsaturated fatty acids inhibit MP2C, a protein phosphatase 2C involved in the wound-induced MAP kinase pathway regulation. *Plant J* **20**: 343–348
- Baumgartner U, Hamilton B, Piskacek M, Ruis H, Rottensteiner H** (1999) Functional analysis of the Zn(2)Cys(6) transcription factors Oaf1p and Pip2p. Different roles in fatty acid induction of beta-oxidation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **274**: 22208–22216
- Beaudoin N, Serizet C, Gosti F, Giraudat J** (2000) Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell* **12**: 1103–15
- Bellaire BA, Carmody J, Braud J, Gossett DR, Banks SW, Lucas MC, Fowler TE** (2000) Involvement of abscisic acid-dependent and -independent pathways in the upregulation of antioxidant enzyme activity during NaCl stress in cotton callus tissue. *Free Radic Res* **33**: 531–45
- Bensmihen S, Giraudat J, Parcy F** (2005) Characterization of three homologous basic leucine zipper transcription factors (bZIP) of the ABI5 family during *Arabidopsis thaliana* embryo maturation. *J Exp Bot* **56**: 597–603
- Bensmihen S, Rippa 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**: 1391–403
- Bentolila S, Heller WP, Sun T, Babina AM, Friso G, van Wijk KJ, Hanson MR** (2012) RIP1, a member of an *Arabidopsis* protein family, interacts with the protein RARE1 and broadly affects RNA editing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: E1453–61
- Bentsink L, Jowett J, Hanhart CJ, Koornneef M** (2006) Cloning of DOG1, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 17042–7
- Bentsink L, Koornneef M** (2008) Seed dormancy and germination. *Arabidopsis Book* **6**: e0119
- Bernard P, Couturier M** (1992) Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol* **226**: 735–745
- Berridge MJ** (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**: 315–325
- Bertani G** (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62**: 293–300

- Bertani G** (2004) Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *J Bacteriol* **186**: 595–600
- Bethke PC, Gubler F, Jacobsen J V, Jones RL** (2004) Dormancy of Arabidopsis seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. *Planta* **219**: 847–55
- Bethke PC, Hwang Y-S, Zhu T, Jones RL** (2006a) Global patterns of gene expression in the aleurone of wild-type and dwarf1 mutant rice. *Plant Physiol* **140**: 484–98
- Bethke PC, Libourel IGL, Aoyama N, Chung Y-Y, Still DW, Jones RL** (2007) The Arabidopsis aleurone layer responds to nitric oxide, gibberellin, and abscisic acid and is sufficient and necessary for seed dormancy. *Plant Physiol* **143**: 1173–88
- Bethke PC, Libourel IGL, Reinöhl V, Jones RL** (2006b) Sodium nitroprusside, cyanide, nitrite, and nitrate break Arabidopsis seed dormancy in a nitric oxide-dependent manner. *Planta* **223**: 805–12
- Bewley JD** (1997) Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell* **9**: 1055–1066
- Bewley JD, Black M** (1994) Seeds and Germination. *Seeds Physiol. Dev. Germination Dormancy*
- Bewley JD, Bradford KJ, Hilhorst HWM, Nonogaki H** (2013) *Seeds*. Springer New York, New York, NY
- Bögre L, Okrész L, Henriques R, Anthony RG** (2003) Growth signalling pathways in Arabidopsis and the AGC protein kinases. *Trends Plant Sci* **8**: 424–31
- Bork P, Brown NP, Hegyi H, Schultz J** (1996) The protein phosphatase 2C (PP2C) superfamily: detection of bacterial homologues. *Protein Sci* **5**: 1421–5
- Borthwick HA, Hendricks SB, Parker MW, Toole EH, Toole VK** (1952) A Reversible Photoreaction Controlling Seed Germination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **38**: 662–6
- Borthwick HA, Hendricks SB, Toole EH, Toole VK** (1954) Action of light on lettuce seed germination. *Bot Gaz* **115**: 205–225
- Bossi F, Cordoba E, Dupré P, Mendoza MS, Román CS, León P** (2009) The Arabidopsis ABA-INSENSITIVE (ABI) 4 factor acts as a central transcription activator of the expression of its own gene, and for the induction of ABI5 and SBE2.2 genes during sugar signaling. *Plant J* **59**: 359–74
- Boulouis A, Raynaud C, Bujaldon S, Aznar A, Wollman F-A, Choquet Y** (2011) The nucleus-encoded trans-acting factor MCA1 plays a critical role in the regulation of cytochrome f synthesis in Chlamydomonas chloroplasts. *Plant Cell* **23**: 333–49
- Bove J, Lucas P, Godin B, Ogé L, Jullien M, Grappin P** (2005) Gene expression analysis by cDNA-AFLP highlights a set of new signaling networks and translational control during seed dormancy breaking in *Nicotiana glauca*. *Plant Mol Biol* **57**: 593–612
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254
- Brocard IM, Lynch TJ, Finkelstein RR** (2002) Regulation and role of the Arabidopsis abscisic acid-insensitive 5 gene in abscisic acid, sugar, and stress response. *Plant Physiol* **129**: 1533–43
- Bus JS, Gibson JE** (1984) Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity. *Environ Health Perspect* **55**: 37–46
- Busso D, Delagoutte-Busso B, Moras D** (2005) Construction of a set Gateway-based destination vectors for high-throughput cloning and expression screening in *Escherichia coli*. *Anal Biochem* **343**: 313–321
- Cadman CSC, Toorop PE, Hilhorst HWM, Finch-Savage WE** (2006) Gene expression profiles of Arabidopsis Cvi seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism. *Plant J* **46**: 805–22

- Castellani A, Chalmers AJ** (1919) *Manual of Tropical Medicine*, 3rd ed. Williams Wood and Co., New York
- Castillo M-C, Lozano-Juste J, González-Guzmán M, Rodríguez L, Rodríguez PL, León J** (2015) Inactivation of PYR/PYL/RCAR ABA receptors by tyrosine nitration may enable rapid inhibition of ABA signaling by nitric oxide in plants. *Sci Signal* **8**: ra89
- Chae K, Isaacs CG, Reeves PH, Maloney GS, Muday GK, Nagpal P, Reed JW** (2012) Arabidopsis SMALL AUXIN UP RNA63 promotes hypocotyl and stamen filament elongation. *Plant J* **71**: 684–97
- Chapman EJ, Estelle M** (2009) Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annu Rev Genet* **43**: 265–85
- Chen F, Dahal P, Bradford KJ** (2001) Two Tomato Expansin Genes Show Divergent Expression and Localization in Embryos during Seed Development and Germination. *Plant Physiol* **127**: 928–936
- Cheng A, Ross KE, Kaldis P, Solomon MJ** (1999) Dephosphorylation of cyclin-dependent kinases by type 2C protein phosphatases. *Genes Dev* **13**: 2946–2957
- Cheng W-H, Chiang M-H, Hwang S-G, Lin P-C** (2009) Antagonism between abscisic acid and ethylene in Arabidopsis acts in parallel with the reciprocal regulation of their metabolism and signaling pathways. *Plant Mol Biol* **71**: 61–80
- Cheng ZJ, Zhao XY, Shao XX, Wang F, Zhou C, Liu YG, Zhang Y, Zhang XS** (2014) Abscisic acid regulates early seed development in Arabidopsis by ABI5-mediated transcription of SHORT HYPOCOTYL UNDER BLUE1. *Plant Cell* **26**: 1053–68
- Chérel I, Michard E, Platet N, Mouline K, Alcon C, Sentenac H, Thibaud J-B** (2002) Physical and functional interaction of the Arabidopsis K(+) channel AKT2 and phosphatase AtPP2CA. *Plant Cell* **14**: 1133–46
- Chiang GCK, Barua D, Kramer EM, Amasino RM, Donohue K** (2009) Major flowering time gene, flowering locus C, regulates seed germination in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 11661–6
- Chibani K, Ali-Rachedi S, Job C, Job D, Jullien M, Grappin P** (2006) Proteomic analysis of seed dormancy in Arabidopsis. *Plant Physiol* **142**: 1493–510
- Chiwocha SDS, Cutler AJ, Abrams SR, Ambrose SJ, Yang J, Ross ARS, Kermode AR** (2005) The *etr1-2* mutation in Arabidopsis thaliana affects the abscisic acid, auxin, cytokinin and gibberellin metabolic pathways during maintenance of seed dormancy, moist-chilling and germination. *Plant J* **42**: 35–48
- Clough SJ, Bent AF** (1998a) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **16**: 735–43
- Clough SJ, Bent AF** (1998b) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **16**: 735–43
- Clouse S** (2001) Brassinosteroids. *Curr Biol* **11**: R904
- Clouse SD, Sasse JM** (1998) BRASSINOSTEROIDS: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 427–451
- Cohen P** (2000) The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends Biochem Sci* **25**: 596–601
- Corbineau F, Bianco J, Garello G, Come 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
- Corbineau F, Côme D** (1995) Control of seed germination and dormancy by gaseous environment. *Seed Dev. germination*

- Curtis, Grossniklaus** (2003) A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol* **133**: 462–469
- Cushing DA, Forsthoefel NR, Gestaut DR, Vernon DM** (2005) Arabidopsis emb175 and other ppr knockout mutants reveal essential roles for pentatricopeptide repeat (PPR) proteins in plant embryogenesis. *Planta* **221**: 424–36
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR** (2010) Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 651–79
- Danquah A, de Zelicourt A, Colcombet J, Hirt H** (2014) The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnol Adv* **32**: 40–52
- Darwin CR (assisted by DF)**. (1880) *The power of movement in plants*, 1st ed. John Murray, London
- Das AK, Helps NR, Cohen PT, Barford D** (1996) Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *EMBO J* **15**: 6798–809
- Davies WJ, Zhang J** (1991) Root Signals and the Regulation of Growth and Development of Plants in Drying Soil. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **42**: 55–76
- Debeaujon I, Léon-Kloosterziel KM, Koornneef M** (2000) Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in Arabidopsis. *Plant Physiol* **122**: 403–14
- 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
- Dekkers BJW, Schuurmans JAMJ, Smeekens SCM** (2004) Glucose delays seed germination in Arabidopsis thaliana. *Planta* **218**: 579–88
- Ding H, Zhang A, Wang J, Lu R, Zhang H, Zhang J, Jiang M** (2009) Identity of an ABA-activated 46 kDa mitogen-activated protein kinase from Zea mays leaves: partial purification, identification and characterization. *Planta* **230**: 239–51
- Domin K** (1921) Beiträge zur Flora und Pflanzengeographie Australiens. *Biblioth Bot* **63**: 591
- Downie B, Bewley JD** (2000) Soluble sugar content of white spruce (*Picea glauca*) seeds during and after germination. *Physiol Plant* **110**: 1–12
- Doyle JJ, Doyle JL** (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus (Madison)* **12**: 13–15
- Dupeux F, Antoni R, Betz K, Santiago J, Gonzalez-Guzman M, Rodriguez L, Rubio S, Park S-Y, Cutler SR, Rodriguez PL, et al** (2011) Modulation of abscisic acid signaling in vivo by an engineered receptor-insensitive protein phosphatase type 2C allele. *Plant Physiol* **156**: 106–16
- Earley KW, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, Pikaard CS** (2006) Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J* **45**: 616–29
- El-Maarouf-Bouteau H, Bailly C** (2008) Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant Signal Behav* **3**: 175–82
- Ellis MH, Dennis ES, Peacock WJ** (1999) Arabidopsis roots and shoots have different mechanisms for hypoxic stress tolerance. *Plant Physiol* **119**: 57–64
- Fan L, Zheng S, Wang X** (1997) Antisense suppression of phospholipase D alpha retards abscisic acid- and ethylene-promoted senescence of postharvest Arabidopsis leaves. *Plant Cell* **9**: 2183–96
- Farrant JM, Bailly C, Leymarie J, Hamman B, Côme D, Corbineau F** (2004) Wheat seedlings as a model to understand desiccation tolerance and sensitivity. *Physiol Plant* **120**: 563–574
- Felsenstein J** (1985) Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution (N Y)* **39**: 783–791
- Fenner M, Thompson K** (2005) *The Ecology of Seeds*, 2nd ed. Cambridge University Press

- Fernández-Arbaizar A** (2010) Caracterización Funcional De Nuevos Componentes Moleculares Implicados En La Señalización De ABA Durante La Germinación De Semillas De *Arabidopsis Thaliana*. Universidad de Salamanca
- Fernandez-Marcos M, Sanz L, Lewis DR, Muday GK, Lorenzo O** (2011) Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PIN-FORMED 1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 18506–18511
- Feurtado JA, Ambrose SJ, Cutler AJ, Ross ARS, Abrams SR, Kermode AR** (2004) Dormancy termination of western white pine (*Pinus monticola* Dougl. Ex D. Don) seeds is associated with changes in abscisic acid metabolism. *Planta* **218**: 630–9
- Fields S, Song O** (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245–246
- Finch-Savage WE, Cadman CSC, Toorop PE, Lynn JR, Hilhorst HWM** (2007) Seed dormancy release in *Arabidopsis Cvi* by dry after-ripening, low temperature, nitrate and light shows common quantitative patterns of gene expression directed by environmentally specific sensing. *Plant J* **51**: 60–78
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G** (2006) Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol* **171**: 501–23
- Finkelstein R** (2013) Abscisic Acid synthesis and response. *Arabidopsis Book* **11**: e0166
- Finkelstein R, Lynch T, Reeves W, Petitfils M, Mostachetti M** (2011) Accumulation of the transcription factor ABA-insensitive (ABI)4 is tightly regulated post-transcriptionally. *J Exp Bot* **62**: 3971–9
- Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C** (2008) Molecular aspects of seed dormancy. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 387–415
- Finkelstein RR, Gampala SSL, Rock CD** (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* **14 Suppl**: S15–45
- Finkelstein RR, Lynch TJ** (2000) The *Arabidopsis* Abscisic Acid Response Gene *ABI5* Encodes a Basic Leucine Zipper Transcription Factor. *Plant Cell* **12**: 599–610
- 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**: 1043–54
- Flematti GR, Ghisalberti EL, Dixon KW, Trengove RD** (2004) A compound from smoke that promotes seed germination. *Science* **305**: 977
- Footitt S, Douterelo-Soler I, Clay H, Finch-Savage WE** (2011) Dormancy cycling in *Arabidopsis* seeds is controlled by seasonally distinct hormone-signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 20236–41
- 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**: 376–84
- Franco AR, Gee MA, Guilfoyle TJ** (1990) Induction and Superinduction of Auxin-responsive and Protein Synthesis Inhibitors. *J Biol Chem* **265**: 15845–15489
- Frey A, Effroy D, Lefebvre V, Seo M, Perreau F, Berger A, Sechet J, To A, North HM, Marion-Poll A** (2012) Epoxy-carotenoid cleavage by *NCED5* fine-tunes ABA accumulation and affects seed dormancy and drought tolerance with other *NCED* family members. *Plant J* **70**: 501–12
- Frey A, Godin B, Bonnet M, Sotta B, Marion-Poll A** (2004) Maternal synthesis of abscisic acid controls seed development and yield in *Nicotiana glauca*. *Planta* **218**: 958–64
- Fromont-Racine M, Rain JC, Legrain P** (1997) Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat Genet* **16**: 277–82

- Fryer MJ, Oxborough K, Mullineaux PM, Baker NR** (2002) Imaging of photo-oxidative stress responses in leaves. *J Exp Bot* **53**: 1249–54
- Fuchs S, Grill E, Meskiene I, Schweighofer A** (2013) Type 2C protein phosphatases in plants. *FEBS J* **280**: 681–93
- Fuglsang AT, Guo Y, Cuin TA, Qiu Q, Song C, Kristiansen KA, Bych K, Schulz A, Shabala S, Schumaker KS, et al** (2007) Arabidopsis protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H⁺-ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein. *Plant Cell* **19**: 1617–34
- Fuglsang AT, Visconti S, Drumm K, Jahn T, Stensballe A, Mattei B, Jensen ON, Aducci P, Palmgren MG** (1999) Binding of 14-3-3 protein to the plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase AHA2 involves the three C-terminal residues Tyr(946)-Thr-Val and requires phosphorylation of Thr(947). *J Biol Chem* **274**: 36774–80
- Fujii H, Chinnusamy V, Rodrigues A, Rubio S, Antoni R, Park S-Y, Cutler SR, Sheen J, Rodriguez PL, Zhu J-K** (2009) In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature* **462**: 660–4
- Fujii H, Zhu J-K** (2009) Arabidopsis mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 8380–5
- Fujita M, Fujita Y, Maruyama K, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Tran L-SP, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2004) A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *Plant J* **39**: 863–76
- Fujita Y, Fujita M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2011) ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *J Plant Res* **124**: 509–25
- Furihata T, Maruyama K, Fujita Y, Umezawa T, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2006) Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 1988–93
- Gagne JM, Clark SE** (2010) The Arabidopsis stem cell factor POLTERGEIST is membrane localized and phospholipid stimulated. *Plant Cell* **22**: 729–43
- Gama-Arachchige NS, Baskin JM, Geneve RL, Baskin CC** (2010) Identification and characterization of the water gap in physically dormant seeds of Geraniaceae, with special reference to *Geranium carolinianum*. *Ann Bot* **105**: 977–90
- Garcia ME, Lynch T, Peeters J, Snowden C, Finkelstein R** (2008) A small plant-specific protein family of ABI five binding proteins (AFPs) regulates stress response in germinating Arabidopsis seeds and seedlings. *Plant Mol Biol* **67**: 643–58
- Gazzarrini S, Tsuchiya Y, Lumba S, Okamoto M, McCourt P** (2004) The transcription factor FUSCA3 controls developmental timing in Arabidopsis through the hormones gibberellin and abscisic acid. *Dev Cell* **7**: 373–85
- Gee MA, Hagen G, Guilfoyle TJ, Geeia MA, Hagenib G, Guilfoyleb TJ, Gee MA, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1991) Tissue-specific and organ-specific expression of soybean auxin-responsive transcripts GH3 and SAURs. *Plant Cell* **3**: 419–430
- Gendreau E, Traas J, Desnos T, Grandjean O, Caboche M, Höfte H** (1997) Cellular basis of hypocotyl growth in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.* doi: 114/1/295 [pii]
- 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**: 1117–26
- Gil P, Green PJ** (1997) Regulatory activity exerted by the SAUR-AC1 promoter region in transgenic plants. *Plant Mol Biol* **34**: 803–808
- Goda H, Shimada Y, Asami T, Fujioka S, Yoshida S** (2002) Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis. *Plant Physiol* **130**: 1319–34

- 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
- González-Guzmán M, Apostolova N, Bellés 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**: 1833–46
- Gonzalez-Guzman M, Pizzio GA, Antoni R, Vera-Sirera F, Merilo E, Bassel GW, Fernández MA, Holdsworth MJ, Perez-Amador MA, Kollist H, et al** (2012) Arabidopsis PYR/PYL/RCAR receptors play a major role in quantitative regulation of stomatal aperture and transcriptional response to abscisic acid. *Plant Cell* **24**: 2483–96
- 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**: 1897–910
- Graeber K, Nakabayashi K, Miatton E, Leubner-Metzger G, Soppe WJJ** (2012) Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant Cell Environ* **35**: 1769–86
- Grappin P, Bouinot D, Sotta B, Miginiac E, Jullien M** (2000) Control of seed dormancy in *Nicotiana plumbaginifolia*: post-imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. *Planta* **210**: 279–85
- Guan LM, Zhao J, Scandalios JG** (2000) Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize Cat1 antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H₂O₂ is the likely intermediary signaling molecule for the response. *Plant J* **22**: 87–95
- Guthridge MA, Bellosta P, Tavoloni N, Basilico C** (1997) FIN13, a novel growth factor-inducible serine-threonine phosphatase which can inhibit cell cycle progression. *Mol Cell Biol* **17**: 5485–5498
- Gutierrez L, Van Wuytswinkel O, Castelain M, Bellini C** (2007) Combined networks regulating seed maturation. *Trends Plant Sci* **12**: 294–300
- Hagen G, Guilfoyle TJ** (2002) Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol Biol* **49**: 373–385
- Halliwell B, Gutteridge JMC** (2015) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press
- Hamly DH.** (1932) Softening of the seeds of *Melilotus alba*. *Bot Gaz* **93**: 345–375
- Hammani K, Gobert A, Small I, Giegé P** (2011) A PPR protein involved in regulating nuclear genes encoding mitochondrial proteins? *Plant Signal Behav* **6**: 748–50
- Hanahan D** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557–580
- Hansen EC** (1883) *Undersøgelser over alkoholgjærsvampenes fysiologi og morfologi. II. Om askosporedannelsen hos slægten Saccharomyces. Meddelelser fra Carlsb. Lab.*
- Haruta M, Burch HL, Nelson RB, Barrett-Wilt G, Kline KG, Mohsin SB, Young JC, Otegui MS, Sussman MR** (2010) Molecular characterization of mutant Arabidopsis plants with reduced plasma membrane proton pump activity. *J Biol Chem* **285**: 17918–29
- Hattori T, Totsuka M, Hobo T, Kagaya Y, Yamamoto-Toyoda A** (2002) Experimentally determined sequence requirement of ACGT-containing abscisic acid response element. *Plant Cell Physiol* **43**: 136–40
- Hayashi Y, Nakamura S, Takemiya A, Takahashi Y, Shimazaki K -i., Kinoshita T** (2010) Biochemical Characterization of In Vitro Phosphorylation and Dephosphorylation of the Plasma Membrane H⁺-ATPase. *Plant Cell Physiol* **51**: 1186–1196
- Hayashi Y, Takahashi K, Inoue S-I, Kinoshita T** (2014) Abscisic acid suppresses hypocotyl elongation by dephosphorylating plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **55**: 845–53

- Hayes RG, Klein WH** (1974) Spectral quality influence of light during development of *Arabidopsis thaliana* plants in regulating seed germination. *Plant Cell Physiol* **15** : 643–653
- Hedden P, Kamiya Y** (1997) GIBBERELLIN BIOSYNTHESIS: Enzymes, Genes and Their Regulation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 431–460
- Hilhorst HWM** (1995) A critical update on seed dormancy. 1. Primary dormancy. *Seed Sci Res* **5**: 61–73
- Hilhorst HWM** (1998) The regulation of secondary dormancy. The membrane hypothesis revisited. *Seed Sci Res* **8**: 77–90
- Hilhorst HWM** (1990) Dose-Response Analysis of Factors Involved in Germination and Secondary Dormancy of Seeds of *Sisymbrium officinale*: II. Nitrate. *Plant Physiol* **94**: 1096–1102
- Himmelbach A** (2002) Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in *Arabidopsis*. *EMBO J* **21**: 3029–3038
- Holdsworth MJ, Bentsink L, Soppe WJ** (2008) Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytol* **179**: 33–54
- Hoth S, Morgante M, Sanchez J-P, Hanafey MK, Tingey S V, Chua N-H** (2002) Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abi1-1* mutant. *J Cell Sci* **115**: 4891–900
- Hou K, Wu W, Gan S-S** (2013) SAUR36, a small auxin up RNA gene, is involved in the promotion of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **161**: 1002–9
- Howell KA, Narsai R, Carroll A, Ivanova A, Lohse M, Usadel B, Millar AH, Whelan J** (2009) Mapping metabolic and transcript temporal switches during germination in rice highlights specific transcription factors and the role of RNA instability in the germination process. *Plant Physiol* **149**: 961–80
- Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W, Zimmermann P** (2008a) Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. - PubMed - NCBI. *Adv Bioinformatics* **5**
- Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W, Zimmermann P** (2008b) Genevestigator V3: A Reference Expression Database for the Meta-Analysis of Transcriptomes. *Adv Bioinformatics* **5**
- Hsu F-C, Chou M-Y, Peng H-P, Chou S-J, Shih M-C** (2011) Insights into hypoxic systemic responses based on analyses of transcriptional regulation in *Arabidopsis*. *PLoS One* **6**: e28888
- Hu, Chinenov, Kerppola TK** (2002) Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* **9**: 789–798
- Hu X, Jiang M, Zhang A, Lu J** (2005) Abscisic acid-induced apoplastic H₂O₂ accumulation up-regulates the activities of chloroplastic and cytosolic antioxidant enzymes in maize leaves. *Planta* **223**: 57–68
- Hu X, Jiang M, Zhang J, Zhang A, Lin F, Tan M** (2007) Calcium-calmodulin is required for abscisic acid-induced antioxidant defense and functions both upstream and downstream of H₂O₂ production in leaves of maize (*Zea mays*) plants. *New Phytol* **173**: 27–38
- Huang G-T, Ma S-L, Bai L-P, Zhang L, Ma H, Jia P, Liu J, Zhong M, Guo Z-F** (2012) Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Mol Biol Rep* **39**: 969–87
- Hubbard KE, Nishimura N, Hitomi K, Getzoff ED, Schroeder JI** (2010) Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes Dev* **24**: 1695–708
- Iglesias-Fernández R, Matilla A** (2009) After-ripening alters the gene expression pattern of oxidases involved in the ethylene and gibberellin pathways during early imbibition of *Sisymbrium officinale* L. seeds. *J Exp Bot* **60**: 1645–61

- Ingram J, Bartels D** (1996) THE MOLECULAR BASIS OF DEHYDRATION TOLERANCE IN PLANTS. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 377–403
- Irving HR, Gehring CA, Parish RW** (1992) Changes in cytosolic pH and calcium of guard cells precede stomatal movements. *Proc Natl Acad Sci*. doi: 10.1073/pnas.89.5.1790
- Jacob T, Ritchie S, Assmann SM, Gilroy S** (1999a) Abscisic acid signal transduction in guard cells is mediated by phospholipase D activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 12192–7
- Jacob T, Ritchie S, Assmann SM, Gilroy S** (1999b) Abscisic acid signal transduction in guard cells is mediated by phospholipase D activity. *Proc Natl Acad Sci* **96**: 12192–12197
- Jaffé FW, Freschet G-EC, Valdes BM, Runions J, Terry MJ, Williams LE** (2012) G protein-coupled receptor-type G proteins are required for light-dependent seedling growth and fertility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**: 3649–68
- Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T, Parcy F** (2002) bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* **7**: 106–11
- James P, Halladay J, Craig EA** (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**: 1425–1436
- Jang JY, Kim DG, Kim YO, Kim JS, Kang H** (2004) An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **54**: 713–25
- Jeannette E, Rona JP, Bardat F, Cornel D, Sotta B, Miginiac E** (1999) Induction of RAB18 gene expression and activation of K⁺ outward rectifying channels depend on an extracellular perception of ABA in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Plant J* **18**: 13–22
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW** (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* **6**: 3901–7
- Jiang M** (2002) Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *J Exp Bot* **53**: 2401–2410
- Jiang M, Zhang J** (2003) Cross-talk between calcium and reactive oxygen species originated from NADPH oxidase in abscisic acid-induced antioxidant defence in leaves of maize seedlings. *Plant Cell Environ* **26**: 929–939
- Jiang M, Zhang J** (2002) Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *J Exp Bot* **53**: 2401–10
- Jiang M-Y, Zhang J-H** (2004) Cells, Abscisic Acid and Antioxidant Defense in Plant Cells. *Acta Bot Sin* **46**: 1–9
- Jiang W, Yu D** (2009) *Arabidopsis* WRKY2 transcription factor mediates seed germination and postgermination arrest of development by abscisic acid. *BMC Plant Biol* **9**: 96
- Kanno Y, Jikumaru Y, Hanada A, Nambara E, Abrams SR, Kamiya Y, Seo M** (2010) Comprehensive hormone profiling in developing *Arabidopsis* seeds: examination of the site of ABA biosynthesis, ABA transport and hormone interactions. *Plant Cell Physiol* **51**: 1988–2001
- Kant S, Bi YM, Zhu T, Rothstein SJ** (2009a) SAUR39, a small auxin-up RNA gene, acts as a negative regulator of auxin synthesis and transport in rice. *Plant Physiol* **151**: 691–701
- Kant S, Bi YM, Zhu T, Rothstein SJ** (2009b) SAUR39, a small auxin-up RNA gene, acts as a negative regulator of auxin synthesis and transport in rice. *Plant Physiol* **151**: 691–701
- Karssen CM, Brinkhorst-van der Swan DL, Breckland AE, Koornneef M** (1983) Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies on abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* **157**: 158–65

- Kazama T, Toriyama K** (2003) A pentatricopeptide repeat-containing gene that promotes the processing of aberrant atp6 RNA of cytoplasmic male-sterile rice. *FEBS Lett* **544**: 99–102
- Kendall SL, Hellwege A, Marriot P, Whalley C, Graham IA, Penfield S** (2011) Induction of Dormancy in Arabidopsis Summer Annuals Requires Parallel Regulation of DOG1 and Hormone Metabolism by Low Temperature and CBF Transcription Factors. *Plant Cell* **23** : 2568–2580
- Kerk D, Bulgrien J, Smith DW, Barsam B, Veretnik S, Gribskov M** (2002) The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of Arabidopsis. *Plant Physiol* **129**: 908–25
- Kharenko OA, Choudhary P, Loewen MC** (2013) Abscisic acid binds to recombinant Arabidopsis thaliana G-protein coupled receptor-type G-protein 1 in Sacaromycese cerevisiae and in vitro. *Plant Physiol Biochem* **68**: 32–6
- Kim BC, Soh MC, Kang BJ, Furuya M, Nam HG** (1996) Two dominant photomorphogenic mutations of Arabidopsis thaliana identified as suppressor mutations of hy2. *Plant J* **9**: 441–56
- Kim SY, Ma J, Perret P, Li Z, Thomas TL** (2002) Arabidopsis ABI5 subfamily members have distinct DNA-binding and transcriptional activities. *Plant Physiol* **130**: 688–97
- Kim W, Lee Y, Park J, Lee N, Choi G** (2013) HONSU, a protein phosphatase 2C, regulates seed dormancy by inhibiting ABA signaling in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **54**: 555–72
- Kizis D, Pagès M** (2002) Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in rab17 regulation through the drought-responsive element in an ABA-dependent pathway. *Plant J* **30**: 679–89
- Kleinboelting N, Huet G, Kloetgen A, Viehoveer P, Weisshaar B** (2012) GABI-Kat SimpleSearch: new features of the Arabidopsis thaliana T-DNA mutant database. *Nucleic Acids Res* **40**: D1211–5
- Kline KG, Barrett-Wilt GA, Sussman MR** (2010) In planta changes in protein phosphorylation induced by the plant hormone abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 15986–91
- Knauss S, Rohrmeier T, Lehle L** (2003) The auxin-induced maize gene ZmSAUR2 encodes a short-lived nuclear protein expressed in elongating tissues. *J Biol Chem* **278**: 23936–43
- Kobayashi Y, Murata M, Minami H, Yamamoto S, Kagaya Y, Hobo T, Yamamoto A, Hattori T** (2005) Abscisic acid-activated SNRK2 protein kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element-binding factors. *Plant J* **44**: 939–49
- Kong Y, Zhu Y, Gao C, She W, Lin W, Chen Y, Han N, Bian H, Zhu M, Wang J** (2013) Tissue-specific expression of SMALL AUXIN UP RNA41 differentially regulates cell expansion and root meristem patterning in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **54**: 609–21
- Koornneef M, Bentsink L, Hilhorst H** (2002) Seed dormancy and germination. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 33–6
- Koornneef M, Dellaert LW, van der Veen JH** (1982) EMS- and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *Mutat Res* **93**: 109–23
- Koornneef M, Reuling G, Karssen CM** (1984) The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of Arabidopsis thaliana. *Physiol Plant* **61**: 377–383
- Krock B, Schmidt S, Hertweck C, Baldwin IT** (2002) Vegetation-derived abscisic acid and four terpenes enforce dormancy in seeds of the post-fire annual, *Nicotiana attenuata*. *Seed Sci Res* **12**: 239–252
- Kucera B, Cohn MA, Leubner-Metzger G** (2005) Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Sci Res* **15**: 281–307

- Kushiro T, Okamoto M, Nakabayashi K, Yamagishi K, Kitamura S, Asami T, Hirai N, Koshiba T, Kamiya Y, Nambara E** (2004) The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *EMBO J* **23**: 1647–56
- Laby RJ, Kincaid MS, Kim D, Gibson SI** (2000) The Arabidopsis sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. *Plant J* **23**: 587–596
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685
- Lascano R, Muñoz N, Robert G, Rodriguez, Marianela Melchiorre M, Trippi V, Quero G** (2012) Paraquat: An Oxidative Stress Inducer. *Herbic - Prop Synth Control Weeds*. doi: DOI: 10.5772/32590.
- Lederberg EM, Cohen SN** (1974) Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* **119**: 1072–1074
- Lee KP, Piskurewicz U, Tureckova V, Carat S, Chappuis R, Strnad M, Fankhauser C, Lopez-Molina L** (2012) Spatially and genetically distinct control of seed germination by phytochromes A and B. *Genes Dev* **26**: 1984–1996
- Lee KP, Piskurewicz U, Turecková V, Strnad M, Lopez-Molina L** (2010) A seed coat bedding assay shows that RGL2-dependent release of abscisic acid by the endosperm controls embryo growth in Arabidopsis dormant seeds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 19108–13
- Lee S-H, Ahsan N, Lee K-W, Kim D-H, Lee D-G, Kwak S-S, Kwon S-Y, Kim T-H, Lee B-H** (2007) Simultaneous overexpression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses. *J Plant Physiol* **164**: 1626–38
- Lee Y, Assmann SM** (1991) Diacylglycerols induce both ion pumping in patch-clamped guard-cell protoplasts and opening of intact stomata. *Proc Natl Acad Sci* **88**: 2127–2131
- Lefebvre V, North H, Frey A, Sotta B, Seo M, Okamoto M, Nambara E, Marion-Poll A** (2006) Functional analysis of Arabidopsis *NCED6* and *NCED9* genes indicates that ABA synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed dormancy. *Plant J* **45**: 309–19
- 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**: 655–61
- Leubner-Metzger G** (2001) Brassinosteroids and gibberellins promote tobacco seed germination by distinct pathways. *Planta* **213**: 758–63
- Leubner-Metzger G** (2005) beta-1,3-Glucanase gene expression in low-hydrated seeds as a mechanism for dormancy release during tobacco after-ripening. *Plant J* **41**: 133–45
- 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**: 1448–52
- Leung J, Giraudat J** (1998) ABSCISIC ACID SIGNAL TRANSDUCTION. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 199–222
- 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**: 759–71
- Leymarie J, Bruneaux E, Gibot-Leclerc S, Corbineau F** (2007) Identification of transcripts potentially involved in barley seed germination and dormancy using cDNA-AFLP. *J Exp Bot* **58**: 425–37

- Leymarie J, Vitkauskaité G, Hoang HH, Gendreau E, Chazoule V, Meimoun P, Corbineau F, El-Maarouf-Bouteau H, Bailly C** (2012) Role of reactive oxygen species in the regulation of Arabidopsis seed dormancy. *Plant Cell Physiol* **53**: 96–106
- Li B, Foley ME** (1997) Genetic and molecular control of seed dormancy. *Trends Plant Sci* **2**: 384–389
- Li H, Sun J, Xu Y, Jiang H, Wu X, Li C** (2007) The bHLH-type transcription factor AtAIB positively regulates ABA response in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **65**: 655–65
- Li J, Nam KH, Vafeados D, Chory J** (2001) BIN2, a new brassinosteroid-insensitive locus in Arabidopsis. *Plant Physiol* **127**: 14–22
- Lim CW, Luan S, Lee SC** (2014) A Prominent Role for RCAR3-Mediated ABA Signaling in Response to *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 Infection in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **55**: 1691–1703
- Lin Z, Zhong S, Grierson D** (2009) Recent advances in ethylene research. *J Exp Bot* **60**: 3311–36
- Linkies A, Leubner-Metzger G** (2012) Beyond gibberellins and abscisic acid: how ethylene and jasmonates control seed germination. *Plant Cell Rep* **31**: 253–70
- Linkies A, Müller K, Morris K, Turecková V, Wenk M, Cadman CSC, Corbineau F, Strnad M, Lynn JR, Finch-Savage WE, et al** (2009) Ethylene interacts with abscisic acid to regulate endosperm rupture during germination: a comparative approach using *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **21**: 3803–22
- Liu H, Stone SL** (2013) Cytoplasmic degradation of the Arabidopsis transcription factor abscisic acid insensitive 5 is mediated by the RING-type E3 ligase KEEP ON GOING. *J Biol Chem* **288**: 20267–79
- Liu J, Wilson TE, Milbrandt J, Johnston M** (1993) Identifying DNA-Binding Sites and Analyzing DNA-Binding Domains Using a Yeast Selection System. *Methods* **5**: 125–137
- Liu P-P, Koizuka N, Homrichhausen TM, Hewitt JR, Martin RC, Nonogaki H** (2005a) Large-scale screening of Arabidopsis enhancer-trap lines for seed germination-associated genes. *Plant J* **41**: 936–44
- Liu P-P, Montgomery TA, Fahlgren N, Kasschau KD, Nonogaki H, Carrington JC** (2007) Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages. *Plant J* **52**: 133–46
- Liu PP, Koizuka N, Homrichhausen TM, Hewitt JR, Martin RC, Nonogaki H** (2005b) Large-scale screening of Arabidopsis enhancer-trap lines for seed germination-associated genes. *Plant J* **41**: 936–944
- Liu X, Zhang H, Zhao Y, Feng Z, Li Q, Yang H-Q, Luan S, Li J, He Z-H** (2013) Auxin controls seed dormancy through stimulation of abscisic acid signaling by inducing ARF-mediated ABI3 activation in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 15485–90
- Liu Y, Zhang J** (2009) Rapid accumulation of NO regulates ABA catabolism and seed dormancy during imbibition in Arabidopsis. *Plant Signal Behav* **4**: 905–7
- Liu Y, Zhang S** (2004) Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 3386–99
- Liu Z-Q, Yan L, Wu Z, Mei C, Lu K, Yu Y-T, Liang S, Zhang X-F, Wang X-F, Zhang D-P** (2012) Cooperation of three WRKY-domain transcription factors WRKY18, WRKY40, and WRKY60 in repressing two ABA-responsive genes ABI4 and ABI5 in Arabidopsis. *J Exp Bot* **63**: 6371–6392
- Lopez-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 U S A* **98**: 4782–7

- Lopez-Molina L, Mongrand S, Kinoshita N, Chua N-H** (2003) AFP is a novel negative regulator of ABA signaling that promotes ABI5 protein degradation. *Genes Dev* **17**: 410–8
- Lorenzo O, Nicolás C, Nicolás G, Rodríguez D** (2002) 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
- 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**: 1949–56
- Luan S** (2003) Protein phosphatases in plants. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 63–92
- Luan S** (2009) The CBL-CIPK network in plant calcium signaling. *Trends Plant Sci* **14**: 37–42
- 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**: 1064–8
- Manz B, Müller K, Kucera B, Volke F, Leubner-Metzger G** (2005) Water uptake and distribution in germinating tobacco seeds investigated in vivo by nuclear magnetic resonance imaging. *Plant Physiol* **138**: 1538–51
- Markakis MN, Boron AK, Van Loock B, Saini K, Cirera S, Verbelen J-PP, Vissenberg K** (2013) Characterization of a Small Auxin-Up RNA (SAUR)-Like Gene Involved in *Arabidopsis thaliana* Development. *PLoS One* **8**: e82596
- Martin K, Kopperud K, Chakrabarty R, Banerjee R, Brooks R, Goodin MM** (2009) Transient expression in *Nicotiana benthamiana* fluorescent marker lines provides enhanced definition of protein localization, movement and interactions in planta. *Plant J* **59**: 150–162
- Martin R, Pluskota W, Nonogaki H** (2010a) Seed Germination. *Plant Dev. Biol. - Biotechnol. Perspect.*
- Martin RC, Liu P-P, Goloviznina NA, Nonogaki H** (2010b) microRNA, seeds, and Darwin?: diverse function of miRNA in seed biology and plant responses to stress. *J Exp Bot* **61**: 2229–34
- Matakiadis T, Alboresi A, Jikumaru Y, Tatematsu K, Pichon O, Renou J-P, Kamiya Y, Nambara E, Truong H-N** (2009) The *Arabidopsis* abscisic acid catabolic gene CYP707A2 plays a key role in nitrate control of seed dormancy. *Plant Physiol* **149**: 949–60
- Matilla AJ, Matilla-Vázquez MA** (2008) Involvement of ethylene in seed physiology. *Plant Sci* **175**: 87–97
- Matsui A, Ishida J, Morosawa T, Mochizuki Y, Kaminuma E, Endo TA, Okamoto M, Nambara E, Nakajima M, Kawashima M, et al** (2008) *Arabidopsis* transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array. *Plant Cell Physiol* **49**: 1135–49
- Maurel C, Verdoucq L, Luu D-T, Santoni V** (2008) Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 595–624
- McCarty DR** (1995) Genetic Control and Integration of Maturation and Germination Pathways in Seed Development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **46**: 71–93
- Mei C, Jiang S-C, Lu Y-F, Wu F-Q, Yu Y-T, Liang S, Feng X-J, Portoles Comeras S, Lu K, Wu Z, et al** (2014) *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat protein SOAR1 plays a critical role in abscisic acid signalling. *J Exp Bot* **65**: 5317–30
- Meierhoff K, Felder S, Nakamura T, Bechtold N, Schuster G** (2003) HCF152, an *Arabidopsis* RNA binding pentatricopeptide repeat protein involved in the processing of chloroplast psbB-psbT-psbH-petB-petD RNAs. *Plant Cell* **15**: 1480–95
- Meinhard M, Rodríguez PL, Grill E** (2002) The sensitivity of ABI2 to hydrogen peroxide links the abscisic acid-response regulator to redox signalling. *Planta* **214**: 775–82

- Meinke D, Muralla R, Sweeney C, Dickerman A** (2008) Identifying essential genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trends Plant Sci* **13**: 483–91
- Melcher K, Ng L-M, Zhou XE, Soon F-F, Xu Y, Suino-Powell KM, Park S-Y, Weiner JJ, Fujii H, Chinnusamy V, et al** (2009) A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature* **462**: 602–8
- Melchiorre M, Robert G, Trippi V, Racca R, Lascano HR** (2009) Superoxide dismutase and glutathione reductase overexpression in wheat protoplast: photooxidative stress tolerance and changes in cellular redox state. *Plant Growth Regul* **57**: 57–68
- Menges M, Hennig L, Gruissem W, Murray JAH** (2002) Cell cycle-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **277**: 41987–2002
- 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
- Meskiene I, Bogre L, Glaser W, Balog J, Brandstotter M, Zwerger K, Ammerer G, Hirt H** (1998) MP2C, a plant protein phosphatase 2C, functions as a negative regulator of mitogen-activated protein kinase pathways in yeast and plants. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 1938–1943
- Meyer K, Leube MP, Grill E** (1994) A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **264**: 1452–5
- Miki T, Park JA, Nagao K, Murayama N, Horiuchi T** (1992) Control of segregation of chromosomal DNA by sex factor F in *Escherichia coli*. Mutants of DNA gyrase subunit A suppress letD (ccdB) product growth inhibition. *J Mol Biol* **225**: 39–52
- Millar AA, Jacobsen J V, Ross JJ, Helliwell CA, Poole AT, Scofield G, Reid JB, Gubler F** (2006) Seed dormancy and ABA metabolism in *Arabidopsis* and barley: the role of ABA 8'-hydroxylase. *Plant J* **45**: 942–54
- Miyazono K-I, Miyakawa T, Sawano Y, Kubota K, Kang H-J, Asano A, Miyauchi Y, Takahashi M, Zhi Y, Fujita Y, et al** (2009) Structural basis of abscisic acid signalling. *Nature* **462**: 609–14
- Moorhead GBG, De Wever V, Templeton G, Kerk D** (2009) Evolution of protein phosphatases in plants and animals. *Biochem J* **417**: 401–9
- Moriwaki T, Miyazawa Y, Fujii N, Takahashi H** (2012) Light and abscisic acid signalling are integrated by MIZ1 gene expression and regulate hydrotropic response in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* **35**: 1359–68
- Müller AH, Hansson M** (2009) The barley magnesium chelatase 150-kd subunit is not an abscisic acid receptor. *Plant Physiol* **150**: 157–66
- Mullis KB, Faloona FA** (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzym* **155**: 335–350
- Murashige T, Skoog F** (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* **15**: 473–497
- Nakaminami K, Sawada Y, Suzuki M, Kenmoku H, Kawaide H, Mitsuhashi W, Sassa T, Inoue Y, Kamiya Y, Toyomasu T** (2003) Deactivation of gibberellin by 2-oxidation during germination of photoblastic lettuce seeds. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**: 1551–8
- Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K** (2009) Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant Physiol* **149**: 88–95
- Nambara E, Marion-Poll A** (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol* **56**: 165–85
- Narusaka Y, Nakashima K, Shinwari ZK, Sakuma Y, Furihata T, Abe H, Narusaka M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2003) Interaction between two cis-acting elements,

- ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of Arabidopsis rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *Plant J* **34**: 137–48
- Nemhauser JL, Hong F, Chory J** (2006) Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell* **126**: 467–75
- Nikolaeva M.** (1967) Fiziologiya glubokogo pokoyasemyan (Physiology of deep dormancy in seeds). *Nauk.* (Translated from Russ. to English in 1969 by Z. Shapiro, Natl. Sci. Found. DC)
- Nikoleava MG** (2004) On criteria to use in studies of seed evolution. *Seed Sci Res* **14**: 215–320
- Nishimura N, Hitomi K, Arvai AS, Rambo RP, Hitomi C, Cutler SR, Schroeder JI, Getzoff ED** (2009) Structural mechanism of abscisic acid binding and signaling by dimeric PYR1. *Science* **326**: 1373–9
- Nonogaki H, Bassel GW, Bewley JD** (2010) Germination—Still a mystery. *Plant Sci* **179**: 574–581
- Nonogaki H, Bradford K** (2007) Seed Development, Dormancy and Germination. *Annual Plant Reviews*, Volume 27. Wiley-Blackwell
- Ogawa M, Hanada A, Yamauchi Y, Kuwahara A, Kamiya Y, Yamaguchi S** (2003) Gibberellin Biosynthesis and Response during Arabidopsis Seed Germination. *Plant Cell* **15**: 1591–1604
- Oh E, Yamaguchi S, Hu J, Yusuke J, Jung B, Paik I, Lee H-S, Sun T, Kamiya Y, Choi G** (2007) PIL5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the GAI and RGA promoters in Arabidopsis seeds. *Plant Cell* **19**: 1192–208
- Oh E, Yamaguchi S, Kamiya Y, Bae G, Chung W-I, Choi G** (2006) Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in Arabidopsis. *Plant J* **47**: 124–39
- Okamoto M, Kuwahara A, Seo M, Kushiro T, Asami T, Hirai N, Kamiya Y, Koshiba T, Nambara E** (2006) CYP707A1 and CYP707A2, which encode abscisic acid 8'-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in Arabidopsis. *Plant Physiol* **141**: 97–107
- Oliveros JC** (2007) FIESTA@BioinfoGP. An interactive server for analyzing DNA microarray experiments with replicates. <http://bioinfoGP.cnb.csic.es/tools/FIESTA>
- Pandey S, Nelson DC, Assmann SM** (2009) Two novel GPCR-type G proteins are abscisic acid receptors in Arabidopsis. *Cell* **136**: 136–48
- Paponov I a, Paponov M, Teale W, Menges M, Chakrabortee S, Murray J a H, Palme K** (2008a) Comprehensive transcriptome analysis of auxin responses in Arabidopsis. *Mol Plant* **1**: 321–37
- Paponov I a, Paponov M, Teale W, Menges M, Chakrabortee S, Murray J a H, Palme K** (2008b) Comprehensive transcriptome analysis of auxin responses in Arabidopsis. *Mol Plant* **1**: 321–37
- Park J-EYE, Kim Y-SS, Yoon H-KK, Park C-MM** (2007) Functional characterization of a small auxin-up RNA gene in apical hook development in Arabidopsis. *Plant Sci* **172**: 150–157
- Park S-Y, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow T-FF, et al** (2009) Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* (80-) **324**: 1068–71
- Park S-Y, Ryu S-H, Jang I-C, Kwon S-Y, Kim J-G, Kwak S-S** (2004) Molecular cloning of a cytosolic ascorbate peroxidase cDNA from cell cultures of sweet potato and its expression in response to stress. *Mol Genet Genomics* **271**: 339–46
- Paulsen TR, Colville L, Kranner I, Daws MI, Högestedt G, Vandvik V, Thompson K** (2013) Physical dormancy in seeds: a game of hide and seek? *New Phytol* **198**: 496–503

- Pauwels L, Barbero GF, Geerinck J, Tilleman S, Grunewald W, Pérez AC, Chico JM, Bossche R Vanden, Sewell J, Gil E, et al** (2010) NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature* **464**: 788–91
- Penfield S, Josse E-M, Kannangara R, Gilday AD, Halliday KJ, Graham IA** (2005) Cold and light control seed germination through the bHLH transcription factor SPATULA. *Curr Biol* **15**: 1998–2006
- Penfield S, Li Y, Gilday AD, Graham S, Graham IA** (2006) Arabidopsis ABA INSENSITIVE4 regulates lipid mobilization in the embryo and reveals repression of seed germination by the endosperm. *Plant Cell* **18**: 1887–99
- Pickett FB, Wilson AK, Estelle M** (1990) The aux1 Mutation of Arabidopsis Confers Both Auxin and Ethylene Resistance. *Plant Physiol* **94**: 1462–6
- Piskurewicz U, Jikumaru Y, Kinoshita N, Nambara E, Kamiya Y, Lopez-Molina L** (2008) The gibberellic acid signaling repressor RGL2 inhibits Arabidopsis seed germination by stimulating abscisic acid synthesis and ABI5 activity. *Plant Cell* **20**: 2729–45
- Prashanth SR, Sadhasivam V, Parida A** (2008) Over expression of cytosolic copper/zinc superoxide dismutase from a mangrove plant *Avicennia marina* in indica rice var Pusa Basmati-1 confers abiotic stress tolerance. *Transgenic Res* **17**: 281–91
- Price J, Li T-C, Kang SG, Na JK, Jang J-C** (2003) Mechanisms of glucose signaling during germination of Arabidopsis. *Plant Physiol* **132**: 1424–38
- Pritchard SL, Charlton WL, Baker A, Graham IA** (2002) Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in Arabidopsis. *Plant J* **31**: 639–47
- Probert RJ** (2000) The role of temperature in germination ecophysiology. *In* M Fenner, ed, *Seeds – Ecol. Regen. plant communities*. Wallingford: CAB International, pp 261–292
- Qin F, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2011) Achievements and Challenges in Understanding Plant Abiotic Stress Responses and Tolerance. *Plant Cell Physiol* **52**: 1569–1582
- Quesada V, Ponce MR, Micol JL** (2000) Genetic analysis of salt-tolerant mutants in Arabidopsis thaliana. *Genetics* **154**: 421–36
- Rajjou L, Gallardo K, Debeaujon I, Vandekerckhove J, Job C, Job D** (2004) The effect of alpha-amanitin on the Arabidopsis seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. *Plant Physiol* **134**: 1598–613
- Rayle DL, Cleland RE** (1992) The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol* **99**: 1271–4
- Reeves WM, Lynch TJ, Mobin R, Finkelstein RR** (2011) Direct targets of the transcription factors ABA-Insensitive(ABI)4 and ABI5 reveal synergistic action by ABI4 and several bZIP ABA response factors. *Plant Mol Biol* **75**: 347–63
- Renart J, Reiser J, Stark GR** (1979) Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 3116–3120
- Reyes D, Rodríguez D, Nicolás G, Nicolás C** (2006) Evidence of a role for tyrosine dephosphorylation in the control of postgermination arrest of development by abscisic acid in Arabidopsis thaliana L. *Planta* **223**: 381–5
- Rieu I, Eriksson S, Powers SJ, Gong F, Griffiths J, Woolley L, Benloch R, Nilsson O, Thomas SG, Hedden P, et al** (2008) Genetic analysis reveals that C19-GA 2-oxidation is a major gibberellin inactivation pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**: 2420–36
- Rodrigues A, Adamo M, Crozet P, Margalha L, Confraria A, Martinho C, Elias A, Rabissi A, Lumberras V, González-Guzmán M, et al** (2013) ABI1 and PP2CA phosphatases are

- negative regulators of Snf1-related protein kinase1 signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 3871–84
- Rodriguez PL** (1998) Protein phosphatase 2C (PP2C) function in higher plants. *Plant Mol Biol* **38**: 919–927
- Rodriguez PL, Benning G, Grill E** (1998a) ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *FEBS Lett* **421**: 185–90
- Rodriguez 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**: 879–83
- Roig-Villanova I, Bou-Torrent J, Galstyan A, Carretero-Paulet L, Portolés S, Rodríguez-Concepción M, Martínez-García JF** (2007) Interaction of shade avoidance and auxin responses: a role for two novel atypical bHLH proteins. *EMBO J* **26**: 4756–67
- Rual J-F, Venkatesan K, Hao T, Hirozane-Kishikawa T, Dricot A, Li N, Berriz GF, Gibbons FD, Dreze M, Ayivi-Guedehoussou N, et al** (2005) Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* **437**: 1173–8
- Rubio S, Rodrigues A, Saez A, Dizon MB, Galle A, Kim T-H, Santiago J, Flexas J, Schroeder JI, Rodriguez PL** (2009) Triple loss of function of protein phosphatases type 2C leads to partial constitutive response to endogenous abscisic acid. *Plant Physiol* **150**: 1345–55
- Rzewuski G, Sauter M** (2008) Ethylene biosynthesis and signaling in rice. *Plant Sci* **175**: 32–42
- Saavedra X, Modrego A, Rodríguez D, González-García MP, Sanz L, Nicolás G, Lorenzo O** (2010) The nuclear interactor PYL8/RCAR3 of *Fagus sylvatica* FsPP2C1 is a positive regulator of abscisic acid signaling in seeds and stress. *Plant Physiol* **152**: 133–50
- Saez A, Apostolova N, Gonzalez-Guzman M, Gonzalez-Garcia MP, Nicolas C, Lorenzo O, Rodriguez 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
- Saez A, Robert N, Maktabi MH, Schroeder JI, Serrano R, Rodriguez 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**: 1389–99
- Saez 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 ONLINE* **20**: 2972–2988
- Saitou N, Nei M** (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406–25
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*.
- 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
- Santos-Mendoza M, Dubreucq B, Baud S, Parcy F, Caboche M, Lepiniec L** (2008) Deciphering gene regulatory networks that control seed development and maturation in Arabidopsis. *Plant J* **54**: 608–20
- Sawada H, Ieki H, Oyaizu H, Matsumoto S** (1993) Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. *Int J Syst Bacteriol* **43**: 694–702
- Scheibe J, Lang A** (1969) Lettuce seed germination: effects of high temperature and of repeated far-red treatment in relation to phytochrome. *Photochem Photobiol* **9**: 143–150

- Schiestl RH, Gietz RD** (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* **16**: 339–346
- Schopfer P, Plachy C** (1984) Control of Seed Germination by Abscisic Acid: II. Effect on Embryo Water Uptake in *Brassica napus* L. *Plant Physiol* **76**: 155–60
- Schwartz A, Wu WH, Tucker EB, Assmann SM** (1994) Inhibition of inward K⁺ channels and stomatal response by abscisic acid: an intracellular locus of phytohormone action. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 4019–23
- Schwartz SH, Tan BC, Gage DA, Zeevaart JA, McCarty DR** (1997) Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* **276**: 1872–4
- Schweighofer A, Hirt H, Meskiene I** (2004) Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci* **9**: 236–43
- Schweighofer A, Kazanaviciute V, Scheikl E, Teige M, Doczi R, Hirt H, Schwanninger M, Kant M, Schuurink R, Mauch F, et al** (2007) The PP2C-type phosphatase AP2C1, which negatively regulates MPK4 and MPK6, modulates innate immunity, jasmonic acid, and ethylene levels in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 2213–24
- Schweighofer A, Shubchynskyy V, Kazanaviciute V, Djamei A, Meskiene I** (2014) Bimolecular fluorescent complementation (BiFC) by MAP kinases and MAPK phosphatases. *Methods Mol Biol* **1171**: 147–58
- Sechet J, Roux C, Plessis A, Effroy D, Frey A, Perreau F, Biniek C, Krieger-Liszkay A, Macherel D, North HM, et al** (2015) The ABA-deficiency suppressor locus HAS2 encodes the PPR protein LOI1/MEF11 involved in mitochondrial RNA editing. *Mol Plant* **8**: 644–56
- Seki M, Ishida J, Narusaka M, Fujita M, Nanjo T, Umezawa T, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, et al** (2002) Monitoring the expression pattern of around 7,000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. *Funct Integr Genomics* **2**: 282–91
- Selote D, Samira R, Matthiadis A, Gillikin JW, Long TA** (2015) Iron-binding E3 ligase mediates iron response in plants by targeting basic helix-loop-helix transcription factors. *Plant Physiol* **167**: 273–86
- Seo M, Akaba S, Oritani T, Delarue M, Bellini C, Caboche M, Koshiba T** (1998) Higher activity of an aldehyde oxidase in the auxin-overproducing superroot1 mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **116**: 687–93
- Seo M, Nambara E, Choi G, Yamaguchi S** (2009) Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. *Plant Mol Biol* **69**: 463–72
- Sessions A, Burke E, Presting G, Aux G, McElver J, Patton D, Dietrich B, Ho P, Bacwaden J, Ko C, et al** (2002) A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system. *Plant Cell* **14**: 2985–2994
- Shang Y, Yan L, Liu Z-Q, Cao Z, Mei C, Xin Q, Wu F-Q, Wang X-F, Du S-Y, Jiang T, et al** (2010) The Mg-Chelatase H Subunit of *Arabidopsis* Antagonizes a Group of WRKY Transcription Repressors to Relieve ABA-Responsive Genes of Inhibition. *Plant Cell* **22**: 1909–1935
- Shatil-Cohen A, Attia Z, Moshelion M** (2011) Bundle-sheath cell regulation of xylem-mesophyll water transport via aquaporins under drought stress: a target of xylem-borne ABA? *Plant J* **67**: 72–80
- Sheen J** (1998) Mutational analysis of protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in higher plants. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 975–980
- Shen Y-Y, Wang X-F, Wu F-Q, Du S-Y, Cao Z, Shang Y, Wang X-L, Peng C-C, Yu X-C, Zhu S-Y, et al** (2006) The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* **443**: 823–6

- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y** (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* **59**: 223–239
- Shu K, Zhang H, Wang S, Chen M, Wu Y, Tang S, Liu C, Feng Y, Cao X, Xie Q** (2013) ABI4 Regulates Primary Seed Dormancy by Regulating the Biogenesis of Abscisic Acid and Gibberellins in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* **9**: e1003577
- Siegel RS, Xue S, Murata Y, Yang Y, Nishimura N, Wang A, Schroeder JI** (2009) Calcium elevation-dependent and attenuated resting calcium-dependent abscisic acid induction of stomatal closure and abscisic acid-induced enhancement of calcium sensitivities of S-type anion and inward-rectifying K channels in *Arabidopsis* guard cells. *Plant J* **59**: 207–20
- Singh A, Pandey GK** (2012) Protein phosphatases: a genomic outlook to understand their function in plants. *J Plant Biochem Biotechnol* **21**: 100–107
- Sliwinska E** (2009) Nuclear DNA replication and seed quality. *Seed Sci Res* **19**: 15–25
- Small ID, Peeters N** (2000) The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem Sci* **25**: 46–7
- Smalle J, Haegman M, Kurepa J, Van Montagu M, Straeten D V** (1997) Ethylene can stimulate *Arabidopsis* hypocotyl elongation in the light. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 2756–61
- Smékalová V, Luptovčíak I, Komis G, Šamajová O, Ovečka M, Doskočilová A, Takáč T, Vadovič P, Novák O, Pechan T, et al** (2014) Involvement of YODA and mitogen activated protein kinase 6 in *Arabidopsis* post-embryogenic root development through auxin up-regulation and cell division plane orientation. *New Phytol* **203**: 1175–93
- Sondheimer E, Tzou DS, Galson EC** (1968) Abscisic Acid Levels and Seed Dormancy. *Plant Physiol* **43**: 1443–1447
- Song S-K, Clark SE** (2005) POL and related phosphatases are dosage-sensitive regulators of meristem and organ development in *Arabidopsis*. *Dev Biol* **285**: 272–84
- Song S-K, Hofhuis H, Lee MM, Clark SE** (2008) Key divisions in the early *Arabidopsis* embryo require POL and PLL1 phosphatases to establish the root stem cell organizer and vascular axis. *Dev Cell* **15**: 98–109
- Soon F-F, Ng L-M, Zhou XE, West GM, Kovach A, Tan MHE, Suino-Powell KM, He Y, Xu Y, Chalmers MJ, et al** (2012) Molecular mimicry regulates ABA signaling by SnRK2 kinases and PP2C phosphatases. *Science* **335**: 85–8
- Spartz AK, Lee SH, Wenger JP, Gonzalez N, Itoh H, Inzé D, Peer W a, Murphy AS, Overvoorde PJ, Gray WM** (2012) The SAUR19 subfamily of SMALL AUXIN UP RNA genes promote cell expansion. *Plant J* **70**: 978–90
- Spartz AK, Ren H, Park MY, Grandt KN, Lee SH, Murphy AS, Sussman MR, Overvoorde PJ, Gray WM** (2014) SAUR Inhibition of PP2C-D Phosphatases Activates Plasma Membrane H⁺-ATPases to Promote Cell Expansion in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. doi: 10.1105/tpc.114.126037
- Stamm P, Kumar PP** (2013) Auxin and gibberellin responsive *Arabidopsis* SMALL AUXIN UP RNA36 regulates hypocotyl elongation in the light. *Plant Cell Rep* **32**: 759–69
- Steber CM, Cooney SE, McCourt P** (1998) Isolation of the GA-response mutant *sly1* as a suppressor of *ABI1-1* in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **149**: 509–21
- Steber CM, McCourt P** (2001) A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **125**: 763–9
- Stelzl U, Worm U, Lalowski M, Haenig C, Brembeck FH, Goehler H, Stroedicke M, Zenkner M, Schoenherr A, Koeppen S, et al** (2005) A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell* **122**: 957–68

- Stepanova AN, Alonso JM** (2009) Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 548–55
- Studier FW, Moffatt BA** (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113–130
- Sugimoto H, Kondo S, Tanaka T, Imamura C, Muramoto N, Hattori E, Ogawa K, Mitsukawa N, Ohto C** (2014) Overexpression of a novel Arabidopsis PP2C isoform, AtPP2CF1, enhances plant biomass production by increasing inflorescence stem growth. *J Exp Bot* **65**: 5385–400
- Sung T-Y, Tseng C-C, Hsieh M-H** (2010) The SLO1 PPR protein is required for RNA editing at multiple sites with similar upstream sequences in Arabidopsis mitochondria. *Plant J* **63**: 499–511
- Takahashi K, Hayashi K, Kinoshita T** (2012) Auxin activates the plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation during hypocotyl elongation in Arabidopsis. *Plant Physiol* **159**: 632–41
- Takezawa D** (2003) Characterization of a novel plant PP2C-like protein Ser/Thr phosphatase as a calmodulin-binding protein. *J Biol Chem* **278**: 38076–83
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S** (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**: 2725–9
- Thomas SG, Rieu I, Steber CM** (2005) Gibberellin metabolism and signaling. *Vitam Horm* **72**: 289–338
- Tian Q, Reed JW** (1999) Control of auxin-regulated root development by the Arabidopsis thaliana SHY2/IAA3 gene. *Development* **126**: 711–21
- Totterdell S, Roberts EH** (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
- Totterdell S, Roberts EH** (1979) Effects of low temperatures on the loss of innate dormancy and the development of induced dormancy in seeds of *Rumex obtusifolius* L. and *Rumex crispus* L. *Plant, Cell Environ* **2**: 131–137
- Tovar-Mendez A, Miernyk JA, Hoyos E, Randall DD** (2014) A functional genomic analysis of Arabidopsis thaliana PP2C clade D. *Protoplasma* **251**: 265–71
- Tsuzuki T, Takahashi K, Inoue S, Okigaki Y, Tomiyama M, Hossain MA, Shimazaki K, Murata Y, Kinoshita T** (2011) Mg-chelatase H subunit affects ABA signaling in stomatal guard cells, but is not an ABA receptor in Arabidopsis thaliana. *J Plant Res* **124**: 527–38
- Turner SR, Cook A, Baskin JM, Baskin CC, Tuckett RE, Steadman KJ, Dixon KW** (2009) Identification and characterization of the water gap in the physically dormant seeds of *Dodonaea petiolaris*: a first report for Sapindaceae. *Ann Bot* **104**: 833–44
- Tyler L, Thomas SG, Hu J, Dill A, Alonso JM, Ecker JR, Sun T-P** (2004) DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in Arabidopsis. *Plant Physiol* **135**: 1008–19
- Uetz P, Giot L, Cagney G, Mansfield TA, Judson RS, Knight JR, Lockshon D, Narayan V, Srinivasan M, Pochart P, et al** (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **403**: 623–7
- Uhrig RG, Kerk D, Moorhead GB** (2013) Evolution of bacterial-like phosphoprotein phosphatases in photosynthetic eukaryotes features ancestral mitochondrial or archaeal origin and possible lateral gene transfer. *Plant Physiol* **163**: 1829–43
- Umezawa T, Nakashima K, Miyakawa T, Kuromori T, Tanokura M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2010) Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. *Plant Cell Physiol* **51**: 1821–39

- Umezawa T, Sugiyama N, Mizoguchi M, Hayashi S, Myouga F, Yamaguchi-Shinozaki K, Ishihama Y, Hirayama T, Shinozaki K** (2009) Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 17588–93
- Uraji M, Katagiri T, Okuma E, Ye W, Hossain MA, Masuda C, Miura A, Nakamura Y, Mori IC, Shinozaki K, et al** (2012) Cooperative Function of PLD and PLD 1 in Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure in Arabidopsis. *Plant Physiol* **159**: 450–460
- Vandenbussche F, Pierik R, Millenaar FF, Voeselek LACJ, Van Der Straeten D** (2005) Reaching out of the shade. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 462–8
- Vanneste S, Friml J** (2009) Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* **136**: 1005–16
- Varbanova M, Yamaguchi S, Yang Y, McKelvey K, Hanada A, Borochoy R, Yu F, Jikumaru Y, Ross J, Cortes D, et al** (2007) Methylation of gibberellins by Arabidopsis GAMT1 and GAMT2. *Plant Cell* **19**: 32–45
- Vartanian N, Marcotte L, Giraudat J** (1994) Drought Rhizogenesis in Arabidopsis thaliana (Differential Responses of Hormonal Mutants). *Plant Physiol* **104**: 761–767
- van der Veen R, Heimovaara-Dijkstra S, Wang M** (1992) Cytosolic Alkalinization Mediated by Abscisic Acid Is Necessary, but Not Sufficient, for Abscisic Acid-Induced Gene Expression in Barley Aleurone Protoplasts. *Plant Physiol* **100**: 699–705
- Vilela B, Moreno-Cortes A, Rabissi A, Leung J, Pages M, Lumberras V** (2013) The maize OST1 kinase homolog phosphorylates and regulates the maize SNAC1-type transcription factor. *PLoS One* **8**: e58105
- Visser T** (1956) Chilling and apple seed dormancy. *Proc K Ned Akad Wet, Ser C Biol Med Sci* **59**: 314–324
- Vlad F, Rubio S, Rodrigues A, Sirichandra C, Belin C, Robert N, Leung J, Rodriguez PL, Laurière C, Merlot S** (2009) Protein phosphatases 2C regulate the activation of the Snf1-related kinase OST1 by abscisic acid in Arabidopsis. *Plant Cell*. doi: 10.1105/tpc.109.069179
- Vlad F, Turk BE, Peynot P, Leung J, Merlot S** (2008) A versatile strategy to define the phosphorylation preferences of plant protein kinases and screen for putative substrates. *Plant J* **55**: 104–17
- 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
- Vojtek AB, Hollenberg SM** (1995) Ras-Raf interaction: two-hybrid analysis. *Methods Enzym* **255**: 331–342
- Walhout AJ, Sordella R, Lu X, Hartley JL, Temple GF, Brasch MA, Thierry-Mieg N, Vidal M** (2000) Protein interaction mapping in *C. elegans* using proteins involved in vulval development. *Science* **287**: 116–22
- Wang D, Harper J, Gribskov M** (2003) Systematic Trans-Genomic Comparison of Protein Kinases between Arabidopsis and Saccharomyces cerevisiae. *Plant Physiol* **132**: 2152–2165
- Wang H, Chevalier D, Larue C, Ki Cho S, Walker JC** (2007) The Protein Phosphatases and Protein Kinases of Arabidopsis thaliana. *Arabidopsis Book* **5**: e0106
- Wang KL-C, Li H, Ecker JR** (2002) Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks. *Plant Cell* **14**: S131–151
- Wang X, Wang C, Sang Y, Zheng L, Qin C** (2000) Determining functions of multiple phospholipase Ds in stress response of Arabidopsis. *Biochem Soc Trans* **28**: 813–6
- Wang Y, Li L, Ye T, Zhao S, Liu Z, Feng Y-Q, Wu Y** (2011) Cytokinin antagonizes ABA suppression to seed germination of Arabidopsis by downregulating ABI5 expression. *Plant J* **68**: 249–61

- Wang Z, Zou Y, Li X, Zhang Q, Chen L, Wu H, Su D, Chen Y, Guo J, Luo D, et al** (2006) Cytoplasmic male sterility of rice with boro II cytoplasm is caused by a cytotoxic peptide and is restored by two related PPR motif genes via distinct modes of mRNA silencing. *Plant Cell* **18**: 676–87
- Weinl S, Kudla J** (2009) The CBL-CIPK Ca²⁺-decoding signaling network: function and perspectives. *New Phytol* **184**: 517–28
- Wenzel CL, Marrison J, Mattsson J, Haseloff J, Bougourd SM** (2012) Ectopic divisions in vascular and ground tissues of *Arabidopsis thaliana* result in distinct leaf venation defects. *J Exp Bot* **63**: 5351–5364
- Werner JE, Finkelstein RR** (1995) *Arabidopsis* mutants with reduced response to NaCl and osmotic stress. *Physiol Plant* **93**: 659–666
- Widjaja I, Lassowskat I, Bethke G, Eschen-Lippold L, Long H-H, Naumann K, Dangl JL, Scheel D, Lee J** (2009) A protein phosphatase 2C, responsive to the bacterial effector AvrRpm1 but not to the AvrB effector, regulates defense responses in *Arabidopsis*. *Plant J* **61**: 249–258
- Woodcock DM, Crowther PJ, Doherty J, Jefferson S, DeCruz E, Noyer-Weidner M, Smith SS, Michae I MZ, Graham MW** (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **9**: 3469–3478
- Xi W, Liu C, Hou X, Yu H** (2010) MOTHER OF FT AND TFL1 regulates seed germination through a negative feedback loop modulating ABA signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**: 1733–48
- Xie Z, Zhang Z-L, Zou X, Huang J, Ruas P, Thompson D, Shen QJ** (2005) Annotations and functional analyses of the rice WRKY gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells. *Plant Physiol* **137**: 176–89
- Xing Y, Jia W, Zhang J** (2009) AtMKK1 and AtMPK6 are involved in abscisic acid and sugar signaling in *Arabidopsis* seed germination. *Plant Mol Biol* **70**: 725–36
- Xue B, Zhang A, Jiang M** (2009) Involvement of polyamine oxidase in abscisic acid-induced cytosolic antioxidant defense in leaves of maize. *J Integr Plant Biol* **51**: 225–34
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 781–803
- Yang Y, Costa A, Leonhardt N, Siegel RS, Schroeder JI** (2008) Isolation of a strong *Arabidopsis* guard cell promoter and its potential as a research tool. *Plant Methods* **4**: 6
- Yanofsky MF, Nester EW** (1986) Molecular characterization of a host-range-determining locus from *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **168**: 244–250
- Yin P, Fan H, Hao Q, Yuan X, Wu D, Pang Y, Yan C, Li W, Wang J, Yan N** (2009) Structural insights into the mechanism of abscisic acid signaling by PYL proteins. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 1230–6
- Yoo S-D, Cho Y-H, Tena G, Xiong Y, Sheen J** (2008) Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C2H4 signalling. *Nature* **451**: 789–795
- Yoshida T, Nishimura N, Kitahata N, Kuromori T, Ito T, Asami T, Shinozaki K, Hirayama T** (2006) 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**: 115–26
- Young JM, Kuykendall LD, Martinez-Romero E, Kerr A, Sawada H** (2001) A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as

- new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 89–103
- Yu LP, Miller AK, Clark SE** (2003) POLTERGEIST Encodes a Protein Phosphatase 2C that Regulates CLAVATA Pathways Controlling Stem Cell Identity at Arabidopsis Shoot and Flower Meristems. *Curr Biol* **13**: 179–188
- Yu X-C** (2006) Abscisic Acid Stimulates a Calcium-Dependent Protein Kinase in Grape Berry. *PLANT Physiol* **140**: 558–579
- Zeevaart J** (1999) Abscisic acid metabolism and its regulation. *In* P Hooykaas, M Hall, R Libbenga, eds, *Biochem. Mol. Biol. Plant Horm.* Elsevier Science, Amsterdam, pp 189–207
- Zeller G, Henz SR, Widmer CK, Sachsenberg T, Rättsch G, Weigel D, Laubinger S** (2009) Stress-induced changes in the Arabidopsis thaliana transcriptome analyzed using whole-genome tiling arrays. *Plant J* **58**: 1068–82
- Zeng W, Brutus A, Kremer JM, Withers JC, Gao X, Jones AD, He SY** (2011) A genetic screen reveals Arabidopsis stomatal and/or apoplastic defenses against *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *PLoS Pathog* **7**: e1002291
- Zhang A, Jiang M, Zhang J, Ding H, Xu S, Hu X, Tan M** (2007) Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves. *New Phytol* **175**: 36–50
- Zhang A, Jiang M, Zhang J, Tan M, Hu X** (2006) Mitogen-activated protein kinase is involved in abscisic acid-induced antioxidant defense and acts downstream of reactive oxygen species production in leaves of maize plants. *Plant Physiol* **141**: 475–87
- Zhang J, Li X, He Z, Zhao X, Wang Q, Zhou B, Yu D, Huang X, Tang D, Guo X, et al** (2013) Molecular character of a phosphatase 2C (PP2C) gene relation to stress tolerance in Arabidopsis thaliana. *Mol Biol Rep* **40**: 2633–44
- Zhang S, Cai Z, Wang X** (2009a) The primary signaling outputs of brassinosteroids are regulated by abscisic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 4543–8
- Zhang Y, Zhu H, Zhang Q, Li M, Yan M, Wang R, Wang L, Welti R, Zhang W, Wang X** (2009b) Phospholipase $\alpha 1$ and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**: 2357–77
- Zhao F, Guo S, Zhang H, Zhao Y** (2006a) Expression of yeast SOD2 in transgenic rice results in increased salt tolerance. *Plant Sci* **170**: 216–224
- Zhao F-Y, Wang X-Y, Zhao Y-X, Zhang H** (2006b) [Transferring the Suaeda salsa glutathione S-transferase and catalase genes enhances low temperature stress resistance in transgenic rice seedlings]. *Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao* **32**: 231–8
- Zhao Y, Chan Z, Xing L, Liu X, Hou Y-J, Chinnusamy V, Wang P, Duan C, Zhu J-K** (2013) The unique mode of action of a divergent member of the ABA-receptor protein family in ABA and stress signaling. *Cell Res* **23**: 1380–1395
- Zhou B** (2005) Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in *Stylosanthes guianensis*. *J Exp Bot* **56**: 3223–3228
- Zhou MQ, Shen C, Wu LH, Tang KX, Lin J** (2011) CBF-dependent signaling pathway: a key responder to low temperature stress in plants. *Crit Rev Biotechnol* **31**: 186–92
- Zhu G, Liu Y, Ye N, Liu R, Zhang J** (2011) Involvement of the abscisic acid catabolic gene CYP707A2 in the glucose-induced delay in seed germination and post-germination growth of Arabidopsis. *Physiol Plant* **143**: 375–84
- Zuckermandl E, Pauling L** (1965) Evolutionary divergence and convergence in proteins. *In* V Bryson, HJ Vogel, eds, *Evol. Genes Proteins*. Academic Press, New York, pp 97–166