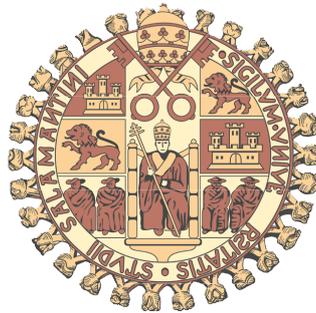


*UNIVERSIDAD DE SALAMANCA*

*FACULTAD DE BIOLOGÍA*

*Departamento de Fisiología Vegetal*



**Caracterización y análisis funcional de dos  
proteínas relacionadas con la regulación  
hormonal de la dormición y germinación de  
semillas de haya.**

**Ana Alonso Ramírez**

**2009**

Dña. **M<sup>a</sup> DOLORES RODRÍGUEZ MARTÍN**, CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA VEGETAL Y **D. CARLOS NICOLÁS RODRÍGUEZ**, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA VEGETAL DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

CERTIFICAMOS:

Que la presente Memoria titulada “Caracterización y análisis funcional de dos proteínas relacionadas con la regulación hormonal de la dormición y germinación de semillas de haya” ha sido realizada en el Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca, bajo nuestra dirección, por la licenciada **Dña. ANA ALONSO RAMÍREZ** y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Para que así conste, firmamos el presente certificado en Salamanca a 9 de Marzo de 2009.

Fdo: Dra. Dña. M<sup>a</sup> Dolores Rodríguez

Dr. D. Carlos Nicolás Rodríguez

**Dña. EMILIA LABRADOR ENCINAS**, CATEDRÁTICA Y DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA VEGETAL DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

CERTIFICO:

Que la presente Memoria titulada “Caracterización y análisis funcional de dos proteínas relacionadas con la regulación hormonal de la dormición y germinación de semillas de haya” ha sido realizada en el Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca, bajo la dirección de la Dra. Dña. M<sup>a</sup> Dolores Rodríguez Martín y del Dr. D. Carlos Nicolás Rodríguez, por la licenciada **Dña. ANA ALONSO RAMÍREZ** y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Para que así conste, firmo el presente certificado en Salamanca a 9 de Marzo de 2009.

Fdo: Dra. Dña. Emilia Labrador Encinas.

*A mis abuelos Paco y Lola*

*No hay que confundir nunca el conocimiento con la sabiduría. El primero nos sirve para ganarnos la vida; la sabiduría nos ayuda a vivir.*

*Sorcha Carey*

*Han pasado casi cinco años desde que empecé esta aventura llamada "tesis", y son muchas las personas las que han sido muy importantes para mí durante este tiempo. Esta es la parte que más ganas tenía de escribir, pero también es la más complicada, ya que es muy difícil plasmar sobre el papel todo lo que os tengo que decir.*

*En primer lugar me gustaría comenzar dando las gracias a Gregorio, ya que sin su punto de vista científico, en algunos momentos nos hubiera sido muy difícil seguir con esta investigación.*

*Agradecer a los directores de esta tesis. A Lola, por sus sabios consejos, siempre son de agradecer, y por el esfuerzo que has hecho durante los últimos meses para corregir esta tesis. Carlos, para ti no tengo ni palabras ni espacio suficiente para agradecerte de todo corazón lo que has hecho por mí, has sido el mejor jefe que se puede llegar a tener y siempre has confiado en mí. Tu apoyo ha sido muy importante, y sin él y sin tus innumerables aportaciones este trabajo no podría haberse realizado, gracias, gracias y mil gracias.*

*Al Dr. Aurelio Gómez Cadenas y a María Climent, de la Universidad Jaime I, que llevaron a cabo las medidas hormonales de todas "mis plantitas", cuyos resultados fueron decisivos para dar sentido a mi trabajo.*

*A todos los que formáis parte de este departamento. A Tere y a Pepa, gracias por esas risas y consejos. A Nieves... ¡quién me va a piropear ahora!. A Charo, gracias por escucharme y animarme. A Loli, nuestra nueva técnico, porque aunque ha formado parte de la etapa final de este trabajo sin ella se hace más difícil el trabajo en el laboratorio. Y una mención especial se merece Heli, que más que una técnico se ha comportado como una madre, siempre preocupada y pendiente de todos... ¡no sabes como se te echa de menos!. A todos los de "arriba", Puri, Nines, Marga... siempre habéis tenido una sonrisa y buenas palabras para mí. A Belén, por darme siempre ánimos. Y como no, agradecer a todos los que en algún momento de esta etapa me han puesto la zancadilla, porque no sólo me han enseñado a levantarme y a ser fuerte, sino que además han hecho de mi una mejor persona.*

*Una especial mención se merecen los componentes del L2, Emilia, Berta, Pepa H. y todos sus chicos, por cierto Berta, ahora le tendrás que dar "la coña" a Chuchi o a Carlos... es broma, he estado encantada de ayudarte en lo que buenamente he podido; Teresa, Nachete, ¡que vas a hacer sin mí! o mejor dicho ¡qué voy a hacer yo sin ti!, no sabes como voy a echar de menos esas tertulias mañaneras y esas risas... oye... y cuando seas famoso ¡no te olvides que un día fuimos compis!! jeje. Javi, desde que te has ido a Madrid se te echa un montón de menos ...ya no puedo cantar con nadie la canción del peluchito!!!... "La nueva" Lucía, siempre con una sonrisa y la "nueva nueva" Ruth, espero que os vaya de maravilla.... ¿Sabéis lo que voy a echar de menos? Esos momentos "cotilleos", algunos han sido memorables... ya sabéis de lo que hablo....*

*Una parte importante de todo este proyecto la han formado mis compis y sobre todo amigos del labo. Los que ya no están... David, has sido mi maestro, me enseñaste a manejarme en el laboratorio, y has sido ante todo un buen amigo, gracias por todo. La "Ro", que vino por unos meses y al final se quedó 2 años.... ¡Dios, la peor pesadilla de todos!!!, me escuchaste y apoyaste. Mi yogurina, Leti, ese toque de inocencia en el labo, y aunque crezcas y te hagas mayor siempre serás la peque del grupo.... A todos... gracias*

por estar siempre ahí. A los que todavía están...Chufi, hemos estado a las duras y a las maduras, has sido un gran apoyo para mi, sobre todo en los malos momentos ¡Te voy a echar de menos!!!! ¿Con quién voy a hablar yo de "Gran hermano" y de "Efrén"? No sé si lo soportaré...jajaja A M<sup>a</sup> Angeles, la otra murciana, que ha aportado un toque de alegría, espero que acabes pronto!!!!...y no es por echarte que conste. Y a la nueva incorporación, Gálder, mucha suerte en este mundillo, aprovecha y sobre todo disfruta todo lo que puedas.

A todos los miembros del labo L2 del CIAL'E, Enrique, Rosa, Belén R., Sara y especialmente a Eugenia y Marta, que más que compañeras son amigas...gracias por vuestra ayuda en mis problemas científicos y en los que no lo eran tanto...voy a echar de menos esas cervecitas!!! Y sobre todo Martita, pajarín... tu sofá y tu mantita....

A mis compis del curso de doctorado: Jose, Diego, M<sup>a</sup> Eugenia.....parece que fue ayer cuando empezamos...y ya nos vamos haciendo todos Doctores...¿cómo pasa el tiempo!!!

A todos mis amigos de Salamanca, Dudo, Luisfer, David, Sergio, Davizón, Elenita, Miguel, Elena, Robert, Loli, Javi, Maite,.. porque hemos compartido muchas cosas y momentos que nunca olvidaré...y por supuesto por llevarme a ese magnífico bar que siempre estará en mi memoria ¡LA IMPRENTA!!, con su impresionante baño!!! Imposible de olvidar, Laurita...cuántas cosas hemos pasado juntas!! historias para no dormir...pero siempre estaremos la una para la otra, y Mar, mi veterinaria favorita, gracias por haber tenido siempre un ratito para escucharme y echar un parlao.

A mi gente de Sevilla, mis amigos de la facultad y agregados...Ángel, Laura, Javi, Ana, Jose, Macarena Mima, Emilio, Luis, Manolín, Bands, hace doce años que nos conocemos y han sido muchos los buenos momentos, excursiones, cenas, fines de semana, salidas nocturnas y ahora ¡bodas!...pero lo mejor... ese baile del Ángel a lo Mónica Naranjo...INSUPERABLE.

A mis niñas, Caro, Sarita, M<sup>a</sup>Jo, Mamen e Isa. Todavía tenemos pendiente ese fin de semana en Mazagón!!! Sois las mejores, y que os voy a decir si es que pa vosotras no tengo ni palabras. Eso si, espero irme de boda pronto, ¿no?

Y aunque lo deje para el final, pero por supuesto que no es lo menos importante es darle las gracias a mi familia. A mis abuelos, que hicieron de mí la persona que soy hoy, fueron mis primeros padres... y sé que estáis muy orgullosos de mí allá donde estéis. A mis padres que siempre me han apoyado en todas mis decisiones, y aunque cada vez esté más lejos, ellos siguen ahí. A mi madre gracias por aprender cada día un poco más de ti, eres de verdad, un ejemplo a seguir de fortaleza y superación. A mi padre, sabes que a pesar de que nos peleemos siempre me tendrás ahí. A mi "cho", que siempre me ha apoyado, a pesar de los mosqueos que se pillá, sabes que siempre seremos una. OS QUIERO MUCHO!!!! A Jose, la nueva incorporación familiar, has aportado un toque de frescura, y lo mejor es que eres capaz de aguantar a mi hermana...jajaja...no te enfades Luisa...Y no me puedo olvidar de mis tres niños: Lobo, Creta y Curro, porque son los mejores amigos del hombre, me lo han dado siempre todo sin esperar nada a cambio.

A todos vosotros GRACIAS, GRACIAS Y MIL GRACIAS.

*Este trabajo se ha realizado con cargo a los proyectos del Ministerio de Ciencia y Tecnología (BF12003-01755, BFU2006-07622) y de la Junta de Castilla y León (SA046A05, SA073A08), y gracias a una beca del Programa de Formación Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Ciencia y Tecnología.*

*Índice*

<b><u>ÍNDICE</u></b>	I
<b><u>ABREVIATURAS</u></b>	XI
<b><u>INTRODUCCIÓN</u></b>	1
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	3
2. FORMACIÓN DE LA SEMILLA	3
3. DORMICIÓN DE SEMILLAS	4
3.1. Concepto de dormición	4
3.2. Tipos de dormición	5
3.3. Causas de la dormición	5
3.4. Factores genéticos que controlan la dormición	6
4. PAPEL DEL ÁCIDO ABCSÍICO EN LA INDUCCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA DORMICIÓN	6
4.1. Mecanismo de señalización del ABA	8
4.2. Percepción del ácido abscísico	9
4.3. Transducción de la señal	10
4.4. Regulación transcripcional y post-transcripcional	11
4.5. Fosforilación y desfosforilación de proteínas	13
4.5.1. Proteína quinasas	13
4.5.2. Proteína fosfatasas	14
4.5.2.1. Serina/treonina proteína fosfatasas (PPs)	14
4.5.2.2. Tirosina proteína fosfatasas	16
5. ELIMINACIÓN DE LA DORMICIÓN	17
5.1. Papel de los brasinoesteroides	18
5.2. Papel del etileno	18
5.3. Papel de las giberelinas	19

5.3.1. Papel de las proteínas DELLA en la señalización de las giberelinas y en la germinación de semillas	20
5.3.2. Posible relación entre las giberelinas y el ácido salicílico	21
6. EL ÁCIDO SALICÍLICO (SA)	22
6.1. Relación del ácido salicílico (SA) con otras hormonas	23
6.2. Relación entre el ácido salicílico y los estreses abióticos	25
6.2.1. Estrés producido por metales pesados	25
6.2.2. Estrés producido por choque térmico	25
6.2.3. Estrés osmótico y salino	26
6.2.4. Estrés oxidativo	26
<b><u>OBJETIVOS DEL TRABAJO</u></b>	29
<b><u>MATERIALES Y TÉCNICAS</u></b>	31
1. MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO	33
1.1. Semillas	33
1.2. Microorganismos	33
1.3. Vectores empleados	34
2. CONDICIONES DE GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO	36
2.1. Siembra de las semillas	36
2.2. Obtención de plántulas	38
2.3. Tratamientos de imbibición y germinación utilizados	38
3. MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS	39
3.1. Crecimiento: condiciones y medios de cultivo	39
3.2. Conservación de cepas	39
3.3. Preparación y transformación de células de <i>E. coli</i>	40
3.3.1. Preparación de células competentes	40
3.3.2. Transformación de células competentes	40
3.4. Preparación y transformación de células de <i>S. cerevisiae</i>	41

3.4.1. Preparación de células competentes	41
3.4.1.1. Evaluación de las células competentes	41
3.4.2. Transformación de células competentes	42
3.4.2.1. Evaluación de las transformaciones para la detección de interacciones proteína-proteína	43
<b>4. ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS</b>	<b>44</b>
4.1. Extracción y purificación de DNA genómico	44
4.2. Extracción y purificación de DNA plasmídico	45
4.3. Extracción y purificación de RNA total	45
4.4. Purificación de RNA poly (A <sup>+</sup> )	46
4.5. Cuantificación de ácidos nucleicos	47
4.6. Tratamiento y modificación del DNA	47
4.6.1. Digestión del DNA con enzimas de restricción	47
4.6.2. Ligación del DNA: T4 DNA ligasa	47
4.6.3. Obtención de cDNA: Transcriptasa inversa	48
4.6.4. Otras enzimas modificadoras	48
4.7. Electroforesis de ácidos nucleicos: separación de fragmentos	48
4.7.1. Geles de agarosa	48
4.7.2. Purificación de fragmentos de DNA	49
4.8. Marcaje radiactivo del DNA	49
4.9. Transferencia e hibridación de ácidos nucleicos	50
4.9.1. Southern blot	50
4.9.2. Northern blot	50
4.9.3. Hibridación y autorradiografía	50
4.10. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	50
4.10.1. Técnica de PCR	50
4.10.2. Análisis de la expresión por RT-PCR	51
4.11. Secuenciación del DNA	51

4.12. Amplificación del extremo 5' (RACE)	51
4.12.1. Diseño de oligos	51
4.12.2. Síntesis de la primera cadena de cDNA	52
4.12.3. Amplificación rápida de los extremos de cDNA (RACE)	52
4.13. Utilización de una genoteca de cDNA	53
7.13.1. Características de la genoteca de cDNA	53
4.13.2. Búsqueda de clones completos en la genoteca	53
4.13.3. Escisión <i>in vivo</i>	53
5. INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA. DOBLE HÍBRIDO	53
5.1. Ensayo de doble híbrido para <i>A. thaliana</i>	53
5.1.1. Excisión del $\lambda$ ACT	54
5.1.2. Subclonación del gen de interés en el vector pAS1	55
5.1.3. Ensayo de doble híbrido	55
5.2. Ensayo de doble híbrido para <i>F. sylvatica</i>	56
5.2.1. Construcción de la genoteca	57
5.2.2. Construcción del plásmido cebo	57
5.2.3. Ensayo de doble híbrido	58
5.2.4. Escrutinio de la genoteca	59
5.2.4.1. Cotransformación e identificación de los posibles positivos	59
6. OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS	60
6.1. Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> por <i>Agrobacterium</i>	60
6.1.1. Construcciones para la transformación de plantas de <i>A. thaliana</i>	60
6.1.2. Preparación de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	60
6.1.3. Transformación de <i>A. tumefaciens</i> mediante electroporación	60
6.1.4. Extracción de plásmidos de <i>A. tumefaciens</i>	61
6.1.5. Infiltración de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	61
6.2. Selección de semillas transgénicas	61

6.2.1. Análisis de la segregación del marcador de resistencia a kanamicina en la generación T2	62
6.2.2. Caracterización molecular de las plantas transgénicas	62
6.2.3. Caracterización fenotípica de las plantas transgénicas	62
17. OBTENCIÓN DE MUTANTES DE INSERCIÓN DE T-DNA	64
18. ANÁLISIS Y PRESENTACIÓN DE DATOS	64
8.1. Fotografía y autorradiografía	64
8.2. Análisis informático	64
8.3. Presentación de datos	65
<b>RESULTADOS</b>	67
1. MANTENIMIENTO Y ELIMINACIÓN DE LA DORMICIÓN DE SEMILLAS DE HAYA( <i>Fagus sylvatica</i> L.): EFECTO DEL ÁCIDO ABCSÍCO (ABA) Y DEL ÁCIDO GIBERÉLICO (GA <sub>3</sub> )	69
2. CARACTERIZACIÓN Y EXPRESIÓN DE UNA PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASA DE <i>Fagus sylvatica</i> RELACIONADA CON LA ELIMINACIÓN DE LA DORMICIÓN Y REGULADA POR ABA	70
2.1. Aislamiento y caracterización del clon de cDNA FsPTP1	71
2.1.1. Análisis de la secuencia nucleotídica	71
2.1.2. Estudio comparativo del clon FsPTP1 con otras tirosina fosfatasas	71
2.1.3. Características de la proteína deducida de la secuencia nucleotídica	72
2.1.4. Relación filogenética de FsPTP1 con otras PTPs vegetales	75
2.1.5. Análisis por Southern Blot	75
2.2. Expresión del clon FsPTP1	76
2.2.1. Estudio de la expresión del clon FsPTP1 durante la estratificación y en respuesta a diferentes tratamientos	76
3. ANÁLISIS FUNCIONAL DE <i>FsPTP1</i>	77
3.1. Estudio y caracterización de los mutantes de T-DNA <i>ptp1</i>	77
3.2. Generación de las líneas transgénicas <i>35S:F<sub>s</sub>PTP1</i>	78
3.3. Segregación de los transgenes de la progenie	79
3.4. Caracterización molecular del transgén <i>F<sub>s</sub>PTP1</i>	80

3.5. Análisis fenotípicos de las plantas transgénicas <i>35S:F<sub>s</sub>PTP1</i>	81
3.5.1. Efectos de la sobreexpresión de F <sub>s</sub> PTP1 en la dormición de semillas	81
3.5.2. Efecto de la sobreexpresión de F <sub>s</sub> PTP1 en la sensibilidad al ABA	82
3.5.3. Insensibilidad al PCB de las semillas de las plantas <i>35S:F<sub>s</sub>PTP1</i>	83
3.5.4. Resistencia al estrés salino y osmótico en las semillas de las plantas <i>35S:F<sub>s</sub>PTP1</i>	83
3.5.5. Efecto de la sobreexpresión de F <sub>s</sub> PTP1 en la transpiración	85
3.5.6. Fenotipo de las plantas transgénicas <i>35S:F<sub>s</sub>PTP1</i>	87
3.6. Análisis de la expresión de genes de respuesta a ácido abscísico en plantas transgénicas <i>35S:F<sub>s</sub>PTP1</i>	88
4. CARACTERIZACIÓN Y EXPRESIÓN DE UN GEN DE LA FAMILIA GASA ( <u>Gibberellic Acid-Stimulated in Arabidopsis</u> ) DE <i>Fagus sylvatica</i>	89
4.1. Aislamiento y caracterización del clon de cDNA F <sub>s</sub> GASA4	89
4.1.1. Análisis de la secuencia nucleotídica	89
4.1.2. Estudio comparativo del clon F <sub>s</sub> GASA4 con otros miembros de la familia GASA	90
4.1.3. Características de la proteína deducida de la secuencia nucleotídica	91
4.1.4. Relación filogenética de F <sub>s</sub> GASA4 con otros miembros de la familia GASA	92
4.1.5. Análisis por Southern Blot	93
4.2. Expresión del clon F <sub>s</sub> GASA4	94
4.2.1. Estudio de la expresión del clon F <sub>s</sub> GASA4 durante la estratificación y en respuesta a diferentes tratamientos	94
5. ANÁLISIS FUNCIONAL DE F <sub>s</sub> GASA4	95
5.1. Estudio y caracterización de los mutantes de T-DNA <i>gas4</i>	96
5.2. Generación de las líneas transgénicas <i>35S:F<sub>s</sub>GASA4</i>	97
5.3. Segregación del transgén <i>F<sub>s</sub>GASA4</i> en la progenie	98
5.4. Caracterización molecular del transgén <i>F<sub>s</sub>GASA4</i>	98
5.5. Caracterización fenotípica de las semillas de las plantas <i>35S:GASA4</i>	99
5.5.1. Insensibilidad al PCB de las semillas de las plantas <i>35S:F<sub>s</sub>GASA4</i>	100
5.5.2. Estudio de la dormición de semillas que sobreexpresan F <sub>s</sub> GASA4	102

5.5.3. Sensibilidad al ABA de las semillas de las plantas <i>35S:F<sub>s</sub>GASA4</i>	103
5.5.4. Resistencia a diferentes tipos de estreses abióticos (osmótico, <i>salino, térmico y oxidativo</i> ) en las semillas de las plantas <i>35S:F<sub>s</sub>GASA4</i>	104
5.6. Determinación del tamaño celular y cierre estomático de plantas que sobreexpresan <i>F<sub>s</sub>GASA4</i>	110
5.7. Análisis de los niveles hormonales en semillas y plántulas que sobreexpresan <i>F<sub>s</sub>GASA4</i>	111
5.8. Análisis de la expresión génica en plantas que sobreexpresan <i>F<sub>s</sub>GASA4</i>	112
5.9. Efecto del ácido salicílico (SA) en las respuestas de la planta a diferentes tipos de estrés abiótico	113
5.10. Concentración de malondialdehído (MDA) en las plantas transgénicas <i>35S:F<sub>s</sub>GASA4</i>	117
5.11. ¿Tienen las GAs un papel en la síntesis de SA?	118
5.12. Análisis de la expresión de genes de respuesta a ácido salicílico (SA) en plantas del ecotipo Columbia	119
5.13. Identificación de proteínas que interaccionan con <i>F<sub>s</sub>GASA4</i>	121
<b><u>DISCUSIÓN</u></b>	125
1. DORMICIÓN Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE HAYA BAJO DIFERENTES CONDICIONES HORMONALES	127
2. ANÁLISIS FUNCIONAL DE <i>F<sub>s</sub>PTPI</i> EN LA DORMICIÓN/GERMINACIÓN DE SEMILLAS. PAPEL COMO REGULADOR NEGATIVO EN LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DEL ABA	129
3. EL ANÁLISIS FUNCIONAL DE <i>F<sub>s</sub>GASA4</i> SUGIERE UNA INTERACCIÓN ENTRE EL MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS GAs Y LA SÍNTESIS DE SA	136
<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	149
<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>	153

<b>3-AT:</b> 3-aminotriazol	<b>Kan:</b> Kanamicina
<b>ABA:</b> Ácido abscísico	<b>Kb:</b> Kilobase
<b>ABAR:</b> Proteína de unión a ABA	<b>LB:</b> Medio Luria-Bertani
<b>ABRE:</b> <i>ABA response element</i>	<b>LEA:</b> <i>Late Embryogenesis Abundant</i>
<b>AD:</b> Dominio de activación	<b>LiAc o LiOAc:</b> Acetato de litio
<b>Amp:</b> Ampicilina	<b>MDA:</b> Malondialdehído
<b>β-ME:</b> β-mercaptoetanol	<b>MeSA:</b> Metilsalicilato
<b>BA2H:</b> Ácido benzoico 2-hidroxisilasa	<b>MOPS:</b> Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
<b>BD:</b> Dominio de unión a DNA	<b>mRNA:</b> RNA mensajero
<b>BrEt:</b> Bromuro de etidio	<b>MS:</b> Medio Murashige y Skoog
<b>BSA:</b> Seroalbúmina bovina	<b>NECD:</b> 9- <i>cis</i> -epoxicarotenoide dioxigenasa
<b>Cam:</b> Cloramfenicol	<b>PA:</b> Ácido fosfatídico
<b>cDNA:</b> DNA complementario	<b>PAL:</b> Fenilalanina amonio liasa
<b>cfu:</b> Unidades formadoras de colonias	<b>PAO:</b> Óxido de fenilarsina
<b>CIP:</b> Fosfatasa alcalina de mucosa intestinal	<b>pb:</b> Pares de bases
<b>CM:</b> Corismato mutasa	<b>PCB:</b> Paclotrazol
<b>CTAB:</b> Bromuro de cetil trimetil amonio	<b>PCR:</b> Reacción en cadena de la polimerasa
<b>ctrI:</b> Mutante de triple respuesta a etileno	<b>PEG:</b> Polietilenglicol
<b>D:</b> Semillas durmientes	<b>pfu:</b> Unidades formadoras de placas
<b>DEPC:</b> Dietil pirocarbonato	<b>PKs:</b> Proteína quinasas
<b>DGPP:</b> Diacil-glicerol pirofosfato	<b>PL:</b> Piruvato liasa
<b>DMSO:</b> Dimetil sulfóxido	<b>PPs:</b> Proteína fosfatasas
<b>D.O.:</b> Densidad óptica	<b>PTPs:</b> Proteínas tirosina fosfatasas
<b>DOG:</b> <i>Delay Of Germination</i>	<b>QTL:</b> <i>Quantitative Trait Locus</i>
<b>DsPTPs:</b> Proteína fosfatasas duales	<b>ROS:</b> Especies reactivas de oxígeno
<b>DTT:</b> Ditiotreitól	<b>rpm:</b> Revoluciones por minuto
<b>EDTA:</b> Ácido etilen-diamino tetraacético	<b>RT-PCR:</b> Retrotranscripción y PCR
<b>ET:</b> Etileno	<b>SA:</b> Ácido salicílico
<b>g:</b> Gravedad	<b>SAG:</b> 2- <i>O</i> -β-D-glucosidasa
<b>GA:</b> Giberelina	<b>SAR:</b> Respuesta sistémica adquirida
<b>gal1:</b> mutante deficiente en giberelinas	<b>SDS:</b> Dodecil sulfato sódico
<b>GASA:</b> Gibberellic Acid-Stimulated in Arabidopsis	<b>SDS-PAGE:</b> electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
<b>GSP:</b> Oligo antisentido específico del gen FsPTP para RACE	<b>TAE:</b> Tampón tris-acetato-EDTA
<b>HR:</b> Respuesta hipersensible	<b>TBA:</b> Ácido tiobarbitúrico
<b>ICS:</b> Isocorismato sintasa	<b>TBE:</b> Tampón tris-ácido bórico-EDTA
<b>IP<sub>3</sub>:</b> Inositol-1,4,5-trifosfato	<b>TBS:</b> Tampón tris salino pH 7.4
<b>IPTG:</b> Isopropil tio β-D-galactósido	<b>TCA:</b> Ácido tricloroacético
<b>JA:</b> Ácido jasmónico	<b>TE:</b> Tampón tris-EDTA

**TRIS:** Tris (hidroximetil) aminometano

**U:** Unidades enzimáticas

**Ubi:** Ubiquitina

**UGT:** UDP-glucosiltransferasa

**UL:** Uracilo, Leucina

**Ura:** Uracilo

**U.V.:** ultravioleta

**v/v:** Relación volumen/volumen

**w/v:** Relación peso/volumen

**X-gal:** 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

*Introducción*

## **1.- INTRODUCCIÓN GENERAL.**

La semilla es el principal órgano reproductivo de la gran mayoría de las plantas superiores y puede definirse como el producto maduro de un óvulo fecundado.

La semilla es esencial para la planta al ser el principal medio de renovación, persistencia y dispersión de sus poblaciones, así como para el medio ambiente al ser clave para la conservación del germoplasma vegetal, las reforestaciones, la recuperación de especies sobreexplotadas y la sucesión ecológica. Pero también es de vital importancia para el ser humano, cuyo alimento principal está constituido, directa o indirectamente, por semillas, que además sirven de alimento a muchos animales utilizados con fines ganaderos.

Por todo ello, la biología de semillas es un área de gran importancia dentro de la Fisiología Vegetal, si bien muchos de los procesos fisiológicos y moleculares relacionados con la formación, maduración, dormición, germinación o respuestas de las semillas en situaciones adversas no son del todo conocidos.

## **2.- FORMACIÓN DE LA SEMILLA.**

La formación de las semillas constituye un proceso de adaptación único en el ciclo vital de las plantas superiores, ya que combina el desarrollo del embrión con una serie de procesos fisiológicos encaminados a asegurar la supervivencia de la especie, siendo necesaria una coordinación espacial y temporal en el crecimiento de las distintas células y tejidos, una regulación a nivel molecular y bioquímico, y un estricto control por parte de factores tanto hormonales como ambientales. Estos procesos fisiológicos incluyen la acumulación de sustancias de reserva que serán utilizadas por el embrión cuando comience la germinación, y un estado de reposo metabólico que se completa con la desecación, lo cual permite a las semillas sobrevivir durante largos periodos hasta que las condiciones sean favorables, restableciéndose entonces el crecimiento y llegando a formar una nueva planta.

La embriogénesis comprende el conjunto de cambios morfológicos, estructurales y de expresión génica que tienen lugar desde que se forma el cigoto hasta que se produce un embrión maduro dispuesto a germinar, una vez que las condiciones endógenas y medioambientales sean las óptimas (Goldberg et al., 1994; Raz et al., 2001). De la embriogénesis dependerá el éxito de la germinación y, por tanto, el desarrollo del nuevo individuo, ya que además de ser el periodo en el que se forma la semilla, también constituye la fase de preparación para la germinación.

Este proceso puede dividirse en tres etapas: la llamada fase temprana, que se caracteriza por una elevada actividad mitótica, en la que hay un gran aumento en los niveles de citoquininas, espermidina y espermina. En la fase media, el crecimiento del embrión es debido a expansión celular, seguramente mediado por auxinas (Cohen y Bandurski, 1982; Torti et al., 1986), sin descartar el posible papel de las giberelinas. En la fase tardía de la embriogénesis la semilla se prepara para la desecación y la adquisición

de la dormición primaria, es la maduración de la semilla, caracterizada por un aumento en los niveles de ABA y una disminución en los niveles de giberelinas y auxinas (Kermode, 1990).

### **3.- DORMICIÓN DE SEMILLAS**

#### **3.1.- Concepto de dormición.**

Una de las propiedades adaptativas más importantes de las plantas es la capacidad que presentan las semillas de retener su viabilidad durante largos períodos de tiempo, lo que les permite sobrevivir en condiciones adversas en un estado quiescente (Baskin y Baskin, 1998). Cuando las condiciones del medio son las adecuadas para el desarrollo de la nueva plántula, se produce la germinación de la semilla, en cambio si las condiciones no son favorables para que la germinación se complete con éxito, las semillas no germinan y se mantienen en estado quiescente. Sin embargo, algunas semillas no germinan aunque las condiciones sean favorables debido a características intrínsecas de la propia semilla (Bewley, 1997; Baskin y Baskin, 1998), porque presentan lo que se denomina dormición, que se define como la incapacidad para germinar de una semilla viable e intacta bajo condiciones que normalmente favorecen el proceso (Hilhorst, 1995). En estas semillas, para que la germinación tenga lugar deben producirse una serie de cambios metabólicos y/o ser sometidas a unos factores ambientales determinados.

Sin embargo, a pesar de los grandes avances producidos en los últimos años, la dormición es uno de los fenómenos menos conocidos de la biología de semillas (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006), debido a que la dormición no es un fenómeno sencillo, sino que es consecuencia de la interacción de numerosos factores.

El establecimiento de la dormición está regulado por factores genéticos que determinan los mecanismos fisiológicos endógenos de las plantas, los cuales interactúan con los factores ambientales que, a largo plazo, pueden dar lugar a cambios evolutivos en las plantas. Entre las condiciones ambientales más importantes se encuentran las variaciones climáticas de temperatura y humedad, las variaciones microclimáticas derivadas de aspectos fisiográficos como la calidad espectral de la luz o el termoperiodo, así como las características específicas del lugar al que las plantas se han adaptado para establecerse y crecer, y los aspectos bióticos.

Pero la dormición no es solamente una incapacidad para germinar presente en las semillas de algunas especies, sino que constituye una etapa fundamental en el ciclo de vida de muchas plantas, además de ser una de sus propiedades adaptativas más importantes, ya que permite la supervivencia de la nueva plántula mediante una adecuada distribución tanto espacial como temporal de la germinación, asegurando que las condiciones sean las adecuadas para que este proceso se complete con éxito.

La ausencia de dormición provoca viviparismo en algunas especies agrícolas provocando grandes pérdidas económicas, como sucede en el trigo, al producir una baja calidad del grano. Pero una dormición muy profunda también tiene consecuencias económicas negativas, como sucede en la germinación desigual de campos de cebada que impide la correcta formación de malta, o como ocurre en muchas especies forestales, el haya (*Fagus sylvatica*) incluida, utilizadas en repoblaciones forestales y en

la industria maderera. Por ello existe un gran interés científico y económico en conocer los mecanismos bioquímicos y moleculares implicados en este proceso.

La dormición y la germinación son procesos que están correlacionados con cambios en la expresión de genes, actividad enzimática y acumulación de hormonas, lo que sugiere que procesos biológicos como la transcripción y traducción se están produciendo en las semillas secas (Cadman et al., 2006; Feurtado y Kermode, 2007). Tanto la dormición como la germinación están regulados por la interacción de diversas hormonas vegetales, y son muchos los estudios que muestran la implicación del etileno (Kepczynski y Kepczynska, 1997; Beaudoin et al., 2000), las giberelinas (Karssen et al., 1989) o los brasinoesteroides (Steber y McCourt, 2001) en la inducción de la germinación de semillas durmientes, mientras que parece claro que el ABA es el principal factor implicado en el control de la dormición de semillas (Koornneef et al., 2002; Kermode, 2005; Finkelstein et al., 2008).

### **3.2.- Tipos de dormición.**

La dormición se divide en primaria o secundaria según que la capacidad germinativa de una semilla esté bloqueada antes o después de su dispersión.

La dormición primaria se adquiere durante el desarrollo y maduración de la semilla en la planta madre. Se presenta en el momento que el embrión deja de crecer y está controlada genéticamente, aunque también influyen aspectos metabólicos (estado hormonal de la semilla, flujo de hormonas desde la planta madre) y factores ambientales (factores edáficos, temperatura y luz) (Bewley y Black, 1994). Parece depender de la síntesis de ABA en el propio embrión y no del aporte materno (Finkelstein et al., 2002; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006).

La dormición secundaria se puede definir como la pérdida de la capacidad para germinar de una semilla no durmiente o de una semilla cuya dormición primaria ha sido eliminada por el tratamiento adecuado. Se desarrolla en semillas maduras una vez dispersadas por una pérdida de la sensibilidad a los factores que rompen la dormición o que inducen la germinación. Se caracteriza por una incapacidad de germinar debida a un entorno adverso, como puede suceder en ambientes deficientes en oxígeno (Côme y Thevenot, 1982), con temperaturas elevadas (Cone y Spruit, 1983; Hilhorst, 1990a y b; Derkx y Karssen, 1993), o bien como respuesta a diferentes situaciones de estrés (Bewley, 1997).

### **3.3.- Causas de la dormición.**

La dormición depende tanto de las características fisiológicas como morfológicas de las semillas. Por ello se ha propuesto una clasificación que incluye cinco tipos de dormición (Baskin y Baskin, 2004):

- ▶ Fisiológica: se debe a una disminución de la actividad fisiológica del embrión; es la más abundante en todo tipo de semillas (por ejemplo, *Arabidopsis thaliana*).
- ▶ Morfológica: se debe a un defecto en el crecimiento del embrión, el cual permanece durmiente hasta que su desarrollo ha finalizado con éxito.
- ▶ Morfofisiológica: se debe a una anomalía en el desarrollo del embrión y a la intervención de un componente fisiológico.
- ▶ Física: se debe a la impermeabilidad al agua de las células del tejido en empalizada de la cubierta seminal, responsable del control del movimiento del agua de imbibición.

►Combinada: aparece en semillas con cubiertas duras y va acompañada de una dormición fisiológica del embrión (por ejemplo, *Fagus sylvatica*).

### **3.4.- Factores genéticos que controlan la dormición.**

La dormición está regulada por múltiples factores tanto genéticos como ambientales que interaccionan entre sí, lo que dificulta la búsqueda del gen o los genes responsables de la dormición. Por esta razón, la búsqueda de QTLs (*Quantitative trait locus*) parece ser una estrategia adecuada para abordar este tipo de estudios. En este sentido, se han identificado siete QTLs denominados *Delay Of Germination* (DOG), que parecen estar relacionados con el diferente grado de dormición que presentan el ecotipo *Ladsberg erecta* (el menos durmiente de los ecotipos de *Arabidopsis*) y el ecotipo Cvi (el ecotipo que presenta una dormición más profunda) (Alonso-Blanco et al., 2003), siendo algunos de ellos identificados como QTLs de interés en relación con la dormición, en cruces entre otros ecotipos de *Arabidopsis* (Van der Schaar et al., 1997; Clerkx et al., 2004). Parece, por tanto, que la variación en unos pocos loci podría causar las variaciones fenotípicas observadas en la dormición entre los diferentes ecotipos de semillas de *Arabidopsis* (Bentsink et al., 2007).

Resultados similares se han descrito en cereales; en arroz se han identificado seis QTLs (Gu et al., 2004), cuatro en trigo (Nakamura et al., 2007) y 38 en cebada (Hori et al., 2008), entre los que se encontrarían SD1, implicado en el mantenimiento de la dormición durante la formación de la semilla y SD2 que regularía la rotura de la dormición después de la maduración del grano (Prada et al., 2004). En este sentido, se sabe que el QTL SD2 está localizado en la misma región cromosómica en la que se encuentra el gen que codifica la GA20 oxidasa, enzima clave en la síntesis de GAs, con lo que se ha sugerido que podría haber una correspondencia entre ambos (Li et al., 2004).

Por tanto, los avances realizados en los últimos años gracias a esta aproximación son muy prometedores para la futura identificación de genes responsables del mantenimiento y/o rotura de la dormición, más aún si tenemos en cuenta que parece haber relaciones de homología entre los QTLs de dormición de distintas especies, así como presentar RFLPs comunes (Cai y Morishima 2000; Li et al., 2004).

## **4.-PAPEL DEL ÁCIDO ABCSÍSCO EN LA INDUCCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA DORMICIÓN.**

El ABA es un sesquiterpeno derivado del ácido mevalónico, que tiene actividad hormonal y se encuentra en todas las plantas superiores y en todos los tejidos vegetales. Como todas las sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, ejerce distintas funciones, tanto activadoras como inhibitoras, durante el ciclo de vida de la planta. Existen numerosas evidencias que indican que el ABA está implicado en el control de un amplio rango de procesos fisiológicos esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta, como la formación y germinación de semillas, dormición de yemas y semillas, senescencia, adaptación de la planta a condiciones desfavorables y regulación de la transición del estado embrionario al crecimiento vegetativo (Rock y Quatrano, 1995; Leung y Giraudat, 1998; Rock, 2000; López-Molina et al., 2001). Además, el ABA influye en diversos aspectos del desarrollo vegetal

interaccionando con otras fitohormonas como auxinas, citoquininas, giberelinas y etileno (Beaudoin et al., 2000). Para entender cómo el ABA regula estos procesos es muy importante conocer la regulación de su metabolismo así como los mecanismos por los cuales una variación en su concentración se traduce en una respuesta fisiológica.

No hay duda de que la síntesis y la acumulación de ABA son necesarias tanto para la inducción como para el mantenimiento de la dormición (Wang et al., 1995; Debeaujon et al., 2000; Grappin et al., 2000; Foley, 2001; Holdsworth, et al., 2008). En la actualidad son muchos los datos experimentales que ponen de manifiesto el importante papel del ABA en el desarrollo de la dormición primaria (Koornneef et al., 2002; Gubler et al., 2005), ya que la deficiencia de ABA durante el desarrollo de la semilla está asociada con la ausencia de dormición primaria en semillas maduras, mientras que la sobreexpresión de genes de la biosíntesis de ABA, que puede aumentar el contenido del mismo en las semillas, incrementa la dormición de las semillas o retrasa su germinación (Finkelstein et al., 2002; Nambara y Marion-Poll, 2003; Kushiro et al., 2004; Lin et al., 2007). En este sentido, se ha demostrado una correlación entre el contenido de ABA y el grado de dormición en semillas de cebada (Jacobsen et al., 2002) y en el ecotipo “Cape verde islands” (Cvi) de *Arabidopsis* (Ali-Rachedi et al., 2004) durante su imbibición, donde la disminución en los niveles de ABA precede a la germinación de las semillas. Algo similar sucede en el embrión y el megagametofito de semillas de gimnospermas estratificadas (Corbineau et al., 2002; Feurtado et al., 2004), donde la disminución de los niveles de ABA se correlaciona con el aumento de la capacidad germinativa de las semillas una vez transferidas a temperaturas más cálidas y adecuadas para su germinación.

Por otra parte, las semillas de variedades mutantes de *Arabidopsis* deficientes o insensibles al ABA, presentan una dormición reducida o no la presentan (Koornneef et al., 1989; Laby et al., 2000; Xiong et al., 2001b). Adicionalmente, la aplicación a las semillas de fluridona (inhibidor de la síntesis de ABA), que produce una fuerte reducción de los niveles endógenos de la hormona, evita el desarrollo de dormición en distintas especies (Le Page-Degivry y Garello, 1992; Ali-Rachedi et al., 2004).

Todos estos datos ponen de manifiesto la importancia del contenido de ABA en la regulación de la dormición y germinación de semillas. Pero la variación de los niveles de ABA no sólo se debe a cambios en su síntesis, sino también a diferencias en su catabolismo, siendo el balance entre síntesis y catabolismo el responsable del contenido endógeno de ABA, y por ello, del grado de dormición de la semilla (Le Page-Degivry et al., 1997) (Figura I.1).

Recientemente, mediante diversos análisis genéticos y de expresión de genes específicos que codifican enzimas claves en el metabolismo del ABA, se han identificado, en *A. thaliana*, algunos miembros de la familia *NECD* (9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa) (*NECD6* y *NECD9*) esenciales para la síntesis de ABA tanto en el embrión como en el endospermo durante la dormición (Lefebvre et al., 2006). Además de estos genes relacionados con el mantenimiento de la dormición, también se han identificado genes relacionados con la salida de la misma a través de la vía del catabolismo del ABA, como *CYP707A2* (Millar et al., 2006; Cadman et al., 2006). La activación del catabolismo del ABA provoca una disminución del contenido de esta hormona en el embrión, que se corresponde con un aumento de metabolitos inactivos del ABA como el ácido faseico y el ácido dihidrofaseico, como se ha descrito en semillas de cebada (Jacobsen et al., 2002), *Arabidopsis* (Kushiro et al., 2004) y en embriones

y megagametofitos de semillas de pino (Feurtado et al., 2004), siendo en este último caso también metabolizado a formas inactivas como el 7-hidroxi-ABA o el conjugado glicosil-éster. Recientemente, se ha identificado una familia de citocromo P450, en concreto la CYP707A, que probablemente sean las 8'-hidroxilasas claves para la conversión del ABA a ácido faseico y, por tanto, cruciales para promover la germinación de las semillas (Kushiro et al., 2004; Saito et al., 2004; Okamoto et al., 2006) (Fig I.1). En semillas de *Fagus sylvatica* también se ha observado un aumento en el catabolismo del ABA en semillas que han sido sometidas a un proceso de estratificación para provocar la salida de la dormición, que va a variar el balance síntesis/catabolismo de ABA presente en las semillas durmientes (Le Page-Degivry et al., 1997).

Por otra parte, existen numerosas evidencias de que la regulación de estos procesos no sólo depende de los niveles de ABA sino también de la sensibilidad de las células a la hormona, lo que hace suponer que los cambios en la ruta de señalización del ABA son, al menos en parte, responsables de la rotura de la dormición (Gosparini et al., 2007; Gubler et al., 2008; Finkelstein et al., 2008).

También el ABA parece ser responsable de la inducción de la dormición secundaria, ya que embriones aislados o ejes embrionarios de *Chenopodium album*, *Taxus* y manzana pueden convertirse en durmientes mediante la aplicación exógena de ABA (Karssen, 1968; Le Page-Degivry, 1973a y b; Durand et al., 1975). Sin embargo, en otros casos como lechuga, cuyos contenidos en ABA son elevados, esta hormona sólo está involucrada en la inducción de la dormición secundaria de una manera indirecta, ya que va a inhibir la germinación en la fase en que las semillas son sensibles a factores externos, siendo en este sentido la acción del ABA comparable a otras condiciones inhibitorias de la germinación, como pueden ser el estrés osmótico, oscuridad o temperaturas supraóptimas (Berrie y Robertson, 1976; Bewley, 1980; Karssen, 1982a). Más recientemente se ha demostrado que enzimas clave en la biosíntesis de ABA como *NCED1* y *NCED2*, son fundamentales para la inducción de la dormición secundaria en semillas de cebada (Leymarie et al., 2008).

#### **4.1.-Mecanismo de señalización del ABA.**

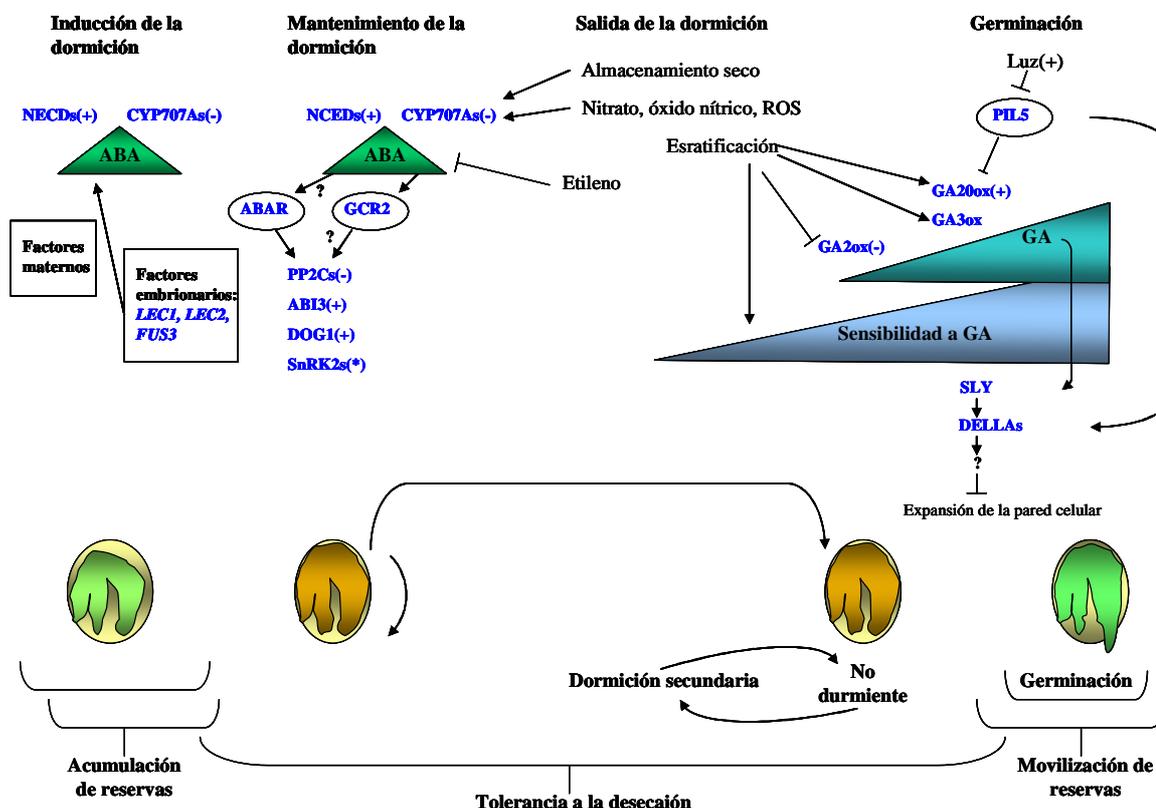
Como ya se ha comentado anteriormente, el ácido abscísico es una hormona fundamental para el control de muchos procesos del crecimiento y desarrollo vegetal, como las respuestas a diferentes tipos de estrés, la maduración y dormición de las semillas y el correcto desarrollo de la planta, por lo que todos los aspectos relacionados con esta hormona han sido ampliamente estudiados, incluido su mecanismo de señalización.

La ruta de señalización del ABA es compleja, tanto por el gran número de genes implicados en múltiples funciones cuya expresión está regulada por ABA, como por las numerosas interacciones que existen con otras rutas hormonales (Brady y McCourt, 2003).

Por otra parte, análisis con mutantes de respuesta a ABA han demostrado la implicación de diversas proteína quinatasas, proteína fosfatatasas (como ABI1, ABI2) y factores de transcripción (como ABI3, ABI4 y ABI5) (Finkelstein et al., 2002; Himmelbach et al., 2002) en la ruta de transducción de señales del ABA relacionada con la dormición/germinación de semillas (Figura I.1).

Con los datos aportados por el estudio de estos componentes de la ruta, se sabe que, tras la percepción del ABA, se produce un aumento en los niveles de  $Ca^{2+}$  citosólico (Allen et al., 2002; Kohler y

Blat, 2002) que, junto con otros compuestos, actúa como segundo mensajero de la señal y a través de procesos de activación/inactivación, mediante proteína quinasas y proteína fosfatasas específicas, de determinadas proteínas en primer término, y de factores de transcripción en segundo, (Walker-Simmons, 1998; Campalans et al., 1999; Johnson et al., 2002; Gong et al., 2002), transmiten la señal desde donde se percibe hasta el interior del núcleo.



**Figura I.1.-** Esquema temporal de la inducción y salida de la dormición. El tamaño de los triángulos representan los niveles hormonales debidos a la acción de los loci de biosíntesis y catabolismo que se indican en la figura. La inducción de la dormición viene determinada por la combinación de factores maternos y embrionarios independientes de ABA y por la señalización dependiente de ABA. En la salida de la dormición intervienen factores ambientales que provocarán cambios en el balance ABA:GA, dando lugar a la expansión de la pared celular para permitir la emergencia radicular. Las flechas y el símbolo (+) indican regulación positiva, mientras que las barras y el símbolo (-) indican regulación negativa. (Adaptado de Finkelstein et al., 2007).

#### 4.2.- Percepción del ácido abscísico.

El primer paso en la respuesta al ABA es su percepción. En los últimos dos años se han identificado, mediante técnicas bioquímicas y de genética inversa, tres tipos de receptores de ABA (Hirayama y Shinozaki, 2007):

- Una proteína de unión a DNA que regula la floración, denominada FCA (“Flowering Time Control”) (Razem et al., 2006).
- Una quelatasa de magnesio implicada en el primer paso de la biosíntesis de clorofila, denominada GUN5 (ABAR/CHLH/Genomes Uncoupled 5) (Shen et al., 2006).

- Un receptor acoplado a una proteína G, denominado GCR2 (Liu et al., 2007).

De éstos, sólo los dos últimos parecen ser responsables de la percepción del ABA en las semillas, y únicamente las mutaciones que afectan a la proteína ABAR de unión a ABA provocan defectos importantes en el desarrollo de la semilla (McCourt y Creelman, 2008).

El silenciamiento parcial de la proteína receptora ABAR, provoca una disminución en la expresión de genes LEA así como de los factores de transcripción ABI y MYB, que regulan positivamente la respuesta a ABA, mientras que se produce un incremento en la expresión de las proteína fosfatasa de tipo 2C, ABI1 y ABI2, que son reguladores negativos de la ruta de señalización del ABA (figura I.1). Adicionalmente, un silenciamiento total de este receptor es letal durante el desarrollo de la semilla, ya que ésta es incapaz de acumular materiales de reserva. Todos estos datos parecen indicar que este receptor juega un papel fundamental en la percepción del ABA en semillas, aunque sus efectos en la dormición no han sido caracterizados (Finkelstein et al., 2008).

La implicación de las proteínas G en la regulación de la germinación mediada por la ruta de señalización del ABA, se demostró por primera vez a través de estudios genéticos del mutante *GPA1* de *A. thaliana* (con una mutación en la subunidad  $\alpha$  de la proteína G), que es hipersensible a ABA (Ullah et al., 2001). Estudios posteriores demostraron que la proteína GPA1 interacciona con una posible proteína G acoplada a un receptor (GCR1) inhibiendo la respuesta a ABA (Colucci et al., 2002; Pandey et al., 2006). Más recientemente, Liu et al. (2007) describieron una segunda proteína G acoplada a otro receptor (GCR2). Tanto la ganancia como la pérdida de función de *GCR2* confieren los fenotipos típicos de insensibilidad e hipersensibilidad al ABA, lo que sugiere que este receptor actúa como regulador positivo en la ruta de señalización del ABA. La identificación de este receptor, localizado en la membrana, es coherente con las evidencias que sugieren una localización extracelular en la percepción de esta hormona (Wang et al., 2001) (Figura I.1).

#### 4.3.- Transducción de la señal.

Inmediatamente después de la percepción de la hormona, se desencadenan una serie de cambios bioquímicos y moleculares que transmiten esta señal hasta el núcleo, donde se inducen y reprimen una serie de genes. En estos cambios intracelulares intervienen diversos componentes como segundos mensajeros, reguladores transcripcionales y posttranscripcionales y proteína quinasas y fosfatasa que regulan la actividad de los factores de transcripción a través de modificaciones en su estado de fosforilación.

En las plantas superiores, en la transmisión de una señal al interior celular suelen intervenir segundos mensajeros, que son moléculas de distinta naturaleza química. En la ruta de transmisión de la señal del ácido abscísico se ha demostrado que intervienen varios tipos de segundos mensajeros:

- ◊ **Inositol trifosfato (IP3):** Producido por la acción de la fosfolipasa C (PLC), actúa como segundo mensajero en la señalización del ABA, regulando el mecanismo de apertura y cierre de estomas y la expresión génica (Gilroy et al., 1990).
- ◊ **Ácido fosfatídico (PA):** Producido por la acción de la fosfolipasa D (PLD) (Liscovitch et al., 2000), participa en la regulación del cierre y la apertura de estomas (Ritchie y Gilroy, 2000; Gampala et al., 2001). El ácido fosfatídico regula proteína quinasas, proteínas G y la

fosfatidilinositol-4-fosfato-5-quinasa (PIP5K) (Divecha e Irving, 1995; Munnik, 2001), además de interactuar con ABI1 y ABI4 regulando la señalización del ABA (Zhang et al., 2004), mientras que AILPP2, enzima que cataboliza el PA, actúa como un regulador negativo del factor de transcripción ABI4 durante la germinación (Katagiri et al., 2005).

◇ **Diacil-glicerol pirofosfato (DGPP):** Este fosfolípido actúa como segundo mensajero en la ruta de señalización del ABA en células de *Arabidopsis* en suspensión, ya que es capaz de provocar la expresión de algunos genes regulados por ABA (Zalejski et al., 2005).

◇ **Calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ):** Juega un papel importante como segundo mensajero en las respuestas a ABA (Schroeder et al., 2001) regulando, entre otros procesos, la apertura estomática (Song et al., 2008).

◇ **Especies reactivas de oxígeno (ROS):** En diversos estudios se ha demostrado que el ABA puede facilitar la apertura de los canales de calcio mediante un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno, que puede participar como segundo mensajero facilitando el proceso (Pei et al., 2000; MacRobbie, 2002).

◇ **El pH:** El cierre estomático inducido por ABA en las células guarda es dependiente del pH, y se relaciona con una disminución de la concentración de  $\text{K}^+$ , promovida por un incremento en su salida debido a la actividad de un canal de salida de  $\text{K}^+$  denominado GORK (Ache et al., 2000), así como una disminución en su entrada (Miedema y Assman, 1996). El aumento de pH en el citosol activa proteína fosfatasas de tipo 2C (PP2C), algunas de las cuales actúan como reguladores negativos del ABA (Gosti et al., 1999; Merlot et al., 2001; González-García et al., 2003).

#### 4.4.- Regulación transcripcional y post-transcripcional.

En *Arabidopsis* se han descrito cuatro reguladores transcripcionales que controlan tanto la maduración de la semilla como la inducción de la dormición: *FUS3*, *ABI3* (*ABA insensitive*), *LEC1* (*Leafy Cotyledon*) y *LEC2* (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). *ABI3*, *FUS3* y *LEC2* codifican factores de transcripción específicos de plantas, que contienen el dominio B3 (Giraudat et al., 1992; Luerksen et al., 1998; Stone et al., 2001); mientras que *LEC1* codifica una subunidad HAP3 del factor de transcripción de unión a CCAAT (denominado CBF o NF-Y) (Lotan et al., 1998). Los mutantes de estos genes presentan una serie de fenotipos característicos, como deficiencias en la maduración de la semilla (Finkelstein et al., 2002; Finch-Savage et al., 2006), menor acumulación de las proteínas de reserva que se encuentran en las semillas (Gutiérrez et al., 2007), y sobre todo, presentan un menor grado de dormición (Raz et al., 2001), por lo que es lógico pensar que algunas de sus dianas resulten ser esenciales para la dormición (Finkelstein et al., 2008) (Figura I.1).

A través de estudios con mutantes simples, dobles y triples, se ha comprobado que estos genes forman parte de una red de regulación donde *LEC1* regula la expresión tanto de *ABI3* como de *FUS3* (Kagaya et al., 2005; To et al., 2006); *FUS3* y *LEC2* actúan de un modo parcialmente redundante,

controlando la expresión génica de proteínas específicas de semillas; además, *LEC2* regula la expresión tanto de *FUS3* como de *ABI3* (Kroj et al., 2003, To et al., 2006).

Por otra parte, otros dos tipos de factores de transcripción, *ABI4* y *ABI5*, también son muy importantes en la regulación de la germinación en respuesta a ABA y a diferentes tipos de estrés, aunque no parece que afecten de un modo significativo a la dormición, al menos en *Arabidopsis* (Finkelstein et al., 2008).

Sin embargo, la importancia de los genes *ABI* en la regulación de la dormición se ha puesto de manifiesto en estudios con ortólogos de estos genes en diferentes especies vegetales, como otras dicotiledóneas, cereales e incluso coníferas (Kermode, 2005; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Por ejemplo, *VP1* (*Viviparous 1*), otro factor de transcripción de la familia B3, ortólogo de *ABI3* en trigo, maíz y avena, está implicado en la transducción de la señal en respuesta a ABA, y su nivel de expresión se ha relacionado con el grado de dormición, ya que su expresión aumenta a medida que la variedad es más durmiente (Jones et al., 1997; Carrari et al., 2001; Nakamura y Toyama, 2001). De igual manera, los niveles de expresión del ortólogo de *ABI5* en sorgo se correlacionan con el grado de dormición (Rodríguez et al., 2007), aunque la demostración de un papel significativo de este factor de transcripción en el control de la dormición requiere más evidencias funcionales.

Para el reconocimiento y activación de los genes de respuesta a ABA, éstos presentan una serie de secuencias *cis* altamente conservadas. El elemento ABRE es el más abundante y mejor descrito y tiene un papel crucial en la inducción de muchos genes de respuesta a ABA. Está formado por una secuencia de 8-10 pares de bases con un núcleo central ACGT y forma parte de los elementos llamados G-box. La funcionalidad del elemento ABRE depende del contexto del promotor y donde se encuentre; de esta manera se han definido los complejos ABRC como los complejos mínimos de respuesta capaces de conferir inducibilidad por ABA, formados por un elemento ABRE y un elemento acoplador (CE3). Los elementos acopladores CE3 son cajas que sólo son activas en combinación con un elemento ABRE, suelen tener un elevado contenido en citosinas y guaninas, y su secuencia puede variar entre ACGCGTGTCTC (Shen et al., 1996), ACGGCCTCCTC (Busk y Pagés, 1997) y ACGCGTGG (García-Garrido et al., 1996). La importancia de estos elementos *cis* en el reconocimiento de genes de respuesta a ABA relacionados con la dormición, se ha puesto de manifiesto en estudios recientes con el ecotipo Cvi de *Arabidopsis*, que es el que presenta un mayor grado de dormición en esta especie, donde se ha comprobado que existen gran cantidad de genes relacionados con la dormición que contienen elementos ABRE (Cadman et al., 2006; Finch-Savage et al., 2007).

Otro de los aspectos importantes en la regulación transcripcional es el proceso conocido como remodelación de la cromatina, asociado a la elongación de la transcripción. El gen *RDO* (*Reduced dormancy*) codifica una proteína de tipo “RING finger” C3HC4 que presenta homología con enzimas modificadoras de histonas (Liu et al., 2007). Una mutación en este gen, provoca una menor dormición (Peeters et al., 2002) y se ha comprobado que funciona como una E3 ligasa, responsable de la monoubiquitinación de la histona H2B, por lo que se renombró como *HUB1* (Histone Monoubiquitination). Una mutación en el gen homólogo de *HUB1* en *Arabidopsis*, *HUB2*, también provoca una menor dormición, lo que sugiere que este proceso de remodelación de la cromatina juega un papel muy importante en la regulación de la dormición.

Además de la regulación transcripcional, existe una relación entre el procesamiento post-transcripcional de los mRNA y la maquinaria de transducción de señales del ABA. Recientemente se han identificado una serie de mutaciones que provocan un mayor grado de dormición y/o hipersensibilidad al ABA, que afectan a la adición del cap [*abh1* (*ABA-hypersensitive*)], a la síntesis de miRNA [*hgl1* (*hyponastic leaves*)], RNA splicing [*sad1* (*supersensitive to ABA and drought*)] o degradación del RNA poly(A) [*ahg2* (*ABA hypersensitive germination*)] (Kuhn y Schroeder, 2003; Nishimura et al., 2005). La hipersensibilidad de estos mutantes indica que estas proteínas actúan como reguladores negativos de la respuesta a ABA, sin embargo algunas de ellas se inducen por ABA o por diferentes tipos de estrés, lo que sugiere que pueden participar en un bucle de retroalimentación negativa (Nishimura et al., 2005).

#### **4.5.- Fosforilación y desfosforilación de proteínas.**

Los procesos de fosforilación y desfosforilación de proteínas intervienen en la activación o inactivación de prácticamente todos los procesos celulares, teniendo un papel esencial en la mayoría de las rutas de señalización en plantas. Su importancia queda patente en el gran número de secuencias que codifican proteína quinasas y fosfatasa en el genoma de *Arabidopsis*.

La transferencia o eliminación del grupo fosfato puede tener efectos importantes en la estructura y en las propiedades funcionales de las proteínas. De este modo, la fosforilación puede regular la actividad enzimática al provocar cambios alostéricos que bloquean directamente el acceso a los sitios activos (Johnson y O'Reilly, 1996), regular la interacción entre proteínas que funcionan en forma de complejos (Pawson, 1995), o ser necesarias para la especificidad de actuación en un sitio concreto de la célula, por lo que tiene una gran importancia en la regulación de muchos aspectos celulares, como progresión del ciclo celular, procesos metabólicos, transporte iónico, control del desarrollo y respuestas a estreses.

##### **4.5.1.- Proteína quinasas.**

Las proteína quinasas (PKs) catalizan la transferencia del grupo  $\gamma$ -fosfato desde el ATP a determinados aminoácidos de otras proteínas. Normalmente presentan una especificidad por el sustrato mayor que las proteínas fosfatasa. En eucariotas, este tipo de modificación covalente ocurre normalmente en residuos de serina, treonina y tirosina, aunque también se ha descrito fosforilación de residuos de histidina, por lo que este tipo de proteínas se ha clasificado en serina/treonina PKs, tirosina PKs o histidina PKs, pero además, algunas de ellas poseen una actividad dual, tanto serina/treonina como tirosina proteína quinasa.

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

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

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

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

También en nuestro laboratorio se han aislado y caracterizado ciertas proteína quinasas (FsPK1, FsPK2 y FsPK4) inducidas por ABA y probablemente relacionadas con la dormición de semillas de haya (Lorenzo et al., 2000; 2003; Jiménez et al., 2006; Reyes et al., 2006b).

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

#### **4.5.2.- Proteína fosfatasa.**

Las proteína fosfatasa (PPs) constituyen un complejo grupo de proteínas, altamente conservadas a lo largo de la evolución, que muestran diversidad estructural y funcional, regulando diversas funciones celulares relacionadas con el metabolismo y el control del ciclo celular.

Al igual que ocurre con las PKs, las PPs se clasifican, según los residuos que desfosforilen, en serina/treonina PPs (PPs), tirosina PPs (PTPs), histidina PPs (PHP) o las que presentan actividad dual serina/treonina y tirosina PPs (DsPTPs).

Por otra parte, las PPs son componentes esenciales en la cascada de señalización del ABA, y parece que su expresión está altamente regulada tanto espacial como temporalmente.

##### **4.5.2.1.- Serina/treonina proteína fosfatasa (PPs).**

Estas proteínas se clasifican según su especificidad por el sustrato, sus requerimientos iónicos y su sensibilidad a distintos inhibidores, en fosfatasa de tipo 1 (PP1), 2A, 2B y 2C (PP2A, PP2B y PP2C).

### Proteína fosfatasa tipo 1 y 2A.

Este tipo de fosfatasa se diferencian del resto porque no necesitan de cationes divalentes para ser activas, lo que si ocurre con PP2B y PP2C (Guo y Roux, 1996). Las PP1 son metaloenzimas formados por una subunidad catalítica y varias subunidades reguladoras (Janssens y Goris, 2001), mientras que las PP2A son proteínas heterotriméricas formadas por una subunidad catalítica (C) y dos subunidades reguladoras (A y B) (Janssens y Goris, 2001). El hecho de que posean varias subunidades hace que se generen isoformas con diferente especificidad de sustrato.

En plantas, estas fosfatasa intervienen en diversos procesos, como transducción de señales, regulación hormonal (actuando como reguladores positivos o negativos en la ruta de transducción de señales del ABA) (Schmidt et al., 1995; Esser et al., 1997; Grabov et al., 1997; Hey et al., 1997; Wu et al., 1997; Kwak et al., 2002), mitosis, control del metabolismo del nitrógeno y del carbono (Smith y Walker, 1996; DeLong, 2006), respuestas de defensa (DeLong, 2006), regulación del cierre estomático en respuesta a ABA (Kuo et al., 1996; Grabov et al., 1997; Pei et al., 1997), y recientemente, se ha relacionado a la PP2A con el control del crecimiento radicular (Blakeslee et al., 2007).

### Proteína fosfatasa tipo 2B.

Las PP2B son proteínas reguladas por  $\text{Ca}^{2+}$  y cuya actividad es estimulada por calmodulina, interviniendo en la regulación de los canales de calcio (Kudla et al., 1999). Forman heterodímeros donde la subunidad A es la catalítica y la subunidad B la reguladora. La subunidad catalítica contiene una región que interacciona con la subunidad reguladora y con la calmodulina. Además, en la región C-terminal posee un dominio de autoinhibición que inhibe la actividad fosfatasa cuando no se encuentra unida a la calmodulina (Luan, 2003).

### Proteína fosfatasa tipo 2C.

Las PP2Cs de plantas destacan por su abundancia y diversidad, que no es comparable con las PP2Cs de otros organismos, por lo que puede haber PP2Cs específicas de procesos vegetales. Estas proteínas comparten una serie de características, como formar monómeros que requieren  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Mn}^{2+}$  para su actividad y presentan 11 subdominios en la región catalítica de la proteína (Bork et al., 1996). Las PP2Cs vegetales se caracterizan por presentar un extremo N-terminal de longitud variable que no muestra homología entre los diferentes miembros de este grupo. Esta característica puede jugar un papel importante en la regulación de la actividad del dominio catalítico, en la especificidad por el sustrato (dirigiendo su actividad en ausencia de subunidades reguladoras independientes, y además, parece ser la responsable de la especificidad de interacción con otras proteínas) (Yang et al., 2006), o su localización en determinados compartimentos subcelulares. Las PP2Cs parece que tienen numerosos sustratos, pero sólo se han identificado algunos de ellos (Christmann et al., 2006), entre los que se encuentran factores de transcripción implicados en la respuesta a estrés (Himmelbach et al., 2002), proteína quinasas como SOS2 (SALT OVERLY SENSITIVE 2) necesaria para la tolerancia al frío (Ohta et al., 2003; Yoshida et al., 2006), sensores de  $\text{Ca}^{2+}$  como la calcineurina B (Guo et al., 2002), glutatión peroxidasa (Miao et al., 2006) o fibrilina (proteína fotoprotectora que se encuentra en el plastidio y que se induce por estrés) (Yang et al., 2006).

Probablemente la subfamilia de PP2Cs mejor estudiada sea la de las fosfatasa ABI1 y ABI2 de *Arabidopsis*, que forman parte de la ruta de transducción de señales del ABA actuando como reguladores negativos de la misma (Leung et al., 1994; Meyer et al., 1994; Rodríguez et al., 1998; Sheen, 1998; Gosti et al., 1999; Merlot et al., 2001). Otras PP2Cs relacionados con ABI1 y ABI2 como AtPP2CA (Yoshida et al., 2006), HAB1 (Sáez et al., 2004; Sáez et al., 2006) y FsPP2C1 (González-García et al., 2003) también actúan como reguladores negativos de la ruta de señalización del ABA. Sin embargo en *F. sylvatica*, la proteína homóloga FsPP2C2 actúa como regulador positivo de la ruta de señalización del ABA, debido a la disminución en los niveles de GAs, por lo que debe existir una interacción entre la ruta de señalización del ABA y la biosíntesis de GAs (Reyes et al., 2006a).

#### 4.5.2.2.- Tirosina proteína fosfatasa.

Estas proteínas eliminan el grupo fosfato de residuos fosforilados de tirosina de otras proteínas. En base al aminoácido que desfosforilan, pueden ser clasificadas en PTPs (actúan específicamente sobre los residuos de tirosina) y DsPTPs (fosfatasa de actividad dual que actúan sobre residuos de tirosina y serina/treonina).

Las PTPs pueden ser posibles receptores transmembrana o bien enzimas intracelulares. Los posibles receptores transmembranas están formados por un dominio extracelular con capacidad de unión al ligando, una región simple transmembrana y uno o dos dominios PTP citoplasmáticos (figura I.2). Las PTPs intracelulares tienen un dominio catalítico simple y varias extensiones amino o carboxilo terminal que incluyen dominios SH2 con funciones reguladoras (Luan, 2003).

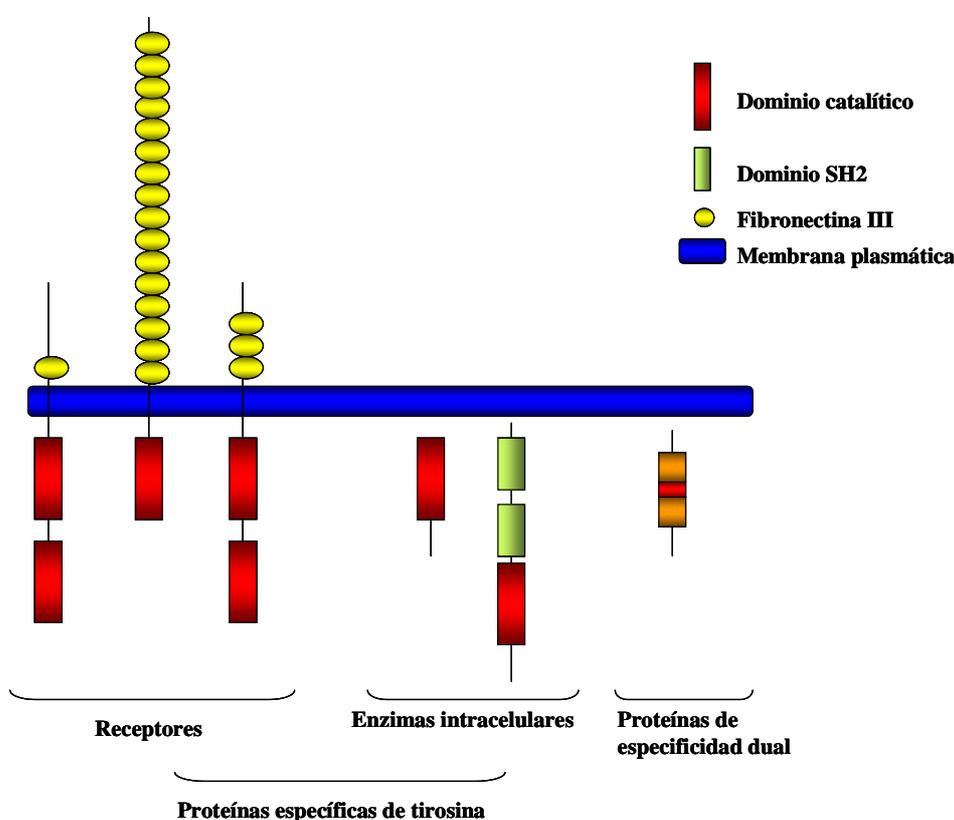
Todas las PTPs se caracterizan por su sensibilidad al vanadato, capacidad para hidrolizar p-nitrofenil fosfato, insensibilidad al ácido okadaico, y porque no requieren la presencia de iones metálico para la catálisis.

Tanto las PTPs como las DsPTPs, a pesar de tener escasa homología en su secuencia, poseen en el dominio catalítico la secuencia consenso (V/I)HCXAGXGR(S/T)G. Además, las secuencias que dan lugar a la especificidad de sustrato se encuentran fuera de la región catalítica (Denu et al., 1996; Tonks y Neel, 1996). Todas las PTPs contienen un residuo de cisteína, que tiene que encontrarse en su forma reducida para permitir la actividad fosfatasa; cuando esta cisteína se oxida, debido a un estrés oxidativo, se produce la inactivación de las PTPs (Denu y Tanner, 1998), aunque recientemente, se ha descrito una tirosina fosfatasa en plantas que no posee el dominio que contiene esta cisteína, descrita como esencial para la actividad fosfatasa (Rayapureddi et al., 2005).

A pesar de la importancia que tienen las PTPs en animales, en plantas no se caracterizaron hasta 1998, y su papel en la desfosforilación de proteínas en restos de tirosina está menos documentado que en animales (Hunter, 1998), aunque se han encontrado proteínas fosforiladas en el residuo de tirosina en células de zanahoria, hojas de *Mimosa pudica*, hipocotilos de *Arabidopsis* y en células en suspensión de *Arabidopsis* (Barizza et al., 1999; Kameyama et al., 2000; Huang et al., 2003; Sugiyama et al., 2008).

Estas proteínas parece que tienen un papel importante en diferentes procesos como en la proliferación celular, la diferenciación, la regulación de las MAPKs y las respuestas a estrés (Wurgler-Murphy et al., 1998).

Las PTPs, además, están implicadas en las rutas de señalización del ABA. En diversos estudios se ha comprobado que, tras la utilización de un inhibidor de estas proteínas (PAO, óxido de fenilarsina) se modifican varias respuestas dependientes de ABA. Este inhibidor provoca una disminución en la expresión del gen *RAB18* en protoplastos de aleurona en cebada y evita el cierre estomático en *Commelina communis*, lo que indica que las PTPs actuarían como reguladores positivos de la ruta de señalización del ABA (Knetsch et al., 1996; MacRobbie, 2002); sin embargo, en otros estudios se ha observado que la adición de PAO provoca un aumento en la inhibición de la germinación de semillas de *Arabidopsis* (Reyes et al., 2006c), lo que sugiere que este tipo de proteína fosfatasa participarían como reguladores negativos de la ruta del ABA durante la germinación. Adicionalmente, en estudios con el mutante *phs1-3* (Propyzamide HyperSensitive1, afectado en una proteína tirosina fosfatasa dual) se ha demostrado que esta PTP actúa como regulador negativo de la ruta de señalización del ABA (Quettier et al., 2006).



**Figura I.2.:** Dominios estructurales de las proteína tirosina fosfatasas. Las PTPs que actúan como receptores suelen presentar dos dominios catalíticos, mientras que las que actúan como enzimas intracelulares tienen sólo uno. Las DsPTPs, a pesar de presentar diferencias en la secuencia con las PTPs, poseen una secuencia común en el dominio catalítico. (Adaptado de Luan, 2003).

## 5.- ELIMINACIÓN DE LA DORMICIÓN.

El paso de dormición a germinación tiene lugar mediante la interacción entre factores endógenos (morfológicos, hormonales o metabólicos) y factores exógenos o ambientales (humedad, luz, temperatura, etc.) (Hilhorst y Karssen, 1992), estando sometido a un estricto control por estos factores (Figura I.1).

Existen numerosos tratamientos que eliminan la dormición de las semillas, entre los que destacan ciertos factores ambientales y hormonales, la eliminación de cubiertas seminales impermeables y la aplicación de agentes químicos. Las condiciones del medio en que se encuentra la semilla, el ataque microbiano y la abrasión producida por las partículas del suelo, así como el intemperismo, son muy importantes en el ablandamiento de las cubiertas duras e impermeables al agua, que son causa de dormición en semillas de muchas especies.

Aunque se conocen muchos aspectos relacionados con el inicio de la dormición, la señal de su terminación no se conoce con detalle, si bien parece lógico pensar que pueda estar relacionada con la señal que la produjo (ABA). Tratamientos que provocan la salida de la dormición en muchas especies vegetales, como el almacenamiento seco o las altas temperaturas, van acompañados por un incremento en la degradación del ABA (Gubler et al., 2005; 2008). Recientemente, también se ha demostrado que irradiaciones con luz roja o tratamientos con GAs provocan la salida de la dormición, probablemente porque inducen la conjugación del ABA (Seo et al., 2006). Otros tratamientos eficaces como las bajas temperaturas (o estratificación) provocan la salida de ABA al medio circundante en semillas totalmente hidratadas (Ren y Kermodé, 1999). Sea como fuere, y aparte de la disminución en los niveles de ABA, la pérdida de la dormición parece estar relacionada con un incremento en la sensibilidad a las GAs, aunque también hay evidencias del papel de otras hormonas, como brasinoesteroides o etileno, en la salida de la dormición (Finkelstein et al., 2008) (Figura I.1).

### **5.1. Papel de los brasinoesteroides.**

Los brasinoesteroides son hormonas esteroideas implicadas en la elongación del tallo, aunque también se las ha implicado en la promoción de la germinación (Clouse, 2001). En *Arabidopsis* se ha comprobado que, aunque tanto mutantes deficientes como insensibles a brasinoesteroides germinan correctamente, son más sensibles a la inhibición de la germinación mediada por ABA que el tipo silvestre (Steber y McCourt, 2001), lo que sugiere que dichas mutaciones afectan a la capacidad germinativa de la semilla. Adicionalmente, la aplicación exógena de brasinoesteroides es capaz de revertir las deficiencias de germinación en diferentes mutantes que tienen afectados tanto la síntesis como el mecanismo de acción de las GAs (Steber y McCourt, 2001), aunque el mecanismo por el que estas dos hormonas promueven la germinación es diferente (Leubner-Metzger, 2001).

### **5.2. Papel del etileno.**

El etileno promueve la rotura de la dormición mediante interacciones con la ruta de señalización del ABA. Diversos mutantes relacionados con el mecanismo de acción del etileno presentan un mayor grado de dormición como consecuencia tanto de una mayor sensibilidad al ABA como a un incremento en los niveles de esta hormona (Beaudoin et al., 2000; Ghassemian et al., 2000; Chiwocha et al., 2005); por el contrario el mutante de respuesta constitutiva al etileno, *ctr1*, presenta una reducción en la sensibilidad al ABA y un menor grado de dormición (Ghassemian et al., 2000). Por tanto, estos resultados indican que el efecto del etileno en la eliminación de la dormición se debe a su efecto antagónico con la ruta de señalización del ABA (Figura I.1).

### 5.3. Papel de las giberelinas.

Las giberelinas constituyen un grupo de compuestos diterpenos tetracíclicos capaces de regular gran cantidad de aspectos relacionados con el crecimiento y desarrollo de las plantas, entre los que se incluyen la germinación de semillas, la inducción de la floración o el desarrollo de frutos (Sun y Gubler, 2004).

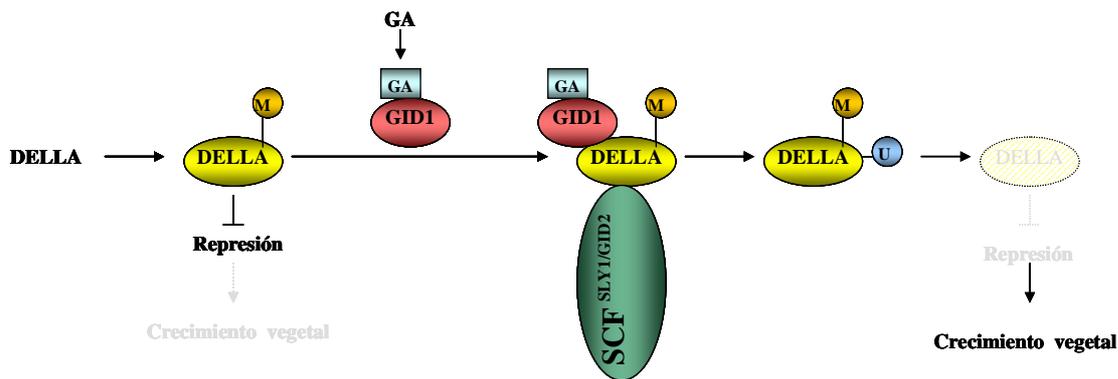
Estas hormonas estimulan la germinación mediante la inducción de enzimas hidrolíticas que van a debilitar las barreras que impiden el crecimiento del embrión, como el endospermo o la cubierta seminal, van a inducir la movilización de reservas y como consecuencia van a estimular la expansión del embrión (Bewley y Black, 1994).

A pesar de la importancia de las giberelinas en la inducción de la germinación, el papel que juegan estas hormonas en la eliminación de la dormición no está excesivamente claro. Aunque parece evidente que la acumulación de GAs está relacionada con la transición entre dormición/germinación de semillas, la aplicación de GAs exclusivamente no va a inducir la germinación en todas las especies, como por ejemplo ocurre con el ecotipo cabo verde de *A. thaliana*, que es el que presenta un mayor grado de dormición (Ali-Rachedi et al., 2004). Diferentes estudios parecen indicar que es necesario que se produzca un descenso en los niveles de ABA antes del incremento tanto en los niveles como en la sensibilidad a las GAs (Jacobsen et al., 2002; Ali-Rachedi et al., 2004). Por otra parte, se sabe que la sensibilidad a las GAs se incrementa tras el almacenamiento seco (Derkx et al., 1993). De manera similar, se ha comprobado que se produce un incremento en los niveles de GAs tras la estratificación de las semillas (Yamauchi et al., 2004). Desde un punto de vista molecular, hay evidencias que estos tratamientos que provocan la salida de la dormición van a producir un incremento en los niveles de expresión de genes relacionados con la síntesis de GAs activas, como GA3 oxidasa o GA20 oxidasa, mientras que van a disminuir los transcritos relacionados con su catabolismo, como la GA2 oxidasa (Yamauchi et al., 2004; Finch-Savage et al., 2007) (Figura I.1). A la vista de todos estos resultados parece claro que las GAs son necesarias, pero no suficientes para que se produzca la salida de la dormición.

Adicionalmente, el papel de las giberelinas en monocotiledóneas y dicotiledóneas es diferente. Mutantes tanto de *Arabidopsis* como de tomate deficientes en GAs son incapaces de germinar (Mitchum et al., 2006; Steber, 2007), pero esta incapacidad es revertida tanto por la aplicación exógena de GAs como por la eliminación del pericarpio y la testa. Por lo tanto, estos mutantes deficientes en GAs encajan perfectamente en la definición clásica de semillas durmientes (Finkelstein et al., 2008), y nos indica que la síntesis de GAs es uno de los pasos necesarios para la eliminación de la dormición. Sin embargo, parece que las semillas de cereales no requieren de GAs para germinar. Variedades mutantes de arroz que tienen afectado el receptor de giberelinas, presentan una disminución en los niveles de actividad de la enzima  $\alpha$ -amilasa, aunque son capaces de germinar (Ueguchi-Tanaka et al., 2005), mientras que este mismo tipo de mutaciones en *Arabidopsis* produce un bloqueo en la germinación de las semillas (Willige et al., 2007). Estas discrepancias entre monocotiledóneas y dicotiledóneas pueden reflejar diferencias tanto en la estructura como en la composición de estos dos tipos de semillas, o bien, y aunque no se ha detectado, la existencia de redundancia en la señalización de las GAs en arroz (Finkelstein et al., 2008).

### 5.3.1. Papel de las proteínas DELLA en la señalización de las giberelinas y en la germinación de semillas.

Las giberelinas van a estimular la germinación mediante la degradación de unas proteínas represoras que reciben el nombre de proteínas DELLA (Tyler et al., 2004; Ariizumi y Steber, 2007). En ausencia de GAs estas proteínas se acumulan en el núcleo, donde bloquean la expresión de genes regulados por GAs, y son desestabilizadas por esta hormona. Estos represores son miembros de la familia GRAS [GA INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR OF GA1-3 (RGA) and SCARECROW] (Peng et al., 1999; Pysh et al., 1999) de factores de transcripción específicos de plantas, que se caracterizan por poseer en el extremo N-terminal el dominio DELLA que los diferencia de los otros miembros de esta familia. Mutantes nulos de estos genes carecen del control ejercido por estos represores y provocan un fenotipo característico de plantas tratadas con un exceso de GAs (Ikeda et al., 2001; King et al., 2001; Dill y Sun, 2001), mientras que mutaciones de ganancia de función muestran un fenotipo típico de deficiencia en GAs (Peng et al., 1999; Dill et al., 2001). Todas estas mutaciones afectan al dominio DELLA, lo que llevó a postular que estas proteínas actuarían como reguladores negativos de la ruta de señalización y que las GAs bloquearían su función represora. Hoy en día se sabe que en presencia de GAs, este dominio DELLA va a interactuar con el receptor de giberelinas GID1, lo que va a facilitar su unión al complejo E3 ubiquitina ligasa SCF<sup>GID2/SLY1</sup> responsable de su ubiquitinización y posterior degradación por el proteasoma 26S (Griffiths et al., 2006; Willige et al., 2007) (Figura I.3).



**Figura I.3.:** Modelo de acción de proteínas DELLA. Las proteínas DELLA actúan como represores del crecimiento vegetal. Las modificaciones posttransduccionales o de fosforilación que sufren las proteínas DELLA (M-DELLA: proteínas DELLA modificadas) permiten que se active su actividad represora para controlar el crecimiento vegetal. Las moléculas de GAs activas se van a unir al receptor soluble de GAs GID1, permitiendo la interacción entre GID1 y el dominio DELLA de las proteínas DELLA. Posteriormente, se provocará una mayor interacción entre el extremo C-terminal de las proteínas DELLA y el componente F-box del complejo SCF<sup>SLY1/GID2</sup>, provocando con ello la poliubiquitinación de las proteínas DELLA a través de la E3 ubiquitina-ligasa SCF<sup>SLY1/GID2</sup> y finalmente, degradando estas proteínas a través de la ruta del proteasoma 26S. (Adaptado de Jiang y Fu, 2007).

En Arabidopsis se han identificado 5 miembros de este tipo de proteínas DELLA: GAI, RGA, RGL1, RGL2 y RGL3, con funciones solapantes pero distintas. GAI y RGA funcionan de manera concertada controlando la elongación del tallo y la expansión de las hojas (King et al., 2001). RGL1 tiene una función predominante en la floración, mientras que RGL2 ejerce su control principal en la germinación (Cao et al., 2005; 2006) de tal manera que es necesaria la reversión del bloqueo impuesto por

estos represores para que se inicie la germinación (Tyler et al., 2004; Cao et al., 2005). De hecho, se ha observado que en el mutante deficiente *gal*, RGL2 desaparece tras sólo 5 h de imbibición en GAs (Tyler et al., 2004). Este modelo de expresión sugiere que RGL2 es un potente represor de la germinación y su degradación por giberelinas permite la germinación. Adicionalmente se ha comprobado que el ABA estabiliza esta proteína DELLA (Penfield et al., 2006) y se ha sugerido que RGL2 podría promover la dormición mediante la inhibición de la expansión de los cotiledones que se produce antes de la germinación. Recientemente también se ha demostrado que RGL2 inhibe la germinación mediante la estimulación de la síntesis de ABA e incrementando la actividad de ABI5 (Piskurewicz et al., 2008). Todos estos datos, por tanto, ponen de manifiesto que RGL2 desempeña un papel muy importante en la dormición/germinación de semillas.

Por otra parte, se sabe que en estos procesos mediados por GAs, la luz ejerce un papel muy importante. El factor de transcripción PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR LIKE (PIL5) regula la transcripción de los genes *GAI* y *RGA*, promoviendo la acumulación de estos represores en las semillas (Oh et al., 2007). La luz induciría la degradación de PIL5 y en consecuencia promovería una reducción en los niveles de expresión de estos represores, lo que hace que se incrementen los niveles de GAs activas y por tanto que se degraden RGL2 y el resto de proteínas DELLA (figura I.1). Así, durante la germinación los niveles de proteínas DELLA estarían controlados tanto a nivel transcripcional como a nivel de estabilidad de estas proteínas (Oh et al., 2007).

Adicionalmente, la función de las proteínas DELLA también puede ser regulada por otros mecanismos diferentes a la degradación. Por ejemplo, el mutante insensible a GAs, *sly1*, acumula niveles muy elevados de estos represores, pero su fenotipo es menos severo que el de los mutantes deficientes *gal*, lo que indicaría que modificaciones posttranscripcionales de las proteínas DELLA y/o de otros intermediarios de la señalización jugarían un papel muy importante en la ruta de transducción de señales de las GAs (Swain et al., 2002; Itoh et al., 2005; Silverstone et al., 2007).

Por último, hay varias evidencias de la existencia de interacciones entre la ruta de señalización de las GAs y la de otras hormonas. Estas interacciones convergerían en los represores DELLA, cuya función está modulada además de por GAs, por la luz (Achard et al., 2007), auxinas (Fu y Harberd, 2003), etileno (Achard et al., 2003) o ABA (Achard et al., 2006).

### **5.3.2.- Posible relación entre las giberelinas y el ácido salicílico.**

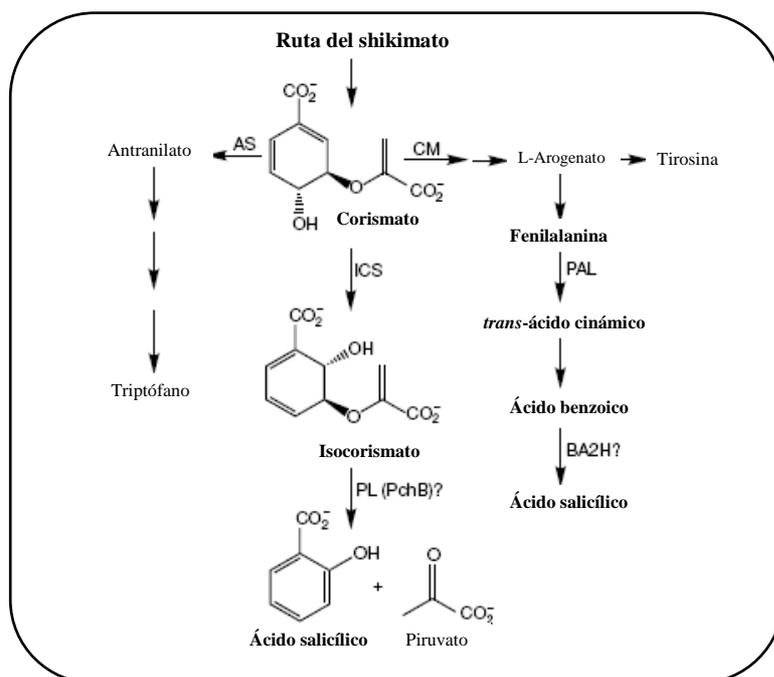
Como ya se ha mencionado anteriormente, las giberelinas promueven el crecimiento de las plantas induciendo la degradación de las proteínas DELLA, que son reguladores negativos del crecimiento vegetal. En estudios recientes se ha demostrado que plantas con mutaciones de pérdida de función en estas proteínas DELLA, son más resistentes a patógenos biotrofos, ya que se potencia la ruta de defensa dependiente de SA (Navarro et al., 2008); por el contrario, estos mutantes resultan ser muy sensibles al patógeno necrotrofo *A. brassicicola*. Todo ello sugiere que las proteínas DELLA y por tanto las giberelinas controlan las respuestas defensivas de la planta regulando el balance entre la ruta de defensa mediada por ácido salicílico (SA) y la mediada por ácido jasmónico (JA)/etileno.

## 6.- EL ÁCIDO SALICÍLICO (SA).

El ácido salicílico es una molécula señal que induce mecanismos de defensa en las plantas frente a gran variedad de patógenos (Raskin, 1992; Klessig et al, 2000; Shah, 2003; Halim et al., 2006). En plantas superiores, este compuesto se sintetiza a través de la ruta del shikimato/corismato (Sticher et al., 1997) (Figura I.4), utilizando el corismato como precursor, a través de dos rutas diferentes.

♦ El corismato se convierte en L-Arogenato a través de la enzima corismato mutasa (CM) para posteriormente transformarse en fenilalanina, que se convertirá en ácido cinámico por la acción de la fenilalanina amonio liasa (PAL). El SA producido a partir de esta ruta potencia la muerte celular en plantas (Wildermuth et al., 2006).

♦ La segunda ruta, descrita inicialmente en bacterias, se ha demostrado que también ocurre en los cloroplastos de las plantas (Wildermuth et al., 2001; Wildermuth et al., 2006). En ella, el corismato se transforma en isocorismato a través de la enzima isocorismato sintasa (ICS). La ICS1 se une con una gran afinidad al corismato, activándose para, posteriormente, ser importada al estroma del cloroplasto (Strawn et al., 2007). Por último, el isocorismato, a través de la piruvato liasa (PL), se convertirá en ácido salicílico (SA) y piruvato (Wildermuth et al., 2001) (Figura I.4).



**Figura I.4.-** Ruta biosintética del ácido salicílico en plantas. **PchB**, piruvato liasa en *P.aeruginosa*; **BA2H**, ácido benzoico 2-hidroxilasa; **AS**, antranilato sintasa; **CM**, corismato mutasa. (Adaptado de Wildermuth et al., 2007).

El ácido salicílico (SA), al igual que otras hormonas, va a sufrir modificaciones como glucosilación, metilación o conjugación con aminoácidos, procesos que van a controlar tanto espacial como temporalmente la disponibilidad de la forma activa de la hormona. La mayoría del SA inducido por

el ataque de algún agente patógeno, se glucosila por la acción de la UDP-glucosiltransferasa (UGT) para dar lugar a 2-O-β-D-glucosidasa (SAG) (forma no tóxica del SA), que se acumula en las vacuolas donde se transformará en una forma hidrolizable del SA (Dean et al., 2005). Recientemente se ha sugerido que otras modificaciones del SA proporcionan especificidad biológica en las respuestas de defensa de las plantas. En este sentido, la metilación del SA da lugar a metil salicilato (MeSA), un éster volátil normalmente ausente en plantas pero que se induce por la infección de patógenos, y que actúa como una molécula señal en las respuestas de defensa (Cao et al., 1994; Koo et al., 2007), además de inducir lo que se conoce como respuesta sistémica adquirida (SAR) (Kumar y Klessig, 2003; Forouhar et al., 2005). Por otra parte, el SA conjugado con aminoácidos también induce respuestas de defensa, de modo que esta forma de SA se exportaría a células adyacentes y se hidrolizaría hasta SA libre que activaría las respuestas de defensa (Nobuta et al., 2007); de forma alternativa, el SA conjugado con aminoácidos puede actuar como diana de las rutas de degradación, como en la mediada por ubiquitina que degrada los reguladores negativos de las rutas de señalización hormonal, y que es fundamental para el control hormonal (Dreher y Callis, 2007).

El ácido salicílico (SA) es una hormona necesaria para el desarrollo de los síntomas de estrés y para la muerte celular producida por la respuesta hipersensible (HR); su aplicación exógena es capaz de inducir la expresión de genes relacionados con la patogénesis (PR) (Malamy et al., 1990) y establecer la respuesta sistémica adquirida (SAR) (Métraux et al., 1990; Gaffney et al., 1993), ya que su acumulación en diferentes tejidos es esencial para la inducción de esta respuesta (Vernooij et al., 1994).

Adicionalmente a su función en los mecanismos de defensa de la planta frente a un estrés biótico, el SA participa en otros procesos fisiológicos (Raskin, 1992) ya que va a inducir la expresión de oxidasas alternativas (Rhoads y Malntosh, 1992), va a provocar el desacoplamiento de la cadena transportadora de electrones en las mitocondrias (Norman et al., 2004) e induce la producción de calor (Raskin et al., 1987). En plántulas de trigo imbibidas en una solución de SA, se produce un incremento en el número de hojas, en la producción de biomasa y en las actividades de la nitrato reductasa y de la anhidrasa carbónica (Hayat et al., 2005). Por tanto, ya que varios de estos procesos relacionados con la acción del SA no son específicos de ningún estrés, parece lógico pensar que el SA no sólo estaría implicado en las respuestas al estrés biótico, sino también al abiótico (Horváth et al., 2007).

### **6.1.- Relación del ácido salicílico (SA) con otras hormonas.**

Las hormonas vegetales están relacionadas con la regulación del crecimiento y con la actividad o represión meristemática, teniendo efectos en la fisiología de la planta, incluso en los tejidos diferenciados.

Las auxinas parece que actúan como reguladores negativos de la señalización del SA, probablemente activando la ruta de señalización del JA, ya que éstas son necesarias para la eliminación de la respuesta hipersensible (HR), además de provocar sensibilidad frente a los patógenos biotrofos (Robert-Seilaniantz et al., 2007) (Figura I.5).

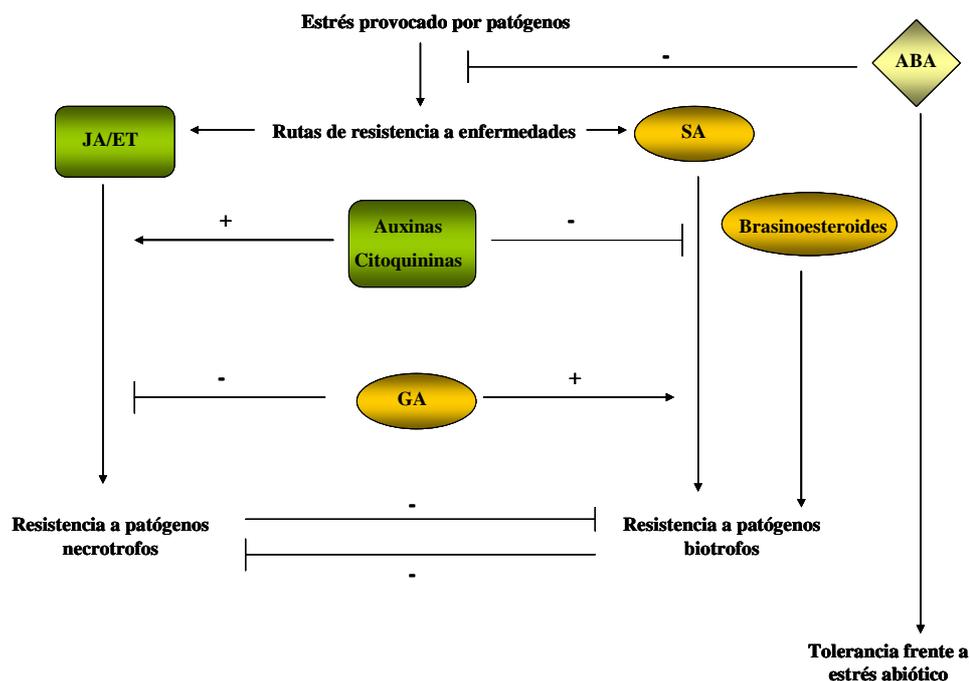
La relación de las citoquininas con el SA es similar a la de las auxinas, actuando como reguladores negativos de la ruta de señalización del SA. La producción de citoquininas está inducida por patógenos biotrofos y están relacionadas con la eliminación de la respuesta hipersensible (Robinette y Matthyse, 1990; Murphy et al., 1997) (Figura I.5).

Las giberelinas por el contrario, inducen el crecimiento por la degradación de las proteínas DELLA y potencian la ruta de defensa dependiente del SA (Navarro et al., 2008) (Figura I.5).

El ácido abscísico (ABA) tiene un papel muy importante en la adaptación a los estreses abióticos, sin embargo, su papel en la respuesta frente a estreses bióticos es menos conocido. Parece que el ABA actúa como regulador negativo de la ruta de señalización del SA, priorizando la respuesta de la planta frente a estreses abióticos (Abe et al., 2003; Anderson et al., 2004) (Figura I.4).

Los brasinoesteroides inducen las respuestas de defensa en las plantas, aumentando la resistencia frente a patógenos biotrofos, sin embargo, su mecanismo de acción es diferente al del SA. La posible explicación puede residir en la interacción entre los brasinoesteroides y otras hormonas (Krishna, 2003).

El ácido jasmónico (JA) presenta un efecto antagónico con el ácido salicílico (SA), ya que mientras el SA se ha relacionado con la resistencia a patógenos biotrofos, el ácido jasmónico (JA) se ha relacionado con la resistencia a patógenos necrotrofos (Feys y Parker, 2000; Kunkel y Brooks, 2002). Sin embargo, hay datos que sugieren la existencia de una red de señalización más compleja donde se darían interacciones positivas y negativas (Mur et al., 2006; Truman et al., 2007), ya que tras la aplicación simultánea de pequeñas concentraciones de SA y JA se produce una expresión sinérgica del gen *PR1* y de marcadores de defensa de JA, sin embargo, elevadas concentraciones de estas hormonas tiene un efecto antagónico, produciendo oxígeno reactivo apoplástico y muerte celular (Mur et al., 2006) (figura I.5).



**Figura I.5.-** Posible modelo de interacción entre las diferentes rutas de señalización hormonal. (Adaptado de Robert-Seilaniantz et al., 2007).

## **6.2.- Relación entre el ácido salicílico y los estreses abióticos.**

En los últimos años, se ha comprobado que el papel del SA no sólo se restringe a las respuestas de las plantas frente al estrés biótico, sino que también juega un papel importante en las respuestas de las plantas frente a diferentes tipos de estrés abiótico (Horvath et al., 2007).

### **6.2.1.-Estrés producido por metales pesados.**

En diferentes estudios con plantas de pepino, tabaco y girasol, se ha comprobado que el ácido salicílico (SA) induce una mayor resistencia frente a los efectos tóxicos provocados por un exceso de cobre (Strobel y Kuc, 1995; El-Tayeb et al., 2006). Del mismo modo, en plantas de arroz, el tratamiento con SA provoca una mejora en la germinación de las semillas y en el crecimiento de las plántulas cuando están sometidas a un estrés por  $Pb^{2+}$  o  $Hg^{2+}$  (Mishra y Choudhuri, 1997).

El SA también parece tener un efecto positivo frente al estrés por cadmio, ya que plántulas de cebada tratadas con SA no presentan peroxidación lipídica (provocada por este metal) (Metwally et al., 2003), y en soja se mitigan los efectos provocados por el tratamiento con este metal, probablemente porque varía su distribución en los órganos vegetales (Drazic y Mihailovic, 2005). Sin embargo, se ha observado un efecto contrario del SA en plantas de alfalfa (imbibidas en una solución de SA) y de maíz (donde el SA se aplicó mediante una solución hidropónica), en el que se agravan los síntomas producidos por el estrés por cadmio (Pál et al., 2002; Drazic et al., 2006); siendo el efecto contrario cuando las semillas de maíz se imbiben en una solución de SA, produciéndose una disminución de los efectos negativos del cadmio sobre los procesos fotosintéticos (Krantev et al., 2008).

En el estrés producido por aluminio, el SA provoca una mayor tolerancia frente a este metal, ya que incrementa el flujo de citrato hacia las raíces evitando la absorción del mismo (Yang et al., 2003).

### **6.2.2.- Estrés producido por choque térmico.**

Las plantas son capaces de soportar elevadas temperaturas sin necesidad de aclimatarse al calor o de ser sometidas a algún tratamiento químico, fenómeno conocido como termotolerancia basal. Si las plantas se someten a un estrés suave por calor, pueden adquirir tolerancia de un modo transitorio frente a temperaturas más elevadas, fenómeno conocido como termotolerancia adquirida o aclimatación (Clarke et al., 2004).

La primera evidencia del efecto del SA sobre la tolerancia al calor se observó en plantas de mostaza rociadas con una solución de SA (Dat et al., 1998); este efecto es dependiente de la concentración, ya que el SA sólo tiene un efecto protector a bajas concentraciones. El papel de la síntesis del SA en la aclimatación al calor se comprobó posteriormente en estudios con inhibidores de la síntesis del SA, los cuales reducían el contenido endógeno de SA y el nivel de tolerancia térmica (Pan et al., 2006).

Del mismo modo, parece que también es importante el modo en el que se aplique el SA; si se rocía induce la tolerancia al calor, mientras que si se aplica en solución hidropónica produce el efecto contrario. Adicionalmente, la actividad catalasa parece ser crucial para la eliminación del  $H_2O_2$  durante el estrés térmico, y se ha comprobado que esta actividad aumenta tras la aplicación foliar del SA, mientras que se ve inhibida en plantas que han sido tratadas hidropónicamente (Shi et al., 2006).

Existe una ligera controversia sobre el papel del SA en la termotolerancia, ya que algunos autores defienden la idea de que es importante en el desarrollo de la termotolerancia adquirida (Larkindale et al., 2005), mientras que otros apuestan por su papel en la termotolerancia basal (Clarke et al., 2004).

Además de la tolerancia que confiere el SA frente a elevadas temperaturas, la aplicación exógena de esta hormona es capaz de mejorar la tolerancia al frío en diferentes especies vegetales (Janda et al., 1999; 2000; Horváth et al., 2002), efecto que va acompañado de un incremento en la actividad de la enzima glutatión reductasa, así como una disminución en la actividad catalasa (Kang y Saltveit, 2002).

### **6.2.3.- Estrés osmótico y salino.**

La aplicación exógena de pequeñas concentraciones de SA aumenta la tolerancia al estrés salino (El-Tayeb, 2005), mejora el crecimiento de la planta, provoca la acumulación de ABA y prolinas (Shakirova et al., 2003), aumenta la tasa fotosintética, la tasa de transpiración y la conductancia estomática, y disminuye la salida de electrolitos, la peroxidación lipídica y la permeabilidad de la membrana (Sawada et al., 2006). El tratamiento con SA va acompañado de un incremento transitorio en los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por lo que parece probable que el SA pueda ejercer su efecto protector a través de este incremento (Wahid et al., 2007). Adicionalmente, en condiciones de estrés salino se ha observado un incremento en el nivel endógeno del SA y una inducción de la actividad de la enzima de biosíntesis del SA, ácido benzoico 2-hidroxilasa. Del mismo modo, la aplicación de SA directamente en el suelo tiene un efecto positivo, ya que mejora la supervivencia en plantas de maíz sometidas a estrés salino, disminuyendo la acumulación de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> (Gunes et al., 2007).

Sin embargo, el efecto positivo del SA no es tan evidente cuando se habla de la tolerancia de las plantas a la sequía. Plantas de maíz de dos semanas tratadas con SA muestran una disminución en la tolerancia a la sequía, aunque aumenta el contenido de poliaminas (Németh et al., 2002); sin embargo, cuando se imbiben granos de maíz, semillas de tomate o de judía en una solución de SA antes de sembrarlos, se mejora la tolerancia a la sequía de las plantas (Senaratna et al., 2000; Hamada y Al-Hakimi, 2001). El tratamiento con SA de plántulas de trigo sometidas a un estrés por sequía provoca en éstas un aumento del contenido de humedad, masa seca, actividad carboxilasa de la Rubisco, actividad superóxido dismutasa y contenido total de clorofila (Sing y Usha, 2003). En ocasiones, este tipo de estrés viene acompañado por un estrés oxidativo (Czövek et al., 2006; El-Tayeb, 2006), por ello, en estudios donde se rocían hojas de trigo, sometidas a un estrés hídrico moderado, con una baja concentración de SA, se ve aumentada la actividad de enzimas antioxidantes, el contenido de clorofila, el contenido relativo de agua y el índice de estabilidad de la membrana, mientras que disminuyen los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de peróxidos lipídicos (Agarwal et al., 2005). Otros efectos del tratamiento con SA es la reducción del daño en las membranas celulares producido por un déficit hídrico, además de un incremento en el contenido de ABA en hojas (Bandurska y Stroinski, 2005).

### **6.2.4.- Estrés oxidativo.**

La mayoría de los factores que provocan estrés pueden estar relacionados con el daño oxidativo. La principal evidencia de la presencia de estrés oxidativo acompañado de otros factores de estrés

abióticos, es el incremento en el contenido de peróxidos lipídicos, los cuales provocan muerte celular. Existen ciertos compuestos, como el paraquat, que inducen de un modo directo estrés oxidativo. En diferentes estudios se ha puesto de manifiesto que la aplicación exógena de SA a bajas concentraciones, proporciona protección frente al daño oxidativo directo en plantas. En plantas de pepino y tabaco donde se rociaron sus hojas con una solución de SA, se observó que éste tenía un efecto protector frente al estrés oxidativo producido por el paraquat (Strobel y Kuc, 1995). Del mismo modo, semillas de cebada tratadas con SA presentaban una disminución en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducida por paraquat, en la peroxidación lipídica y en la salida de electrolitos (Ananieva et al., 2002), mientras que se inducía la actividad de ciertas enzimas antioxidantes (Ananieva et al., 2004).

---

## ANTECEDENTES Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

El grupo de investigación bajo cuya tutela se ha realizado el trabajo que recoge esta memoria, ha tenido como principal objeto de estudio, desde hace algo más de 15 años, los mecanismos hormonales, bioquímicos y moleculares relacionados con el control de los procesos de dormición y germinación de las semillas de *Fagus sylvatica*. Con este objetivo se han aislado y caracterizado varios clones de cDNA regulados por ABA y/o por GAs, que son las principales hormonas implicadas en la regulación de estos procesos, y relacionados con el mantenimiento o la eliminación de la dormición de las semillas de haya lo que se ha reflejado en la realización de varias Tesis Doctorales (Nicolás, 1996, Lorenzo, 2000, Calvo, 2002, Jiménez, 2004, González-García, 2005, Reyes, 2006)

Como parte de este estudio, y dado que los procesos de fosforilación reversible de proteínas mediados por proteína quinasas y fosfatasas son mecanismos clave en la regulación de las rutas de señalización hormonal, se han caracterizado varias proteínas de este tipo en las semillas de haya, y se ha comprobado que tienen un papel importante en el control de la dormición de estas semillas. Así por ejemplo, se ha comprobado que 2 proteína fosfatasa de tipo 2C, FsPP2C1 y FsPP2C2, participarían como reguladores de la ruta del ABA y controlarían la transición entre dormición/germinación de semillas (González-García et al., 2003; Reyes et al., 2006a). También mediante una aproximación farmacológica, se ha demostrado la importancia de las desfosforilación en restos de tirosina en el control del crecimiento postgerminativo mediado por ABA (Reyes et al., 2006b)

Con estos antecedentes y debido a la imposibilidad de realizar transformaciones genéticas en haya, hemos utilizado las herramientas genéticas disponibles en *Arabidopsis* para la obtención de plantas transgénicas, así como mutantes con pérdida de función que nos permitirán realizar un análisis funcional de los genes seleccionados en los procesos de señalización hormonal relacionados con diferentes aspectos de la fisiología de semillas. Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos:

1-Aislamiento y caracterización de una tirosina fosfatasa de haya regulada por ABA y relacionada con la dormición de semillas.

2-Análisis funcional de esta fosfatasa mediante su sobreexpresión en *Arabidopsis thaliana*, planta modelo en estudios de este tipo en Biología Vegetal, y la caracterización fenotípica y molecular de estas plantas transgénicas, para estudiar su implicación en los procesos de dormición/germinación de las semillas y en otras respuestas de la planta mediadas por el ácido abscísico, así como su papel en la ruta de señalización de esta hormona.

3-Aislamiento y caracterización de un clon de cDNA inducido por giberelinas que pudiera estar relacionado con la eliminación de la dormición de semillas.

4-Análisis funcional de este clon de cDNA en la regulación hormonal de la dormición/germinación y en otros procesos del desarrollo de la planta, siguiendo una metodología similar a la descrita en el punto 2.

En esta memoria, se exponen las técnicas empleadas para la consecución de estos objetivos, los resultados obtenidos y la discusión de los mismos.

*Materiales y Técnicas*

## 1.- MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO.

### 1.1.- Semillas.

En la realización de este trabajo se han empleado semillas de dos especies vegetales. Por un lado, semillas maduras durmientes de haya (*Fagus sylvatica* L.), que fueron suministradas por el Danish State Forestry Tree Improvement Station (Dinamarca). Estas semillas fueron deshidratadas hasta un contenido de humedad del 10% y almacenadas a -4°C en recipientes herméticos hasta el momento de su utilización.

También se han utilizado semillas de *Arabidopsis thaliana* L. ecotipos Columbia (Col-0) y Cabo verde (Cvi), que forman parte de la colección del *Arabidopsis Information Service*.

### 1.2.- Microorganismos.

Los microorganismos empleados a lo largo de la experimentación han sido *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Sacharomyces cerevisiae*. Las distintas cepas utilizadas junto con sus características más relevantes, uso y origen o referencia bibliográfica, se detallan en la tabla M.I.

Cepa	Características	Uso	Referencia
DH5 $\alpha$ (E)	F <sup>-</sup> , $\phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>K</sub></i> <sup>-</sup> , <i>m<sub>K</sub></i> <sup>+</sup> ), <i>supE44</i> , <i>deoR</i> , <i>relA1</i> , $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169	Subclonar fragmentos de cDNA. Células competentes.	Hanahan, 1983
C58C1 (A)	<i>rif<sup>r</sup></i> , contiene plásmido binario pGV2260, <i>cb<sup>r</sup></i>	Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> . Células competentes.	Deblaere et al., 1985
LE392 (E)	F <sup>-</sup> <i>hsd</i> 574, ( <i>r<sub>K</sub></i> <sup>-</sup> , <i>m<sub>K</sub></i> <sup>-</sup> ), <i>supE44</i> , <i>sup F58</i> , <i>lac41</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>metB1</i> , <i>trpR55</i>	Amplificación de la genoteca cDNA $\lambda$ -ACT.	Durfee et al., 1993
BNN13 2 (E)	JM107[ <i>end A1</i> , <i>gyr96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , $\Delta$ ( <i>lac<sup>r</sup>proAB</i> ), (F <sup>-</sup> , <i>traD36</i> , <i>proAB<sup>+</sup></i> , <i>lacI<sup>q</sup>ZAM15</i> )] $\lambda$ ( <i>Kan<sup>r</sup></i> , <i>cre</i> )]	Excisión de la genoteca cDNA $\lambda$ -ACT.	Durfee et al., 1993
Y190 (S)	MAT $\alpha$ <i>gal4 gal80 his3 trp-901 ade2-101 ura3-52 leu2-3,-112</i> +URA3::GAL $\rightarrow$ <i>lacZ</i> , LYS2::GAL(UAS) $\rightarrow$ HIS3 <i>cyh<sup>r</sup></i>	Screening de doble híbrido de <i>A. thaliana</i> .	Durfee et al., 1993
Cdc25H ( $\alpha$ y <i>a</i> ) (S)	MAT $\alpha$ <i>ura3-52 his-2003 ade2-101 lys2-801 trp1-901 leu2-3 112 cdc25-2 Gal<sup>+</sup></i>	Screening de doble Híbrido de <i>F. sylvatica</i> .	Petitjean et al., 1990
XL10-Gold Kan (E)	<i>Kan<sup>r</sup></i> , contiene fenotipo <i>Hte</i>	Transformación de la genoteca de cDNA de doble híbrido en <i>F. sylvatica</i> .	Stratagene

**Tabla M.I.:** Cepas de *Escherichia coli* (E), *Sacharomyces cerevisiae* (S) y estirpe de *Agrobacterium tumefaciens* (A).

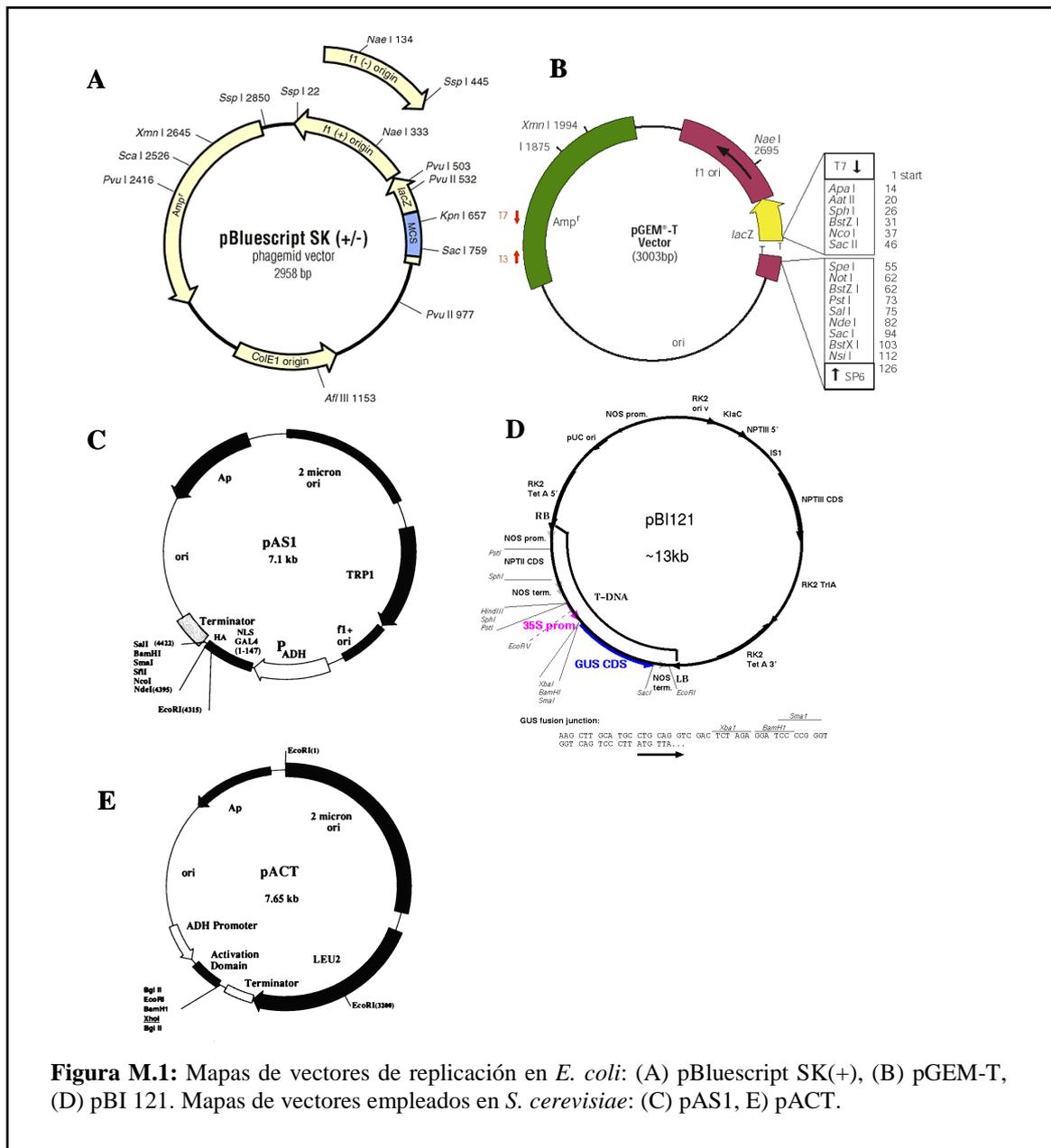
### 1.3.- Vectores empleados.

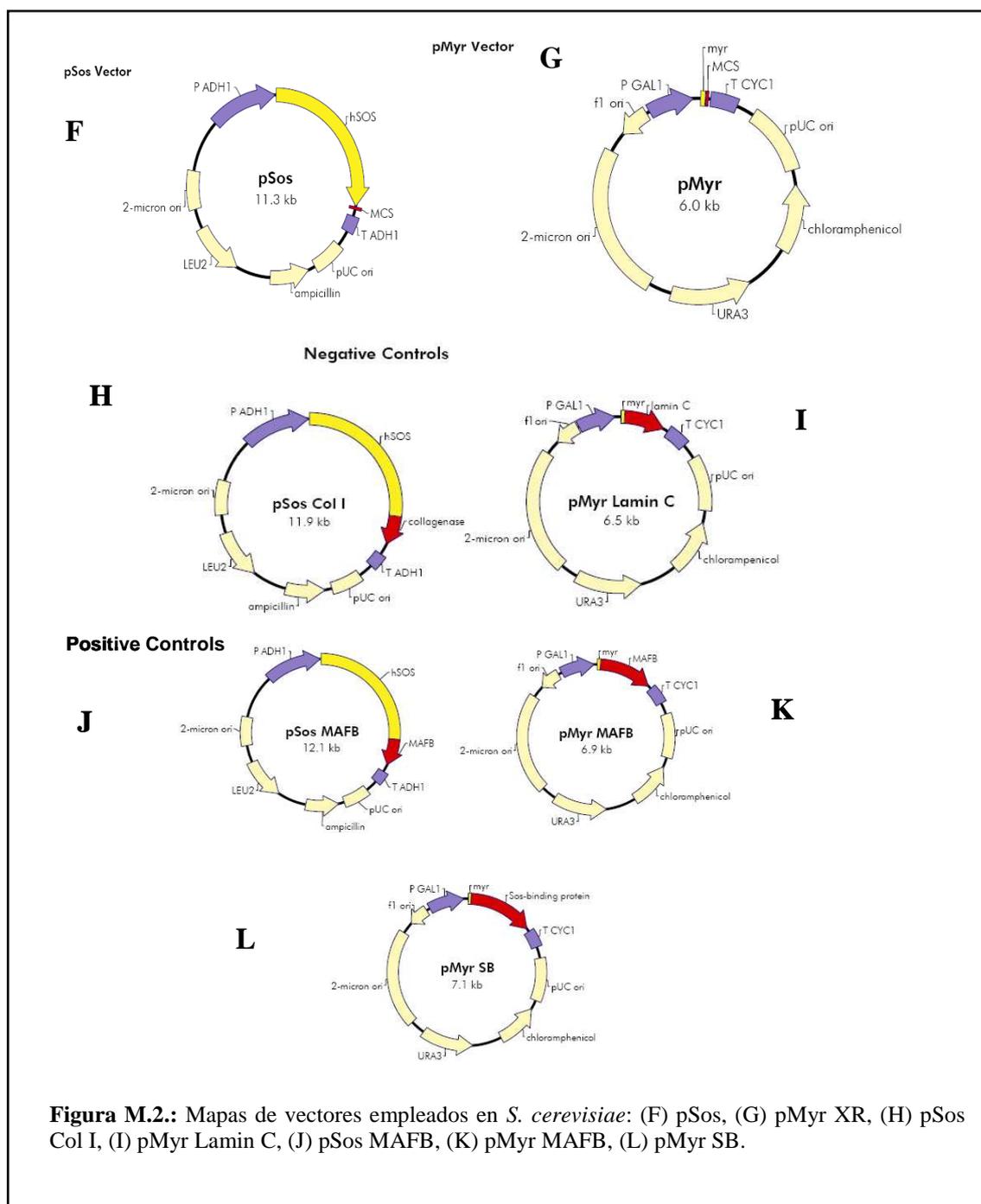
Los vectores utilizados en este trabajo, junto con sus características más destacables y el mapa correspondiente, se detallan en la tabla M.II y en las figuras M.1., M.2. y M.3.

Plásmido	Resistencia	Utilización	Referencia
pBluescript SK <sup>+</sup> (Fig. M.1.A)	Amp <sup>r</sup>	Subclonación de moléculas de DNA y secuenciación.	Stratagene
pGEM-T (Fig. M.1.B)	Amp <sup>r</sup>	Clonación directa de productos de PCR y posterior secuenciación.	Promega
pBI 121 (Fig. M.1.C)	Kan <sup>r</sup>	Construcciones para la transformación de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	Bevan, 1984
pAS1 (Fig. M.3.M)	Amp <sup>r</sup>	Construcciones para el screening de doble híbrido en <i>A. thaliana</i> .	Durfee et al. 1993
pACT (Fig. M.3.N)	Amp <sup>r</sup>	Genoteca de doble híbrido en <i>A. thaliana</i> .	Durfee et al. 1993
pMyr XR (Fig. M.2.G)	Cam <sup>r</sup>	Ligaciones de las fracciones de doble híbrido en <i>F. sylvatica</i> .	Stratagene
pUC18	Cam <sup>r</sup>	Control de la ligación en la transformación de la genoteca de doble híbrido en <i>F. sylvatica</i> .	Stratagene
pSos (Fig. M.2.F)	Amp <sup>r</sup>	Ligación de la proteína cebo o "bait protein" para el screening de doble híbrido en <i>F. sylvatica</i> .	Stratagene
pSos Col I (Fig. M.2.H)	LEU2, Amp <sup>r</sup>	Transformación para detectar interacciones proteína-proteína. Doble híbrido en <i>F. sylvatica</i> .	Stratagene
pSos MAFB (Fig. M.2.J)	LEU2, Amp <sup>r</sup>	Transformación para detectar interacciones proteína-proteína. Doble híbrido en <i>F. sylvatica</i> .	Stratagene
pMyr SB (Fig. M.2.L)	URA3, Cam <sup>r</sup>	Transformación para detectar interacciones proteína-proteína. Doble híbrido en <i>F. sylvatica</i> .	Stratagene
pMyr Lamin C (Fig. M.2.I)	URA3, Cam <sup>r</sup>	Transformación para detectar interacciones proteína-proteína. Doble híbrido en <i>F. sylvatica</i> .	Stratagene
pMyr MAFB (Fig. M.2.K)	URA3, Cam <sup>r</sup>	Transformación para detectar interacciones proteína-proteína. Doble híbrido en <i>F. sylvatica</i> .	Stratagene

**Tabla M.II.:** Plásmidos utilizados como vectores.

El vector pBI 121 se utilizó con el promotor 35S de CamV, un terminador Nos (nopalina sintetasa). El plásmido recombinantes derivado de éste por inserción de segmentos de DNA, se especifica en el apartado concreto.





## 2.- CONDICIONES DE GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO.

### 2.1.- Siembra de las semillas.

En los experimentos con semillas durmientes de *Fagus sylvatica*, el pericarpio fue eliminado manualmente antes de realizar la siembra (Figura M.3.A). Las semillas se lavaron una vez con hipoclorito sódico al 0.1% y varias veces con agua estéril, colocándolas en bandejas de plástico sobre dos placas de vidrio recubiertas con papel de filtro. En cada bandeja se sembraron entre 50 y 100 semillas, añadiendo 200 ml de agua estéril o de las soluciones correspondientes a cada tratamiento. Una vez realizada la siembra, las bandejas se mantuvieron entre 1 y 6 semanas en cámaras de germinación, en completa oscuridad y a una temperatura de 4°C (tratamiento frío que favorece la eliminación de la dormición, denominado estratificación), y transcurrido el tiempo deseado, se

calcularon los porcentajes de germinación y se recogieron las semillas. La germinación fue considerada como emergencia radicular.

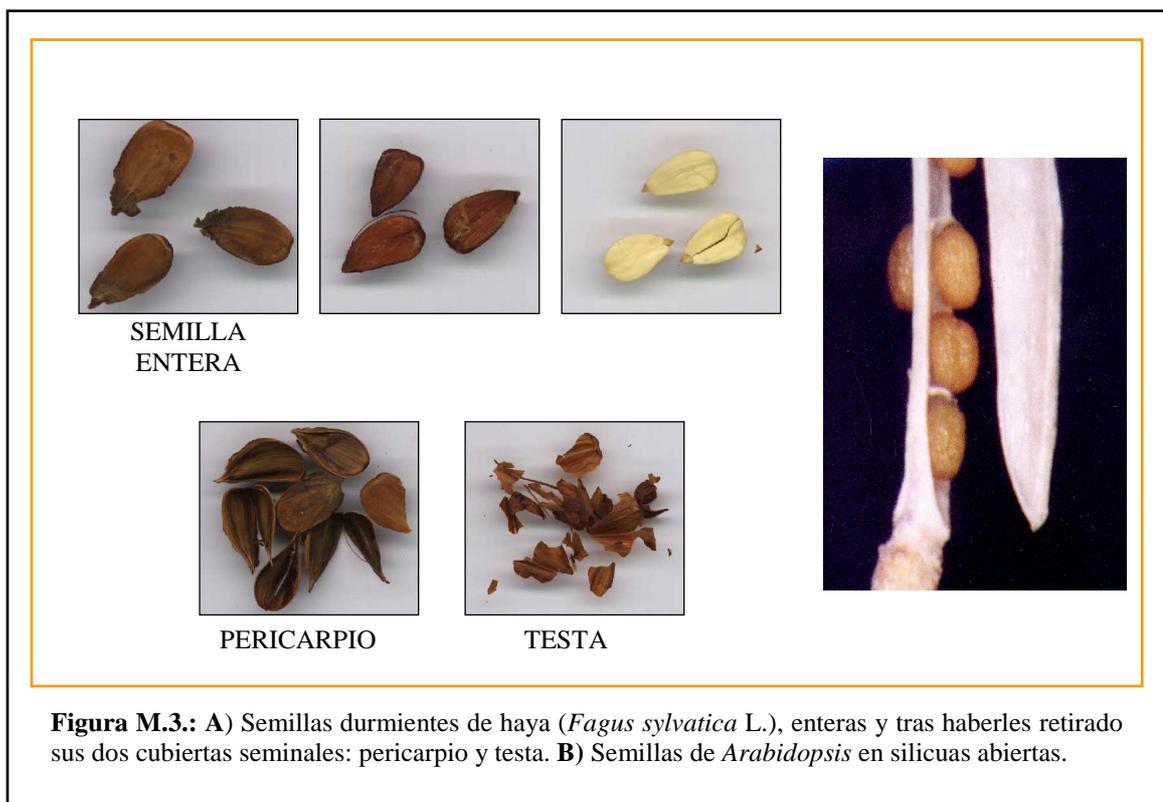
Las semillas de *Arabidopsis thaliana*, se esterilizaron superficialmente mediante un lavado de 15-30 min con etanol al 70% y Triton X-100 al 1% en agitación. A continuación, se realizó un lavado de 10 min con hipoclorito sódico al 2.5% y Tritón X-100 al 0.05%. Finalmente, las semillas se lavaron exhaustivamente en agua estéril, repitiendo el proceso cuatro veces.

Estas semillas se sembraron en medio MS (4,9 g/l) (Murashige y Skoog, 1962) preparado comercialmente por Duchefa, que contenía sacarosa al 1%. El pH se ajustó a 5.7 con KOH antes de esterilizarlo en autoclave. Para obtener MS sólido se añadió agar al 1%. La germinación de las semillas obtenidas de plantas transgénicas se realizó en presencia de kanamicina (50 mg/l), de acuerdo a la resistencia incluida en el plásmido para su selección, o en presencia de distintos tratamientos que se detallarán más adelante. Los antibióticos y las hormonas se añadieron después de esterilizar el medio.

La siembra se realizó en placas Petri, con todo el material estéril, en una cabina de flujo laminar horizontal. Habitualmente se sembraron unas 100 semillas por placa, tomando las semillas de una suspensión acuosa de agarosa al 0.15% con la ayuda de una micropipeta y depositándolas de una en una en la superficie del medio de cultivo. Una vez sembradas, las placas Petri fueron precintadas con esparadrapo quirúrgico Micropore Scotch 3M, que constituye una barrera efectiva para cualquier partícula pero no impide el intercambio de gases con el exterior.

Para los estudios de elongación de hipocotilos se emplearon placas cuadradas dispuestas en vertical.

Las semillas se estratificaron a 4°C durante 3-5 días en ausencia de luz, como paso previo a su germinación, a fin de sincronizar la germinación y eliminar la dormición (en aquellos casos en los que no se estudia la dormición), tras lo cual fueron incubadas a 22°C, con una humedad relativa del 50-60% y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad (80-100  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ).



**Figura M.3.:** A) Semillas durmientes de haya (*Fagus sylvatica* L.), enteras y tras haberles retirado sus dos cubiertas seminales: pericarpio y testa. B) Semillas de *Arabidopsis* en silicuas abiertas.

## 2.2.- Obtención de plántulas.

Las plántulas de *Arabidopsis thaliana*, que habían sido germinadas *in vitro* en medio sólido MS durante 10-12 días, se pasaron a alveolos para su crecimiento en suelo, que contenía tierra (Sustrato Universal, SONDERMISCHUNG) y vermiculita exfoliada (TERMITA) en la proporción 3:1.

Las bandejas de alveolos estuvieron sometidas a irrigación continua para mantener un nivel de humedad adecuado. Cada alveolo se destinó al cultivo de una sola planta que, en la mayoría de los casos, había sido transplantada desde una placa Petri en la que había permanecido durante los primeros días de su ciclo de vida.

Las plántulas completaron su desarrollo en cámaras de luz o fitotrones, manteniéndose cubiertas con plástico durante los 3-4 primeros días con el fin de mantener niveles altos de humedad. Las condiciones de crecimiento fueron de día largo, con 16 horas de luz (80-100  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ) y 8 horas de oscuridad, a una temperatura de 22°C y una humedad relativa del 50-60%, salvo indicación de otras condiciones en algún apartado específico.

## 2.3.- Tratamientos de imbibición y germinación utilizados.

Los distintos tratamientos que se utilizaron en la siembra de las semillas de haya y *Arabidopsis*, sus respectivas concentraciones y sus efectos tanto en el mantenimiento como en la eliminación de la dormición y germinación de las semillas, se indican en la Tabla M.III.

Todas las concentraciones utilizadas en semillas de haya habían sido probadas y optimizadas previamente en nuestro laboratorio (Nicolás et al., 1996; González-García, 2004).

Tratamiento	Concentración	Efecto
Agua destilada estéril (4°C)	-	Tratamiento de estratificación que elimina la dormición, utilizado como control.
Ácido abscísico (ABA)	0.3, 0.5, 0.7, 1, 2, 3, 5, 10, 30, 50 y 100 $\mu\text{M}$	Hormona inhibidora del crecimiento. Mantiene la dormición en estas semillas.
Ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ )	50 y 100 $\mu\text{M}$	Hormona estimuladora del crecimiento. Elimina la dormición en estas semillas.
Paclobutrazol (PCB)	1, 2.5, 5, 10, 20, 25 y 50 $\mu\text{M}$	Inhibidor de la síntesis de giberelinas.
Manitol	200, 250, 270, 300, 350 y 400 mM	Compuesto que provoca estrés osmótico e inhibe la germinación a altas concentraciones.
NaCl	100, 125, 150, 175, 200, 250 y 300 mM	Compuesto que provoca estrés salino e inhibe la germinación a altas concentraciones.
Ácido Salicílico (SA)	0.25, 0.5, 1, 1.25, 50, 100, 150 y 200 $\mu\text{M}$ . 0,25, 0,5 y 1 mM.	Hormona que induce los mecanismos de defensa.
Paraquat	0.5 mM	Herbicida que provoca estrés oxidativo.

Tabla M.III.: Tratamientos empleados en semillas de *Fagus sylvatica* y *Arabidopsis thaliana*.

### 3.- MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS.

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

Las cepas de *E. coli* se crecieron en los medios de cultivo que se detallan más adelante, normalmente a 37°C y en algunos casos a 30°C.

Las cepas de *S. cerevisiae* se crecieron en los medios de cultivo que se detallan más adelante, a una temperatura de 30°C o de 25°C (según la cepa).

Los cultivos en medio líquido se mantuvieron en agitación constante (225 rpm) en agitador orbital con temperatura controlada. Para estimar el crecimiento de los cultivos, se midió la D.O. a 600 nm.

Los distintos tipos de medios empleados en la propagación de las cepas de *E. coli* (Sambrook et al., 1989) y *S. cerevisiae* fueron los siguientes:

Medio Luria-Bertani (LB): bacto triptona 1%, NaCl 1%, extracto de levadura 0.5%, pH 7.0. En ocasiones fue necesaria la adición de otros compuestos como MgSO<sub>4</sub> 10 mM o maltosa 0.2%.

2xYT: bacto triptona 1.6%, NaCl 1%, extracto de levadura 1%.

Medio NZY: NaCl 0.5%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2%, extracto de levadura 0.5%, hidrolizado de caseína 1%, pH 7.5 ajustado con NaOH.

Medio Top agar: su composición es igual al medio NZY excepto por la adición de agarosa al 0.7% (w/v).

Medio SOB: bacto triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.05%, KCl 2.5 mM, pH 7.0 ajustado con NaOH y MgCl<sub>2</sub> 10 mM.

Medio SOC: Medio SOB más glucosa 20 mM.

Medio SM: NaCl 0.58%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2%, Tris-HCl 1M pH 7.5 0.5%, gelatina 0.5%.

Medio Terrific Broth: bacto triptona 1.2%, extracto de levadura 2.4%, glicerol 4 ml. Una vez autoclavado y enfriado a 60°C se añadieron 100 ml de una solución estéril de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.17M y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.72M.

Medio YPAD: extracto de levadura 1%, bacto peptona 2%, glucosa 2%, adenina hemisulfato 40 mg.

Medio Mínimo Sintético de Glucosa [SD/Glucosa (-UL)]: base de nitrógeno de levaduras sin aminoácidos 0.17%, sulfato amónico 0.5%, glucosa 0.2 %, bactoagar 1.7%.

Medio Mínimo Sintético de Galactosa [SD/Galactosa (-UL)]: base de nitrógeno de levaduras sin aminoácidos 0.17%, sulfato amónico 0.5%, galactosa 0.2%, rafinosa 1%, bactoagar 1.7%.

Para la preparación de placas con medio sólido, al medio correspondiente se le añadió agar al 1.5% ó al 2% según la necesidad.

Todos los medios fueron preparados con agua destilada y se esterilizaron en autoclave 15-20 min a 121°C, manteniéndolos a 4°C hasta su utilización.

Cuando fue necesaria la selección de clones por resistencia a antibióticos, los medios se suplementaron con ampicilina (Amp) (50 mg/ml), kanamicina (Kan) (50 mg/ml) (Sigma), rifampicina (50 mg/ml) o cloramfenicol (50 µg/ml). Para las interacciones proteína-proteína en los ensayos de doble híbrido, los medios de SD/Glucosa y SD/Galactosa se suplementaron con 100 ml (por litro) de una solución de aminoácidos apropiada 10x “dropout”. Estas soluciones fueron preparadas en agua y esterilizadas por filtración a través de filtros estériles de 0.45 µm de diámetro de poro (Albet).

#### 3.2.- Conservación de cepas.

Las cepas bacterianas se mantuvieron a corto plazo en placas de agar a 4°C. La conservación a largo plazo de las cepas bacterianas y de levadura se hizo por congelación rápida en nitrógeno líquido de cultivos crecidos hasta la fase logarítmica tardía y suplementados con glicerol estéril hasta una concentración final del 30% (v/v), en el caso de las cepas bacterianas, y hasta una concentración

final del 15% (v/v) para las cepas de levaduras. Los criotubos se almacenaron a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ , donde son viables durante varios años.

### 3.3.- Preparación y transformación de células de *E. coli*.

Para la introducción de DNA plasmídico en el interior de *E. coli* se utilizaron células competentes, que son más permeables al DNA y de esta forma se consigue una transformación eficiente.

#### 3.3.1.- Preparación de células competentes.

El protocolo utilizado para la preparación de células competentes DH5 $\alpha$  se ha modificado de Inoue et al. (1990). Básicamente, a partir de un glicerinado de la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ , mediante triple estría, se sembró una placa con LB y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. 5-7 colonias aisladas se inocularon en 250 ml de medio SOC y se incubaron en agitación (200 rpm) a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta alcanzar una  $\text{D.O.}_{600} = 0.6$ ; se colocó el cultivo en hielo durante 10 min y posteriormente se centrifugó a 3.000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. Se descartó el sobrenadante, las células se resuspendieron en 80 ml de tampón TB frío (PIPES 10 mM,  $\text{CaCl}_2$  15 mM y KCl 250 mM, pH 6.7 ajustado con KOH) y se incubó en hielo durante 10 min. Posteriormente, se centrifugó a 3.000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. Se decantó el sobrenadante, se invirtió el tubo durante 1 min para eliminar totalmente los restos del tampón y se resuspendió en 20 ml de TB frío agitando manualmente. Por último, a la mezcla de células se le añadió DMSO a una concentración final del 7% y se separaron alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  en tubos eppendorf estériles sobre hielo seco, guardándose a  $-80^{\circ}\text{C}$  donde pueden conservarse al menos durante un año.

La preparación de las células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* de la cepa C58C1 se explica en el apartado 7.1.2.

Las células ultracompetentes XL10-Gold Kan de *E. coli* fueron suministradas por la casa comercial Stratagene.

#### 3.3.2.- Transformación de células competentes.

La transformación de células competentes de la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* se realizó siguiendo la técnica estándar descrita por los suministradores (Stratagene), según la cual sobre 50-100  $\mu\text{l}$  de células descongeladas en hielo se añadieron entre 20 y 200 ng de plásmido o de la reacción de ligación, dejando la mezcla en hielo durante 20-30 min. A continuación se las sometió a un pulso de calor a  $42^{\circ}\text{C}$  entre 30 seg y 2 min y se colocaron en hielo por el mismo intervalo de tiempo. Finalmente, se añadieron 250  $\mu\text{l}$  de medio 2xYT y se incubaron 50-60 min a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación (225 rpm). Una vez terminada la incubación, se sembraron distintas diluciones (50 y 200  $\mu\text{l}$ ) en placas con medio LB agar y el antibiótico correspondiente para la selección de colonias. Tras su incubación durante toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$ , las colonias crecidas se conservaron en placas a  $4^{\circ}\text{C}$ .

En todos los casos, la eficiencia de transformación fue superior a  $1 \times 10^8$  cfu/ $\mu\text{g}$  DNA (cfu: unidades formadoras de colonias).

La transformación de las células ultracompetentes de la cepa XL10 Gold Kan de *E. coli* se realizó siguiendo la técnica estándar descrita por los suministradores, según la cual sobre 100  $\mu\text{l}$  de las células se añadieron 4  $\mu\text{l}$  de la mezcla XL10-Gold  $\beta$ -ME (formulación de la casa comercial) y se incubaron las células en hielo durante 10 min, agitándolas cada 2 min. A continuación se añadió 1  $\mu\text{l}$  de la reacción de ligación (como control de la ligación se usó el vector pUC18, añadiendo 1  $\mu\text{l}$  a otros 100  $\mu\text{l}$  de células ultracompetentes), la mezcla se incubó en hielo durante 30 min. Acabado ese tiempo se les dio un pulso de calor a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 30 seg y se colocaron en hielo durante 2 min. Finalmente se añadieron 0.9 ml de medio NZY y se incubaron 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación (225-250 rpm). Las células se concentraron por centrifugación a 200xg durante 3-5 min, y el pellet se resuspendió en 200  $\mu\text{l}$  de medio NZY. Por último se sembraron 5  $\mu\text{l}$  de la transformación control en placas LB agar con Amp y se incubaron durante toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$ , obteniendo una eficiencia de la transformación superior a  $5 \times 10^9$  cfu/ $\mu\text{g}$  DNA. Para determinar el número de transformantes se sembraron en placas LB agar con cloramfenicol 1 y 10  $\mu\text{l}$  tanto de la transformación control como del problema. Tras su incubación durante toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$  se picaron 50 colonias y se transfirieron a una placa LB agar con cloramfenicol, X-Gal e IPTG y se volvieron a incubar durante toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$ , obteniéndose una

cantidad superior a  $2 \times 10^5$  cfu totales, excepto en la transformación control donde no se obtuvieron colonias resistentes a cloramfenicol.

### 3.4.- Preparación y transformación de células de *S. cerevisiae*.

Para la introducción de los plásmidos diana y cebo en el interior de *S. cerevisiae* se utilizaron células competentes, para asegurar la eficiencia de la transformación.

#### 3.4.1.- Preparación de células competentes.

El protocolo utilizado para la preparación de células competentes Y190 se ha modificado del método del LiAc descrito por Gietz et al. (1992). Éste es el más utilizado porque es sencillo, reproducible y con él se obtiene una elevada eficiencia de transformación ( $10^4$ - $10^6$  transformantes/ $\mu$ g DNA). Para ello, a partir de un glicerinado de la cepa de *S. cerevisiae* Y190 mediante triple estría, se sembró una placa con YPAD y se incubó a 30°C durante 2 días. 4-5 colonias aisladas se inocularon en 50 ml de medio YPAD y se incubaron en agitación (250 rpm) a 30°C durante toda la noche hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub> superior a 1. Posteriormente se diluyó el cultivo hasta alcanzar una D.O. final de 0.25 usando 300 ml de medio YPAD fresco, y se dejó incubando en agitación (250 rpm) 3h a 30°C para alcanzar una D.O.<sub>600</sub> de entre 0.4-0.8, correspondiente a la fase exponencial de crecimiento. Pasado este tiempo se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 min y a 2.500 rpm, las células se resuspendieron en 50 ml de TE 1x y se volvió a centrifugar a temperatura ambiente durante 5 min y a 2.500 rpm; este paso se repitió una vez más. Las células se resuspendieron en 1 ml de TE(1x)/LiAc(1x) preparado en el instante, y se centrifugó durante 30 seg a máxima velocidad; el pellet resultante se resuspendió en 250  $\mu$ l de TE(1x)/LiAc(1x). En este punto las células ya son competentes y se recomienda su uso inmediato para proceder a la transformación.

La preparación de células competentes cdc25H (a ó  $\alpha$ ) se hizo siguiendo las instrucciones del suministrador (Stratagene), donde a partir de un glicerinado de la cepa de *S. cerevisiae* cdc25H (a ó  $\alpha$ ) mediante triple estría, se sembró una placa con YPAD y se incubó a temperatura ambiente (22-25°C) durante 4 días. 4-5 colonias aisladas se inocularon en 1 ml de medio YPAD, agitando en vórtex hasta que las células quedaron totalmente resuspendidas. A continuación se transfirió la suspensión celular a matraces de 250 ml que contenían 50 ml de medio YPAD y se incubaron a temperatura ambiente (22-25°C), con agitación (250 rpm) durante 14-16 h hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub> superior a 1. Posteriormente se prepararon diluciones del cultivo crecido en matraces de 1 ó 2 litros para un volumen total de cultivo diluido de 300 ml y una D.O. final de 0.2, y se dejó incubando en agitación (250 rpm) 3h a 22-25°C; pasado ese tiempo el cultivo alcanzó una D.O.<sub>600</sub> superior a 0.7. Una vez acabada la incubación se sembraron 75  $\mu$ l ( $\approx 1 \times 10^6$  células) de cada cultivo en una placa de YPAD agar y se incubaron a 37°C. Las placas se observaron diariamente durante 4-6 días para evaluar la calidad de las células (apartado M.3.4.1.1). El resto del cultivo se centrifugó a 1.000xg a temperatura ambiente durante 5 min, resuspendiendo el pellet en 50 ml de agua destilada y estéril. A continuación se centrifugó de nuevo a 1.000xg a temperatura ambiente durante 10 min y el pellet se resuspendió en 50 ml de LISORB (LiOAc 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, Sorbitol 1 M); la suspensión celular se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Durante ese tiempo, para cada cultivo se pusieron 20 mg/ml de esperma de salmón (ssDNA) de pequeño tamaño, que evita las interacciones inespecíficas entre cadenas de ácidos nucleicos, en una baño con agua hirviendo durante 10 min, a continuación se añadieron 600  $\mu$ l de LISORB, enfriando posteriormente la mezcla a temperatura ambiente. Después de 30 min de incubación la suspensión celular se centrifugó a 1.000xg, 5 min a temperatura ambiente y el pellet se resuspendió en 300  $\mu$ l de LISORB. A 300  $\mu$ l de la mezcla anterior se le añadieron 600  $\mu$ l de la mezcla de esperma de salmón; por último se añadieron 5.4 ml de una solución de PEG/LiOAc y 530  $\mu$ l de DMSO y se prepararon alícuotas de 500  $\mu$ l, guardándose a -80°C o utilizándolas inmediatamente para obtener mejores resultados.

##### 3.4.1.1.- Evaluación de las células competentes.

La evaluación de la calidad de las células competentes de la cepa cdc25H se hizo por la eficiencia de la transformación y determinando la frecuencia de mutantes recesivos sensibles a temperatura. Para ello, se realizó un test de mutantes recesivos sensibles a temperatura utilizando dos placas control. La primera placa control contenía 75  $\mu$ l del cultivo de las células competentes. Después de la incubación a 37°C durante 4-6 días, esta placa no contenía más de 30 colonias, por lo que el

cultivo obtenido no presentaba un elevado número de mutantes recesivos sensibles a temperatura ni una contaminación con otro tipo celular. La observación contraria invalida cualquier transformación ensayada usando la correspondiente preparación de células competentes. La segunda placa control de la transformación número 1 contenía células transformadas con los vectores pSos y pMyr. Después de la incubación de estas placas a 37°C durante 4-6 días no aparecieron colonias. En caso contrario, ello indicaría que las células empleadas en la transformación contenían mutantes recesivos sensibles a temperatura o una contaminación con otro tipo celular. Esta observación invalidaría, como en el caso anterior, la transformación ensayada para detectar interacciones proteína-proteína con la correspondiente preparación de células competentes.

La eficiencia de la transformación de las células competentes se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ cfu} \times \text{Vol. Total Suspensión (500 } \mu\text{l)}}{\text{Vol. Plaqueado de transformación (} \mu\text{l)} \times \text{Cantidad DNA utilizado (2 } \mu\text{g)}} = \text{Cfu}/\mu\text{g DNA}$$

Este valor estuvo comprendido entre  $0.5 \times 10^3$  -  $1 \times 10^4$  cfu/ $\mu$ g DNA. El siguiente paso fue la evaluación de las transformaciones para detectar interacciones proteína-proteína, que se explica en el apartado 3.4.2.1.

### 3.4.2.- Transformación de células competentes.

El protocolo utilizado para la transformación de células competentes Y190 se ha modificado de Gietz et al. (1992). Básicamente se mezclaron 1  $\mu$ g de nuestra genoteca de cDNA en el vector pACT y 25  $\mu$ g de ssDNA (esperma de salmón, que debe colocarse durante 10 min en agua hirviendo y posteriormente en hielo) con 50  $\mu$ l de nuestras células competentes. A continuación se añadieron 300  $\mu$ l de una mezcla de PEG/TE1x/LiAc1x al 40% (PEG 50%, TE 10x, LiAc 10x), agitando en vortex para mezclarlo; la mezcla se incubó en agitación (250 rpm) a 30°C durante 30 min, y posteriormente durante 15 min a 42°C. Por último, se centrifugó y el pellet se resuspendió en 50-200  $\mu$ l de TE 1x. Finalmente se plaquearon las células en placas con medio SD/Glucosa que carecía del aminoácido apropiado para hacer la selección de un marcador de auxotrofia.

La transformación de las células competentes de la cepa cdc25H (a ó  $\alpha$ ) de *S. cerevisiae* se realizó siguiendo la técnica estándar descrita por los suministradores (Stratagene), según la cual estas transformaciones se utilizan para detectar interacciones proteína-proteína tal y como se muestra en la tabla M. IV.

A cada reacción se le añadieron 2  $\mu$ l de  $\beta$ -ME 1.4M, mezclándolo por inversión. Las suspensiones transformadas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min, mezclándolas ocasionalmente. A continuación se las sometió a un choque de calor durante 20 min a 42°C y se colocaron en hielo durante 3 min. Tras ese tiempo las suspensiones celulares se centrifugaron durante 30 seg a 14.000 rpm y a temperatura ambiente, resuspendiendo las células en 0.5 ml de sorbitol 1M. Las suspensiones se sembraron en placas de agar, como se indica en la tabla M. IV, utilizando aproximadamente 10 bolas de cristal no ácidas y estériles (425-600  $\mu$ m) (Merck) por placa. La mezcla se agitó hasta que se encontró distribuída homogéneamente por toda la placa, y se incubaron a temperatura ambiente (22-25°C) durante 4-6 días. En el caso de la transformación número 1, se sembraron distintas diluciones (10 y 100  $\mu$ l) en placas de SD/Glucosa (-UL) y se incubaron a temperatura ambiente (22-25°C) para determinar la eficiencia de la transformación; el resto se sembró en una placa de SD/Glucosa (-UL) y se incubó a 37°C, observando la placa diariamente durante 4-6 días para detectar los mutantes recesivos sensibles a temperatura.

Número	Plásmido(s)	Cantidad de plásmido	Vol. de células competentes de levaduras	Medio para plaquear
1 <sup>(a)</sup>	pSos + pMyr	2 µg/cada uno	500 µl	SD/Glucosa (-UL)
2	pSos MAFB	100 ng	100 µl	SD/Glucosa (-L)
3	pMyr SB	100 ng	100 µl	SD/Glucosa (-U)
4	pMyr Lamin C	100 ng	100 µl	SD/Glucosa (-U)
5 <sup>(b)</sup>	pSos MAFB + pMyr MAFB	300 ng/cada uno	100 µl	SD/Glucosa (-UL)
6 <sup>(c)</sup>	pSos MAFB + pMyr Lamin C	300 ng/cada uno	100 µl	SD/Glucosa (-UL)
7 <sup>(c)</sup>	pSos Col I + pMyr MAFB	300 ng/cada uno	100 µl	SD/Glucosa (-UL)
8 <sup>(b)</sup>	pSos MAFB + pMyr SB	300 ng/cada uno	100 µl	SD/Glucosa (-UL)
9	pSos Bait	100 ng	100 µl	SD/Glucosa (-L)
10 <sup>(c)</sup>	pSos Bait + pMyr Lamin C	300 ng/cada uno	100 µl	SD/Glucosa (-UL)
11 <sup>(d)</sup>	pSos Bait + pMyr SB	300 ng/cada uno	100 µl	SD/Glucosa (-UL)

**Tabla M. IV.:** Transformaciones para detectar interacciones proteína-proteína.

(a)Esta cotransformación se utiliza para determinar el número de levaduras que revierten y la eficiencia de la contranformación.

(b)Estas cotransformaciones sirven como controles positivos.

(c)Estas cotransformaciones sirven como controles negativos.

(d)Esta cotransformación es un control que confirma la integridad del vector pSos (la proteína SB expresada por pMyr SB interacciona con la proteína pSos expresada por pSos Bait para recuperar el crecimiento a 37°C cuando se plaquean en SD/Galactosa (-UL).

#### 3.4.2.1.- Evaluación de las transformaciones para la detección de interacciones proteína-proteína.

Las transformaciones de las reacciones 2, 3, 4 y 9 (tabla M.IV) contienen plásmidos sencillos; las colonias de estas placas se utilizaron en los ensayos de “mating” (apartado 6.2.3). Estas placas se guardaron a 4°C hasta su utilización.

El resto de transformaciones plaqueadas y crecidas a temperatura ambiente (22-25°C) se utilizaron para comparar el crecimiento experimental con el esperado, descrito en la tabla M.V.

Número	Plásmido(s) transformados	SD/Glucosa (-UL), (-U) o (-L)/25°C	SD (después del spotting)	
			Glucosa	Galactosa
1	pSos+pMyr	+	-	-
2	pSos MAFB	+	-	-
3	pMyr SB	+	-	-
4	pMyr LaminC	+	-	-
5	pSos MAFB + pMyr MAFB	+	-	+
6	pSos MAFB + pMyr LaminC	+	-	-
7	pSos Col I + pMyr MAFB	+	-	-
8	pSos MAFB + pMyr SB	+	-	+
9	pSos Bait	+	-	-
10	pSos Bait + pMyr Lamin C	+	-	-
11	pSos Bait + pMyr SB	+	-	+

**Tabla M.V.:** Crecimiento esperado en los medios selectivos.

Para ello se seleccionaron tres colonias de cada una de las transformaciones y se transfirieron a medios SD/Glucosa (-UL) y SD/Galactosa (-UL) para realizar el test de interacción proteína-proteína que permite el crecimiento a 37°C. Para cada colonia independiente, se utilizaron 25 µl de agua destilada y estéril en placas estériles de ELISA, resuspendiendo la colonia de levadura en el agua. Seguidamente se añadieron 2.5 µl de cada suspensión en cada una de las dos placas de SD/Glucosa (-UL) y SD/Galactosa (-UL) y se incubó una placa de cada tipo a 37°C, manteniendo la segunda placa a temperatura ambiente (22-25°C) durante 5 días. Al final de ese tiempo se comparó el crecimiento de nuestras placas con los resultados esperados descritos anteriormente.

#### 4.- ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

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

La obtención de DNA genómico de *Fagus sylvatica* (haya), se realizó utilizando el “DNA from Plant Tissue (Mini)” (Quiagen) siguiendo la técnica standard descrita por los suministradores. El material de partida fueron 100 mg de semillas que se homogeneizaron en mortero con nitrógeno líquido. El polvo obtenido se resuspendió en 400 µl de buffer de lisis (AP1) (formulación de la casa comercial), al que se añadieron 4 µl de RNasa A, y se dejó incubando durante 10 min a 65°C. A continuación se añadieron 130 µl del buffer de precipitación (AP2) (formulación de la casa comercial) y se incubó la mezcla en hielo durante 5 min con el objeto de precipitar y eliminar detergentes, proteínas y polisacáridos. Pasado el tiempo de incubación, el lisado se centrifugó durante 5 min a 20.000xg, el sobrenadante se transfirió a la columna denominada por la casa comercial QIAshredder y se centrifugó durante 2 min a 20.000xg. El sobrenadante resultante de este paso se transfirió a un tubo nuevo y se le añadieron 1.5 vol de buffer de unión (AP3/E) (formulación de la casa comercial). La mezcla se transfirió a la columna denominada DNeasy minispin y se centrifugó durante 1 min a 6.000xg. Se descartó el sobrenadante y a la columna se le añadieron 500 µl del buffer de lavado (AW) (formulación de la casa comercial) y se volvió a centrifugar durante 1 min a 6.000xg. Este paso de

lavado se repitió una vez más y finalmente se añadieron a la columna 100 µl del buffer de elución (AE) (formulación de la casa comercial). Se centrifugó de nuevo la columna y el sobrenadante resultante se almacenó a 4°C hasta su uso.

La técnica utilizada para la obtención de DNA genómico de *Arabidopsis thaliana* fue una adaptación de la de Aitchitt et al. (1993). El material de partida, 0.5-1 g de plántulas de *A. thaliana* crecidas durante diez días en medio Murashige & Skoog (MS) líquido, fue congelado en nitrógeno líquido y triturado en un mortero. El polvo obtenido fue incubado en 500 µl de tampón CTAB 3x [CTAB 3% (w/v), Tris-HCl 100 mM pH 8.0, EDTA 20 mM pH 8.0, NaCl 1.4 M y β-ME 1% (v/v)] durante 30 min a 65°C. A continuación, se añadieron 500 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se mezcló y se centrifugó durante 10 min a 14.000 rpm. Al sobrenadante se le añadieron otros 500 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó. Para llevar a cabo la precipitación, a la fase superior se le añadió 1 ml de etanol al 100% y 150 µl de NaAc 3M pH 5.2. Posteriormente se centrifugó 10 min a 14.000 rpm y el precipitado se resuspendió en 50 µl de agua estéril. Por último, se trató con RNasa pancreática libre de DNasa (10 µg/ml) para eliminar los restos de RNA, se incubó durante 30 min a 37°C y se estimó la cantidad de DNA obtenida por electroforesis en gel de agarosa (apartado M.4.7.1.), almacenándose posteriormente a -20°C.

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

El aislamiento rápido y a pequeña escala de DNA plasmídico a partir de *E. coli* se realizó con el “Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega), con el que se consiguen muestras de gran calidad. La técnica se basa en la descrita por Birnboim y Doly (1979) o de lisis alcalina, en que las células se lisan en presencia de NaOH y SDS, con pequeñas modificaciones. Básicamente, se inocularon 10 ml de medio LB suplementado con los antibióticos adecuados, con una colonia de bacterias procedente de placa o “stock” de glicerol y se incubó a 37°C toda la noche con agitación vigorosa (225 rpm). El cultivo resultante se centrifugó a 1.090xg durante 15 min a 4°C y se decantó el sobrenadante, dejando el precipitado tan seco como fue posible. El precipitado se resuspendió en 250 µl de una solución de Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, EDTA 10 mM y 100 µg/ml de RNasa A, manteniendo la mezcla durante 5 min a temperatura ambiente. Se añadieron 250 µl de una solución de NaOH 0.2 M y SDS al 1% para lisar las células. Se cerraron los tubos y se mezcló el contenido invirtiendo el tubo 4 veces. A continuación, se trató con 10 µl de proteasa alcalina durante no más de 5 min. Se añadieron 350 µl de una solución neutralizante de KAc 0.76 M (pH 4.2), ácido acético glacial 2.1 M e hidrocloreuro de guanidina 4.1 M. La muestra se centrifugó 10 min a 14.000xg, el sobrenadante se decantó en la columna de afinidad incluida en el kit y se aplicó vacío (Vac-Man™ Vacuum Manifold) hasta la total eliminación del líquido. Se lavó la columna 2 veces con 750 y 250 µl, respectivamente, de solución de lavado (acetato potásico 60 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 y etanol al 60%) a temperatura ambiente. Los restos de etanol se eliminaron con una centrifugación de 2 min a temperatura ambiente. Finalmente, se eluyó el material plasmídico con la adición de agua libre de DNasa y una centrifugación de 1 min a 14.000xg, almacenándose a -20°C.

#### 4.3.- Extracción y purificación de RNA total.

Como material de partida para la extracción de RNA de *F. sylvatica*, se utilizaron 2-3 g de semillas, una vez eliminados el pericarpio y la testa.

Las soluciones empleadas fueron preparadas con agua milliQ que contenía 0.4 ml de DEPC (inhibidor de RNasas) por litro de agua y esterilizadas previamente en autoclave durante 20 min a 120°C (excepto etanol, cloroformo y fenol). El material de vidrio se esterilizó de la misma manera. Todas las manipulaciones se realizaron a 4°C y sobre un baño de hielo.

El aislamiento de RNA de semillas se realizó mediante columnas de afinidad Qiagen tip-500 siguiendo las instrucciones del suministrador (Qiagen Inc. USA). El material vegetal fue triturado en nitrógeno líquido y homogenizado en 10 ml de tampón de lisis (Triton X-100 al 1%, MOPS 50 mM, pH 7.0, EDTA 50 mM, urea 2 M y β-mercaptoetanol al 5%). Se añadió un volumen de fenol/cloroformo (1:1) preparado según describen Sambrook et al. (1989), manteniéndose en agitación durante 15 min. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 5.000xg durante 10 min y a 4°C, recogiendo siempre la fase acuosa. Este paso se repitió de nuevo con un volumen de fenol/cloroformo (1:1) y por último con un volumen de cloroformo. A la fase acuosa resultante se le añadió NaCl hasta una concentración de 350 mM y se aplicó a la columna de afinidad Qiagen tip-500 previamente equilibrada

con 5 ml de tampón A (NaCl 400 mM, MOPS 50 mM, pH 7.0 y etanol al 15%). A continuación se lavó la columna con 20 ml de tampón A para eliminar proteínas, polisacáridos y otras impurezas, permaneciendo unidos a la resina únicamente RNA y DNA. El RNA se eluyó de la columna con 10 ml de tampón de elución (NaCl 1.05 M, MOPS 50 mM, pH 7.0, urea 2 M y etanol al 15%) y se le añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto, dejándolo precipitar durante toda la noche a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 12.000xg durante 20 min, se lavó el precipitado con etanol frío al 70% y se secó en corriente de nitrógeno. Por último, el precipitado de RNA se disolvió en un pequeño volumen de agua tratada con DEPC (200-500 µl) y se conservó congelado a -70°C.

Para la extracción de RNA de plántulas de *Arabidopsis thaliana* se utilizó el preparado “TRI Reagent<sup>®</sup>” (Ambión), siguiendo las instrucciones del suministrador. El material de partida para la extracción eran plántulas crecidas durante 10-12 días en medio MS líquido. Se utilizaron 100 mg de tejido congelado en nitrógeno líquido, que se disgregó en un tubo eppendorf utilizando bolas de vidrio de 425-600 microns (Sigma) y se homogeneizó en un Silamat S5 (Ivoclar Vivadent, Madrid) durante 20 seg. Se colocó en N<sub>2</sub> líquido para mantener congelado el tejido, se añadió 1 ml de “TRI Reagent<sup>®</sup>” por cada 100 mg de tejido y se agitó de nuevo en el Silamat durante 5-10 seg. A continuación se incubó 5 min a temperatura ambiente, se añadieron 200 µl de cloroformo agitando en un vórtex durante 20 seg y se incubó 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min a 4°C, se recogió la fase acuosa y se le añadieron 500 µl de isopropanol agitando de nuevo en vortex durante 10 seg. La mezcla se dejó incubando durante 30 min a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se le añadió 1 ml de etanol frío al 70%, se agitó en vortex y se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min. Finalmente, se eliminó el sobrenadante, se dejó secar durante 5 min y se resuspendió en 20-50 µl de agua tratada con DEPC.

#### 4.4.- Purificación de RNA poly (A<sup>+</sup>).

La purificación del RNA poly (A<sup>+</sup>) a partir de RNA total se realizó mediante 2 procedimientos diferentes; por cromatografía de afinidad en columnas de oligo(dT)-celulosa, utilizando el “mRNA Purification kit” (Pharmacia Biotech), y con el Poly(A<sup>+</sup>) Quick<sup>®</sup> mRNA Isolation kit” (Stratagene), este último para los ensayos de doble híbrido. El RNA de partida procedía de semillas de haya tratadas con ABA y GA<sub>3</sub> durante una semana.

En el primero, la columna fue previamente equilibrada con tampón de corrido hipersalino (Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, EDTA 1 mM, NaCl 0.5 M) y se centrifugó a baja velocidad (350xg) durante 2 min en centrífuga refrigerada con rotor oscilante. Previamente a la aplicación de las muestras, el RNA total se desnaturalizó a 65°C durante 5 min, se dejó enfriar en hielo hasta alcanzar temperatura ambiente y se añadieron 200 µl del tampón de la muestra (Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, EDTA 1 mM, NaCl 3 M). El sobrenadante se pasó a través de la columna y se lavó varias veces, primero con el tampón hipersalino y posteriormente con un tampón hiposalino (Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, EDTA 1 mM, NaCl 0.1 M), para eliminar el RNA poly (A<sup>-</sup>). El RNA poly (A<sup>+</sup>) retenido en la columna se eluyó con tampón de elución TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM y SDS 0.05%) tratado con DEPC y precalentado a 65°C. Al volumen eluido se le añadieron 100 µl del tampón de la muestra y 2.5 ml de etanol al 100%, y tras mantenerlo al menos dos horas a -20°C, se recogió el RNA poly (A<sup>+</sup>) por centrifugación a 12.000xg durante 15 min a 4°C. El precipitado se disolvió en 20-30 µl de agua, almacenándose hasta su utilización a -70°C.

En el segundo, para cada muestra que se procesó se transfirieron 5 ml de 0.04 g/ml de oligo(dT)-celulosa a un tubo de centrifuga libre de RNasa, se añadió la muestra de RNA y se agitó durante 15 min a temperatura ambiente para mantener la celulosa en suspensión. A continuación se centrifugó a 700xg durante 3 min a temperatura ambiente para formar el pellet de la resina, y se eliminó el sobrenadante; durante esta parte del proceso el mRNA poly(A<sup>+</sup>) permanece unido a la resina de oligo(dT)-celulosa. El precipitado se resuspendió dos veces en 5 ml de tampón hipersalino (formulación de la casa comercial), seguida de una centrifugación a 700xg durante 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente el precipitado se resuspendió en 5 ml de tampón hiposalino (formulación de la casa comercial), la muestra se centrifugó a 700xg durante 3 min, resuspendiendo de nuevo el precipitado en otros 5 ml de tampón hiposalino. Finalmente se pasó a través de una columna quedando empaquetado al final de la misma. A la columna empaquetada se le añadieron 400 µl de buffer de elución (formulación de la casa comercial) precalentado a 68°C, repitiéndose este paso dos veces más. El RNA eluido se recogió en tres tubos con aproximadamente unos 400 µl cada uno. Por recomendación del suministrador, para obtener mejor calidad en la construcción de la genoteca de

cDNA, se llevó a cabo un enriquecimiento del mRNA. Para ello se procedió a la combinación de los tres eluidos y se midió la  $D.O_{.260}$  de la muestra combinada, calculando la concentración de RNA con la siguiente fórmula:

$$D.O_{.260} \times \text{factor de dilución} \times \text{factor de conversión} = \text{concentración final}$$

Este valor fue mayor a 50  $\mu\text{g}$ . Utilizando la misma muestra se realizó una medida a 280 nm para ver la contaminación por proteínas. El ratio de  $D.O_{.260}/D.O_{.280}$  indica la pureza del RNA, en este caso se encontró entre 1.8-2.0, indicando una gran pureza. Posteriormente la muestra se calentó durante 5 min a 68°C. Durante ese tiempo se reequilibró la columna de oligo(dT)-celulosa añadiendo dos tampones teñidos de alto contenido en sal (1 ml de cada uno). El RNA desnaturalizado, se llevó a la misma molaridad que el tampón de alto contenido en sal añadiendo a la muestra 1/10 (v/v) de NaCl 5M para posteriormente pasarlo a través de la columna; el RNA eluido que se recogió, se volvió a pasar por la columna 3 veces más. Posteriormente, para eliminar cualquier resto de rRNA se lavó la columna con 3 ml de un tampón de bajo contenido en sal. Para eluir el mRNA se añadieron a la columna 400  $\mu\text{l}$  de buffer de elución precalentado a 68°C, este paso se repitió dos veces más, recogiendo el RNA eluido en tres tubos con aproximadamente 400  $\mu\text{l}$  cada uno. Para llevar a cabo la precipitación del mRNA se añadieron a cada tubo 40  $\mu\text{l}$  de acetato sódico 3 M y 1.1 ml de etanol 100% (v/v) y se centrifugaron durante 30 min a 14.000 rpm y a una temperatura comprendida entre 4-22°C. Se eliminó el sobrenadante y las muestras se secaron en una bomba de vacío durante 2-5 min. Finalmente el precipitado se resuspendió en buffer de elución y se almacenó a -70°C hasta su utilización.

#### 4.5.- Cuantificación de ácidos nucleicos.

La determinación de la concentración del DNA y RNA se realizó midiendo la absorbancia de las soluciones a 260 nm en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1603) y considerando que una unidad de densidad óptica  $D.O_{.260}$  equivale a 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de RNA y 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de DNA. También se midió la  $D.O.$  a 235 y 280 nm para determinar la pureza de la muestra y el grado de contaminación en azúcares y proteínas, respectivamente; sólo se utilizaron las muestras cuya relación  $D.O_{260}/D.O_{280}$  era próxima a 2 para el RNA y 1.7 para el DNA. Para los ensayos en los que la pureza de la muestra tenía máxima importancia, los parámetros anteriores se midieron en el espectrofotómetro ultrasensible de medición de ácidos nucleicos (Nanodrop Technologies Inc.), que a través de un programa informático, proporciona los  $\text{ng}/\mu\text{l}$  de DNA o RNA presentes en la muestra.

#### 4.6.- Tratamiento y modificación del DNA.

##### 4.6.1.- Digestión del DNA con enzimas de restricción.

Los tratamientos con endonucleasas de restricción se realizaron de forma rutinaria para la caracterización física de los fragmentos de DNA, la separación de insertos de cDNA del plásmido y la construcción de moléculas recombinantes. Las enzimas utilizadas, que hidrolizan las moléculas del DNA en secuencias nucleotídicas específicas, fueron: *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Nco*I, *Nde*I, *Pvu*II, *Kpn*I y *Xho*I, entre otras. Las digestiones de las muestras con estas enzimas se realizaron siguiendo las especificaciones de los suministradores (Roche, Fermentas) o siguiendo las condiciones más generales descritas por Sambrook et al. (1989). La temperatura a la que se realizaron las incubaciones fue de 30°C o de 37°C dependiendo de las enzimas utilizadas, mientras que los tiempos de incubación variaron desde 2 horas a toda la noche.

##### 4.6.2.- Ligación del DNA: T4 DNA ligasa.

La construcción de moléculas recombinantes obtenidas por inserción de fragmentos de DNA en vectores plasmídicos apropiados, se realizó utilizando la DNA ligasa del fago T4 (Roche), enzima que cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre moléculas que presentan extremos tanto cohesivos como romos.

Para ello se linealizó el plásmido con las enzimas apropiadas, siendo posteriormente purificado. También se purificó el inserto de DNA y se calculó la cantidad a utilizar en la reacción, según la fórmula:

$$X \text{ ng de inserto de DNA} = 3 \times (Y \text{ pb inserto de DNA}) \times (\text{ng vector}) / (\text{pb vector})$$

La reacción de ligación se realizó mezclando el DNA, en una relación 3 veces proporcional del inserto respecto al vector (3:1), con DNA ligasa (1U), en una mezcla que contenía Tris-HCl 66 mM, pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 1 mM y ATP 1 mM, e incubándose a 14-16°C durante 24 horas. Con la mezcla de ligamiento se transformó *E. coli*, plaqueándose en medio selectivo (suplementado con antibiótico) para identificar las colonias portadoras de plásmidos recombinantes.

#### 4.6.3.- Obtención de cDNA: Transcriptasa inversa.

Para la síntesis de la primera cadena de cDNA a partir de RNA se empleó la transcriptasa inversa SuperScript™ II RT (derivada de M-MLV RT, Invitrogen).

La transcripción inversa se realizó a partir de 5 µg de RNA total obtenido de semillas tratadas con ácido abscísico (ABA) y con ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), utilizando el “SuperScript™ First- Strand cDNA Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen), a partir del iniciador oligo(dT)<sub>12-18</sub>. A la muestra de RNA se le añadieron dNTPs 10 mM, Oligo(dT)<sub>12-18</sub> (0.5 µg/µl) y se completó con agua tratada con DEPC hasta un volumen final de 10 µl. La mezcla fue desnaturalizada a 65°C durante 5 min y mantenida en hielo durante al menos 1 min. Posteriormente, se le añadieron 9 µl de la mezcla de reacción [10X RT Buffer (Tris-HCl 200 mM pH 8.4, KCl 500 mM), MgCl<sub>2</sub> 25 mM, DTT 0.1 M y 40U de RNasa OUT™] y se incubó durante 2 min a 42°C. Pasado ese tiempo se le añadieron 50U de la enzima SuperScript™ II RT y se incubó 50 min a 42°C. Para terminar, la reacción se puso durante 15 min a 70°C y posteriormente se dejó en hielo. Finalmente se añadieron 2U de RNasa H y se incubó durante 20 min a 37°C. El cDNA resultante se almacenó a -20°C hasta su utilización posterior en el marcaje radiactivo (apartado 4.8) o como molde en las reacciones de PCR (apartado 4.10).

Otras transcriptasas inversas utilizadas fueron StrataScript™ RT (derivada de MMLV-RT sin actividad RNasa H detectable, Stratagene (apartado 5.2) y BD PowerScript™ RT (derivada de MMLV-RT, BD Biosciences) (apartado 4.12.2).

#### 4.6.4.- Otras enzimas modificadoras.

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

- Fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa I de *E. coli* (Roche), utilizado para el marcaje radiactivo de fragmentos de DNA (apartado 4.8).
- Taq DNA polimerasa (Stratagene), enzima aislada de *Thermus aquaticus* y fundamental en la técnica de PCR (apartado 4.10).
- Fosfatasa alcalina (Promega): en clonajes en los que el vector se religa fácilmente, es aconsejable emplear fosfatasa alcalina de mucosa intestinal de ternera (CIP) para desfosforilar los extremos cohesivos o extremos romos del vector. Para esta reacción se mezclaron 1 µg del DNA plasmídico linealizado, 10 µl de Tampón CIP 10x (suministrado por la casa comercial), 1U de CIP por cada 2 pmol de vector y agua estéril hasta un volumen final de 100 µl. Tras un pulso de centrifugación, se incubó la mezcla durante 30 min a 37°C, posteriormente se trató con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y luego con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Finalmente, se precipitó el DNA y se resuspendió en 50 µl de 1xTE, pH 7.4.

### 4.7.- Electroforesis de ácidos nucleicos: separación de fragmentos.

#### 4.7.1.- Geles de agarosa.

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

Para las electroforesis de DNA, los geles se prepararon en tampón TAE (Tris/acetato 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8.0) y en ellos se incorporó bromuro de etidio, a una concentración final de 0.5 µg/ml, como agente intercalante para visualizar los fragmentos de DNA en un transiluminador con luz ultravioleta (302 nm). Las muestras se mezclaron con tampón de la muestra (10x) Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, glicerol 50%, azul de bromofenol 0.25% y xylene cyanol 0.25%. Las electroforesis se realizaron a 70-100 voltios.

En algunos casos (construcción de la genoteca de doble híbrido de *F. sylvatica* (apartado 6.2.1)), fue aconsejable el uso de SYBR<sup>®</sup> Green II RNA Gel Satín (Molecular Probes) como agente intercalante para visualizar los fragmentos de DNA, en lugar de bromuro de etidio. Éste fue preparado a una dilución 1:5.000 en TBE (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 1 mM pH 8). Los geles se cubrieron con la solución y se mantuvieron en agitación durante 20-40 min. Posteriormente los fragmentos de DNA se visualizaron en un transiluminador con luz ultravioleta (302 nm).

Los distintos tipos de RNA fueron separados en geles de agarosa al 1.5% que contenían (para 100 ml): 1.5 g de agarosa, 2 ml de tampón fosfato 1 M, pH 6.8 y agua hasta 92 ml y, una vez disuelto por calentamiento, se añadieron 8 ml de formaldehído (37% v/v) como agente desnaturizante para evitar la formación de estructuras secundarias. Las muestras de RNA total (10 µg) (apartado 4.3) fueron desnaturizadas por calentamiento a 65°C durante 15 min en un tampón doblemente concentrado que contenía formamida desionizada al 50%, tampón sodio-fosfato 40 mM, pH 6.8, EDTA 20 mM, pH 7.5, formaldehído al 6% y bromuro de etidio a una concentración de 0.2 µg/ml, que va a permitir la visualización del RNA en un transiluminador de luz ultravioleta. Después de enfriar las muestras en hielo se añadió tampón de la muestra (10x). La electroforesis se desarrolló a 40 V durante 5-6 horas, utilizando un tampón de corrido que contenía 6.5 ml de tampón sodio-fosfato 1 M, pH 6.8, 48.5 ml de formaldehído al 37% y agua hasta 600 ml. La cubeta en la que se desarrolló la electroforesis había sido pretratada con agua con DEPC al menos durante 12 horas.

El tamaño de los distintos fragmentos de DNA se estimó por comparación con los marcadores de DNA del fago λ digerido con *EcoRI* y *HindIII* (Sigma) para pesos moleculares entre 21 y 0.5 kb. Para tamaños menores (0.1-2 kb), se usó la escalera de 100 pb "DNA Ladder" (Gibco BRL). Por su parte, para el RNA se utilizaron los marcadores de RNA de Promega, con un rango de 0.28-6.58 kb.

#### 4.7.2.- Purificación de fragmentos de DNA.

Cuando fue necesario aislar determinados fragmentos de DNA para su posterior uso y caracterización (obtención de sondas, subclonación, etc.), se realizó la purificación de dichos fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa utilizando el "GeneClean Turbo Nucleic Acid Purification kit" (Bio 101 Systems, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante. Tras la incubación del DNA con las enzimas de restricción adecuadas y la separación de los fragmentos por electroforesis, se cortó el fragmento de interés del gel de agarosa con un bisturí estéril. El trozo de agarosa se introdujo en un tubo Eppendorf, se añadió 1 µl de "GeneClean turbo salt" (formulación de la casa comercial) por cada mg de gel de agarosa y se incubó en un baño a 55°C durante 5 min, mezclando el contenido cada 2 min. Una vez disuelta la agarosa, se transfirió a un "GeneClean Turbo Cartridge" (Eppendorf), se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. Se lavó el precipitado con 500 µl de la solución de lavado ("Turbo Wash", preparado comercial), se centrifugó 5 seg, se repitió el lavado y se centrifugó durante 4 min para eliminar cualquier resto de solución de lavado. Finalmente se añadieron 30 µl de una solución de elución (formulación de la casa comercial), se dejó 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó 1 min. Esta última centrifugación permitió obtener el sobrenadante que contenía el DNA, que se almacenó a -20°C.

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

La técnica utilizada para el marcaje de fragmentos de DNA se hizo con el kit "Rediprime II Random Prime Labelling System" (Amersham Biosciences). Siguiendo las instrucciones del suministrador, se diluyó el DNA (2.5-25 ng) en 45 µl de Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 y EDTA 1 mM, se desnaturizó el DNA por calor a 95-100°C durante 5 min y luego se mantuvo en hielo otros 5 min, pasados los cuales se centrifugó brevemente y se añadió a la reacción de marcaje, que contenía dATP, dGTP, dTTP, enzima *Klenow* libre de exonucleasa y oligonucleótidos al azar. Posteriormente se añadieron 4-5 µl de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (3.000 Ci/mmol) (Amersham), se mezcló hasta obtener un color púrpura y se incubó a 37°C durante 1 hora. Para parar la reacción se añadieron 5 µl de EDTA 0.2 M. Antes de usar la sonda en las reacciones de hibridación, se eliminó el exceso de nucleótidos usando las

columnas “Mini Quick Spin DNA” de Roche. La matriz de la columna se resuspendió mediante agitación vigorosa, se centrifugó a 1.000xg durante 1 min para eliminar el exceso de tampón, se depositó la sonda en el centro de la matriz y se centrifugó de nuevo a 1.000xg durante 4 min. El eluido se recogió en un eppendorf que contenía la sonda purificada sin los nucleótidos no incorporados. A continuación se midió la relación sonda:columna (>2:1) y por último, se desnaturalizó la sonda por incubación a 95-100°C durante 5 min seguida de otros 5 min en hielo.

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

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

La transferencia de los fragmentos de DNA a una membrana de nitrocelulosa o nylon se llevó a cabo por la técnica de Southern blot (Southern, 1975), en la que el DNA (obtenido de *F. sylvatica* o de *A. thaliana* (apartado 4.1)), es digerido con enzimas de restricción, separado por electroforesis en gel de agarosa (apartado 4.7.1), desnaturalizado, y transferido a la membrana por fuerzas de capilaridad. Finalmente la membrana es expuesta 2 min en un Stratalinker (UV) 1800 (Stratagene) para fijar el DNA a la misma, y ya puede ser usada para la hibridación con una sonda radiactiva (apartado 4.9.3).

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

Esta técnica sirve para separar y transferir distintos tipos de RNA, separados por electroforesis, a membranas de nylon para su posterior hibridación con una sonda radiactiva.

Los RNAs sometidos a electroforesis (apartado 4.7.1), fueron transferidos a un filtro de nylon (Hybond-N, Amersham) siguiendo un proceso parecido al descrito para el Southern, salvo que no es necesario un proceso de desnaturalización.

##### **4.9.3.- Hibridación y autorradiografía.**

En la hibridación de los ácidos nucleicos con las correspondientes sondas, las membranas Hybond-N fueron prehibridadas durante 3-5 horas a 42°C (para Northern blot) o a 65°C (para Southern blot) en una solución que contenía formamida desionizada 50%, SDS 0.1%, SSC 5x y solución Denhardt's 5x (BSA 2% w/v, ficoll 2% y polivinilpirrolidona 2%). Una vez concluida la prehibridación, se añadió la sonda radiactiva, previamente desnaturalizada, y se mantuvo la hibridación toda la noche. Al día siguiente, los filtros fueron lavados dos veces con SSC 2x y SDS 0.1% durante 5 min cada vez y otras dos veces con SSC 0.5x y SDS 0.1% durante 20 min cada vez.

Una vez terminados los lavados, el último paso fue cubrir los filtros con una película plástica y exponerlos a películas de autorradiografía (Kodak X-Omat AR) con pantallas intensificadoras durante 2-7 días a -70°C. El revelado de las películas se llevó a cabo manualmente, para lo cual se introdujeron en una solución reveladora (Kodak X-Ray Developer) en una proporción (1:4) revelador/agua durante 5 min agitando suavemente y, tras un lavado en agua, se pasaron a una solución fijadora (Kodak X-Ray Fixer) en una proporción (1:3) fijador/agua durante 2-3 min. Finalmente se lavaron en agua y se secaron al aire.

Para la cuantificación de las autorradiografías se utilizó el analizador de imágenes “Bio-imaging analyzer” Bas-1500 (Fujifilm) con placas de imagen Bas-IP 2040S (20x40 cm).

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

##### **4.10.1.- Técnica de PCR.**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se emplea para amplificar clones o fragmentos de cDNA comprendidos entre dos regiones de secuencia conocida. Para ello se precisan dos oligonucleótidos de diferente secuencia y complementarios al extremo 3' de cada una de las hebras del DNA molde.

La mezcla de amplificación, para un volumen final de 100  $\mu$ l, contenía DNA molde (<1  $\mu$ g), 100 pmol de cada uno de los oligonucleótidos (sentido y antisentido), dNTPs 200  $\mu$ M, tampón de la polimerasa 1x (Tris-HCl 10 mM, pH 8.3, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM) y Taq polimerasa 2.5-5 U. En muchas ocasiones se empleó DMSO al 5% para aumentar la especificidad de la reacción.

En la reacción, el DNA a amplificar fue previamente desnaturalizado por calor en presencia de un exceso molar de los oligonucleótidos y de los cuatro dNTPs, y después la mezcla se enfrió hasta una temperatura adecuada para el anillamiento con la secuencia molde. La temperatura de anillamiento se calculó con el programa Oligo 4.05, dependiendo de la longitud y composición de los oligonucleótidos utilizados, siguiendo la fórmula:  $2(A+T) + 4(G+C)$ . Una vez producido el anillamiento, los oligonucleótidos fueron extendidos con la polimerasa, que sintetiza el nuevo DNA en dirección 5'  $\rightarrow$  3', utilizando un termociclador Applied Biosystems GeneAmp® PCR Systems. El tiempo de extensión aproximado fue de 1 min por kb. Las condiciones de temperaturas y tiempos empleados en las distintas reacciones de PCR fueron diferentes dependiendo de cada caso, y se detallan en los apartados correspondientes.

#### 4.10.2.- Análisis de la expresión por RT-PCR.

El método de RT-PCR consiste en una reacción de PCR en la que se emplea como molde la cadena de cDNA resultante de la transcripción inversa del RNA procedente de una determinada muestra a analizar, lo que permite detectar la expresión de mensajeros poco abundantes.

Como control interno se utilizó mRNA para ubiquitina (Ubi) (Horvath et al., 1993). El gen *Ubi* consiste en un pentámero (Watts y Moore, 1989) y los cebadores de *Ubi* van a hibridar al final de cada unidad simple, originando 5 fragmentos de diferente tamaño.

El cDNA de la ubiquitina y el de los genes en estudio fueron amplificados 25 ciclos (94°C, 1 min; 50°C, 1 min; 72°C, 1.5 min) en cada uno de los tratamientos empleados.

Las muestras del cDNA amplificado (20  $\mu$ l) se separaron en un gel de agarosa al 1.5%, se transfirieron a una membrana de Nylon (apartado 4.9.1) y se visualizaron por hibridación con la sonda radiactiva (apartado 4.9.3).

#### 4.11.- Secuenciación del DNA.

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

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

#### 4.12.- Amplificación del extremo 5' (RACE).

La amplificación del extremo 5' del clon de cDNA FsPTP1 se realizó con el kit "BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit" (BD Biosciences), que se basa en la amplificación de secuencias de DNA a partir de RNA poly(A<sup>+</sup>) o RNA total, entre un lugar interno de secuencia definida y secuencias desconocidas del extremo 5' ó 3'.

##### 4.12.1.- Diseño de oligos.

Para el diseño de oligos se siguieron las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Al realizarse la amplificación sólo por el extremo 5' (5'-CAAGTGGGCGAACTCCTGGTTGAG-3'), se obtuvo un oligo antisentido específico del gen (GSPs) cuyas características son las siguientes: longitud entre 23-28 nucleótidos, 50-70 % contenido en GC y Tm entre 65-70°C.

#### 4.12.2.- Síntesis de la primera cadena de cDNA.

Como material de partida se utilizó 1 µg de RNA poly(A<sup>+</sup>) de *F. sylvatica* (apartado 4.4), al que se le añadió 1 µl de “5′-RACE CDS primer” [el cual posee dos posiciones de nucleótidos degenerados en el extremo 3′[5′-(T)<sub>25</sub>V N-3′, que se colocan al principio de la cola de poly A<sup>+</sup>, eliminándose de esta manera la heterogeneidad que se produce con los oligo(dT) convencionales], 1 µl de BD SMART II A oligo (5′-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3′ (este oligo contiene unos residuos de G en su extremo terminal que anillan con la cola de cDNA rica en dC y sirve como molde para la RT) y se completó con agua estéril hasta un volumen final de 5 µl. La mezcla se incubó durante 2 min a 70°C y se mantuvo en hielo durante otros 2 min. A continuación se le añadieron los siguientes compuestos: 2 µl de Buffer First-Strand 5x (Tris-HCl 250 mM pH 8.3, KCl 375 mM y MgCl<sub>2</sub> 30 mM), 1 µl DTT 20 mM, 1 µl dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP y dTTP, cada uno a una concentración de 10 mM) y 1µl de BD PowerScript transcriptasa reversa. Posteriormente la mezcla se incubó durante 1.5 h a 42°C y el producto de la reacción se diluyó en 250 µl de Tricine-EDTA buffer (Tricine-KOH 10 mM pH 8.5, EDTA 1 mM). Finalmente a la muestra se le dio un choque de calor a 72°C durante 7 min. A partir de este momento la muestra puede ser guardada a -20°C durante 3 meses o continuar con la “amplificación rápida de los extremos de cDNA (RACE)” (apartado 4.12.3).

#### 4.12.3.- Amplificación rápida de los extremos de cDNA (RACE).

Mediante esta reacción se generan fragmentos de cDNA del extremo 5′. Por cada 50 µl de reacción de PCR se preparó una mezcla con los siguientes componentes: 34.5 µl de agua, 5 µl de BD Advantage 2 PCR Buffer 10x (formulación de la casa comercial), 1 µl de dNTP mix (10 mM) y 1 µl de BD Advantage 2 Polymerase Mix 50x (formulación de la casa comercial). Para los controles positivos y negativos se utilizaron los “primers Control 5′-RACE TFR” (10 µM) y Universal Primer A Mix 10x (UPM). Para el RACE-5′ se prepararon las reacciones de PCR que se muestran en la tabla M.VI.

Componente	1 5′-RACE Muestra	2 5′-TFR (Control +)	3 GSP 1 + 2 (Control +)	4 UPM (Control -)	5 GSP1 (Control -)
5′-RACE preparado de cDNA (experimental)	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl
UPM (10X)	5 µl	5 µl	-	5 µl	-
GSP1 (10 µM)	1 µl	-	1 µl	-	1 µl
GSP2 (10 µM)	-	-	1 µl	-	-
Control 5′- RACE TFR Primer (10 µM)	-	1 µl	-	-	-
H <sub>2</sub> O	-	-	4 µl	1 µl	5 µl
Master Mix	41.5 µl	41.5 µl	41.5 µl	41.5 µl	41.5 µl
Volumen final	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

**Tabla M.VI.:** Reacciones de PCR para el RACE-5′.

Posteriormente el cDNA se amplificó durante 25 ciclos (94°C, 10 min, 94°C, 30 seg, 68°C, 30 seg, 72°C, 2 min, y finalmente se terminó la reacción a 72°C durante 10 min. 10 µl del producto de

PCR obtenido se utilizaron como molde para una segunda reacción de PCR, añadiendo los mismos componentes que anteriormente y repitiendo las mismas condiciones de amplificación. Finalmente, se caracterizó el producto obtenido por RACE mediante electroforesis en gel de agarosa (apartado 4.7.1) y por secuenciación (apartado 4.11).

#### 4.13.- Utilización de una genoteca de cDNA.

##### 4.13.1.- Características de la genoteca de cDNA.

La genoteca de cDNA utilizada había sido previamente construída en nuestro Laboratorio por el Dr. C. Nicolás (Nicolás et al., 1996) a partir de RNA poly (A<sup>+</sup>) obtenido de semillas de *F. sylvatica* utilizando el “ZAP-cDNA Synthesis kit” (Stratagene).

##### 4.13.2.- Búsqueda de clones completos en la genoteca.

Los fragmentos obtenidos por RT-PCR para los clones FsPTP1 y FsGASA4 (apartado 4.10.2) se utilizaron para la búsqueda de los clones completos en la genoteca descrita en el apartado anterior. Para ello, el fragmento se marcó radiactivamente según se describe en el apartado 4.8. Se hicieron dos réplicas de la genoteca, de aproximadamente 50.000 pfu cada una, en membranas de nylon (Hybond-N+, Amersham), hibridándose cada una de ellas con la sonda correspondiente al fragmento estudiado, como se indica en el apartado 4.9.3. Se recogieron los recombinantes que hibridaban con la sonda (detectados por autorradiografía) y con ellos se repitió el mismo proceso, pero esta vez las réplicas se hicieron con no más de 1.000 pfu para que los halos de lisis quedaran suficientemente aislados. Posteriormente, se procedió a la escisión *in vivo* y recircularización de los plásmidos seleccionados que contenían los insertos clonados.

##### 4.13.3.- Escisión *in vivo*.

La escisión eficiente del fagémido pBluescript a partir del vector Uni-ZAP XR se logró utilizando el sistema ExAssist/SOLR (“ExAssist Interference-Resistant Helper Phage”, Stratagene), donde el fago ayudador posee una mutación que impide su replicación en la cepa SOLR (no supresora). Las células de *E. coli* usadas para la escisión *in vivo* (XL1Blue MRF<sup>+</sup>) pueden ser eliminadas del sobrenadante por calentamiento a 70°C. Para la producción de DNA de doble cadena, el DNA de pBluescript empaquetado fue mezclado con células recientes de *E. coli* (SOLR, donde no se produce la co-infección por el fago ayudador) y extendidas sobre placas de LB suplementadas con ampicilina y kanamicina, para producir colonias.

El DNA plasmídico procedente de minipreparaciones de estas colonias puede ser usado para el análisis de los insertos de DNA, incluyendo secuenciación, subclonación, mapeo y expresión.

## 5.- INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA. DOBLE HÍBRIDO.

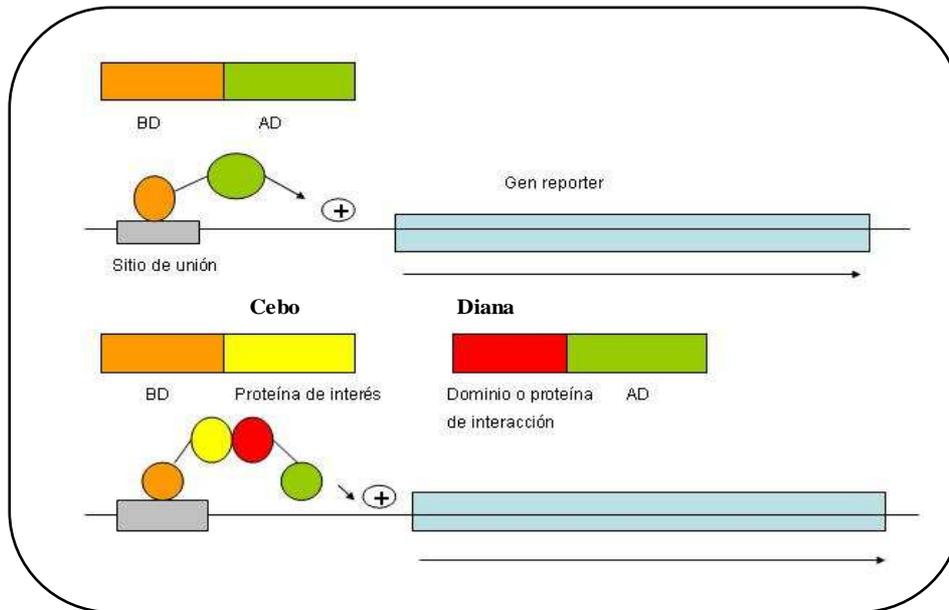
### 5.1.- Ensayo de doble híbrido para *A. thaliana*.

Esta técnica se utiliza para caracterizar interacciones proteína-proteína. El sistema se basa en la organización modular de ciertos factores de transcripción. En un principio se utilizó la proteína de levadura GAL4, que activa al gen *lacZ* (utilizado como gen marcador), aunque posteriormente en otros estudios se ha utilizado la proteína LexA de *E. coli*. GAL4 posee un dominio de unión al DNA (BD) y un dominio de activación (AD), consiguiéndose dos tipos de híbridos:

1.Híbrido BD: Se encuentra en el plásmido utilizado como cebo, y contiene el dominio de unión al DNA de GAL4 fusionado con la proteína de interés (proteína cebo). La proteína de fusión por sí misma puede unirse al DNA, pero no puede activar la transcripción porque carece del dominio de activación.

**2. Híbrido AD:** Se encuentra en otro plásmido diferente al anterior, y contiene el dominio de activación de GAL4 fusionado a una proteína específica o a diferentes proteínas que provienen de una genoteca, normalmente se trata de una genoteca de DNA recombinante.

Ambas proteínas se expresan en la misma célula de levadura. Cuando GAL4 se une a su sitio de unión y se produce una interacción entre sus dos dominios, el dominio de activación es llevado hacia el promotor, lo que le permite interaccionar con la maquinaria de transcripción, dando como resultado la activación del factor de transcripción, normalmente el gen *lacZ* (Figura M.4). Posteriormente, las que den expresión del gen marcador serán identificadas y purificadas para una mejor caracterización.



**Figura M.4.:** Diagrama esquemático de la ruta de la interacción proteína-proteína en el sistema de doble híbrido para *Arabidopsis thaliana*.

Las cepas de levadura, vectores, mapas y la genoteca de cDNA en el vector  $\lambda$ ACT fueron suministrados por el "Arabidopsis Biological Resource Center. DNA Stock Center".

La genoteca  $\lambda$ ACT se había construido con mRNA aislado de hojas y raíces maduras de *Arabidopsis*. Los insertos de cDNA tenían un tamaño mayor de 300 pb y se habían insertado en los sitios *XhoI* de  $\lambda$ ACT, obteniéndose  $1.9 \times 10^6$  transformantes primarios, de los que al menos el 70% eran recombinantes. La titulación obtenida fue de  $5 \times 10^8$  pfu/ml, teniendo que ser comprobada posteriormente.

### 5.1.1.- Excisión del $\lambda$ ACT.

Para este paso se siguieron las especificaciones del suministrador, según las cuales se creció la cepa de *E. coli* BNN132 (apartado 1.2) en 20 ml de medio LB que contenía maltosa al 0.2%, a 37°C y 125 rpm durante toda la noche, hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento ( $D.O_{600} = 0.8$ ), se centrifugó a 500xg durante 10 min y se resuspendió el pellet en 10 ml de  $MgSO_4$  10mM. A continuación se incubaron  $10^8$  fagos de la genoteca amplificada con 2 ml de las células BNN132 resuspendidas en  $MgSO_4$  10mM ( $3 \times 10^8$  células/ml) y se mantuvieron a 30°C durante 30 min sin agitación. Pasado ese tiempo se añadieron 2 ml de medio LB y se incubó la mezcla en un horno de hibridación a 30°C durante 1 h. A continuación se sembraron 200  $\mu$ l de las células en placas de 150 mm de LB/ampicilina (50  $\mu$ g/ml)/glucosa 0.2% y se incubaron durante toda la noche a 37°C.

### 5.1.2.- Subclonación del gen de interés en el vector pAS1.

El gen utilizado para el ensayo de doble híbrido fue *FsGASA4*, que había sido aislado previamente en nuestro laboratorio. Este gen se empleó para la transformación de la cepa Y190 de *S. cerevisiae*, utilizando el vector pAS1 (Figura M.3.M., Tabla M.II) que contiene el dominio GAL4 de unión a DNA.

Para la realización de la construcción pAS1-*FsGASA4*, la región codificante del cDNA correspondiente a *FsGASA4* fue amplificada por PCR, utilizando los oligonucleótidos que se detallan a continuación:

- *FsGASA4* sentido: 5'-CATATGGCTAAGTTTGTGCTACC-3'
- *FsGASA4* antisentido: 5'-GGATCCTCAAGGGCACTTGGGGC-3'

Las condiciones empleadas en la PCR fueron 94°C, 10 min, 94°C, 1 min, 59°C, 1 min, 72°C, 1 min durante 30 ciclos y 72°C, 10 min; finalmente se mantuvieron a 4°C. Posteriormente, el cDNA amplificado se subclonó en el sitio *NdeI-BamHI* del vector pAS1, utilizándose en la transformación de la cepa Y190 (aparatados 3.4.1 y 3.4.2) seleccionada en medio SD/glucosa (-Triptófano). A continuación se verificó la expresión de la proteína de fusión por análisis de Western Blot, en el que se utilizó un anticuerpo monoclonal de conejo anti-HA (Sigma) que inmunoreacciona con la proteína HA (Influenza hemagglutinin). Para ello se utilizaron extractos proteicos de la cepa de levadura Y190 crecida hasta saturación, que se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE según el método de Laemmli (1970). Los extractos proteicos se transfirieron a membranas de PVDF (Amersham Biosciences, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante y usando un equipo de transferencia Trans-Blot Cell (Bio-Rad, USA).

Las membranas se lavaron durante 20 seg en tampón sodio fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  80 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM) a pH 7,5 con NaCl 100 mM y se incubaron toda la noche a 4°C con la solución de bloqueo del kit ECL Advance Western Blotting Detection (Amersham Biosciences, USA) para saturar la superficie sin proteínas y evitar uniones inespecíficas.

Al día siguiente, las membranas se lavaron durante 5 minutos con TBS-Tween (Tris base 20 mM pH 7.6, NaCl 500 mM y Tween 20 al 0.1% v/v) y a continuación se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente, con distintas diluciones del anticuerpo primario (entre 1:1.000 y 1:500). Posteriormente, las membranas se lavaron con TBS-Tween (un lavado de 1 h seguido de 3 lavados de 15 min) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo [Anti-Conejo IgG (H+L) con una peroxidasa acoplada; Sigma] diluido 1:60.000 en la solución de bloqueo.

Tras la incubación, las membranas se lavaron con TBS-Tween (un lavado de 1 h seguido de 3 lavados de 15 min) y el revelado se llevó a cabo mezclando en proporción 1:1 (v/v) las 2 soluciones de revelado del kit ECL Advance Western Blotting Detection (Amersham Biosciences, USA) e incubando las membranas 5 min a temperatura ambiente. Tras retirar el exceso de revelador, las membranas se expusieron a una película autorradiográfica Hyperfilm™ ECL (Amersham Biosciences, USA).

### 5.1.3.- Ensayo de doble híbrido.

Antes de iniciar los ensayos de doble híbrido, se comprobó que la proteína cebo en el plásmido pAS1 era incapaz de activar de forma autónoma el gen marcador (HIS3). Para ello se probó el crecimiento de la cepa Y190 en diferentes concentraciones de 3-aminotriazol (3-AT). Se sembraron colonias de la cepa Y190 que contenían la construcción pAS1-*FsGASA4* y las que llevaban el vector vacío como control, en placas de SD/glucosa (-His, -Trp) suplementadas con diferentes concentraciones de 3-AT (0, 5, 10, 25, 50 ó 75 mM). Como control se sembró una placa de SD/glucosa (-Trp). Las placas se incubaron durante una semana a 30°C y posteriormente se comparó el crecimiento de las cepas transformadas con el vector vacío y las transformadas con la construcción pAS1-*FsGASA4*, comprobándose que, a una baja concentración de 3-AT (5 mM), se inhibía la expresión endógena del gen marcador.

Para determinar la eficiencia de la transformación, se sembraron 100  $\mu\text{l}$  de diluciones  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  en medio SD/glucosa (-Leu,-Trp). El número de transformantes para cada reacción de transformación estuvo comprendido entre  $10^4$  y  $10^5$  cfu/ $\mu\text{g}$  DNA.

El resto de cada reacción de transformación se sembró en una placa de 150 mm que contenía medio SD/glucosa (-Leu,-His-Trp) suplementado con 3-AT 5 mM y se incubaron a 30°C entre 3 y 10 días. Los positivos se comprobaron por activación del segundo gen marcador (LacZ) mediante el "ensayo en filtro de la  $\beta$ -Galactosidasa". Para ello se crecieron en una nueva placa de medio

SD/glucosa (-Leu,-His-Trp) suplementado con 3-AT 5 mM, y se incubaron a 30°C entre 1 y 3 días. Posteriormente las células de levadura se levantaron con ayuda de un filtro de nitrocelulosa reforzada (Optiran BA-S 85, 0.45 µm, Schleicher and Schuell), éste se colocó sobre una bandeja de poliestileno y se vertió nitrógeno líquido sobre él. Se dejó descongelar el filtro y de nuevo se volvió a verter nitrógeno líquido. Una vez descongelado se colocó en una placa petri de 150 mm sobre papel de filtro Whatman empapado en buffer Z (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 60 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 40 mM, KCl 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM) y al que se le añadió, en el momento, β-mercaptoetanol 50 mM y X-Gal (0.3 mg/ml). Las placas se incubaron a 30°C entre 15 min a varias horas, mirando periódicamente las manchas azules.

El análisis de los positivos se realizó por PCR, tomando muestras de las colonias seleccionadas y pasándolas a agua destilada y estéril (50 µl). A continuación se mantuvieron durante 5 min en agua hirviendo y se centrifugaron durante 1 min a 12.000xg. Finalmente se tomaron 10 µl del sobrenadante, que se utilizaron como molde para la reacción de PCR. Los oligonucleótidos empleados, que se diseñaron a partir de la región colindante al sitio de clonación múltiple del vector pACT, se denominaron:

- MAN 5 sentido: 5'-AGGGATGTTTAATACCACTAC-3'
- Oligo 38 antisentido: 5'-CACGATGCACAGTTGAAGTG-3'

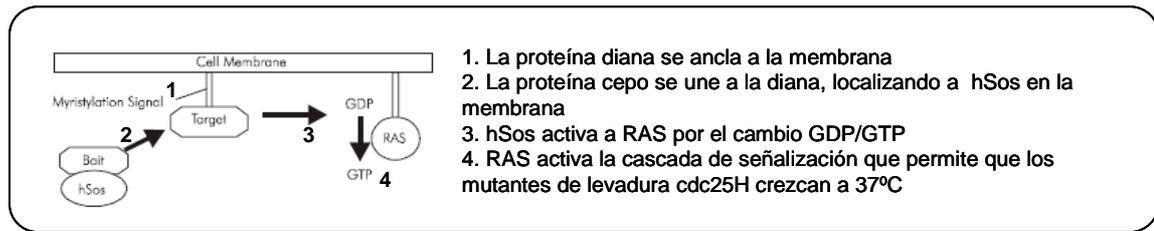
Las condiciones empleadas en la PCR fueron: 94°C, 10 min, 94°C, 1 min, 50°C, 1 min, 72°C, 3 min durante 30 ciclos y 72°C, 10 min; finalmente se mantuvieron a 4°C. Los fragmentos amplificados fueron analizados mediante secuenciación (apartado 4.11).

## 5.2.- Ensayo de doble híbrido para *F. sylvatica*.

Para la realización de la técnica de doble híbrido en *F. sylvatica* se utilizó el kit “CytoTrap<sup>®</sup> XR Library Construction” (Stratagene), el cual detecta interacciones proteína-proteína *in vivo*. Este sistema se basa en la generación de proteínas de fusión cuya interacción en el citoplasma de la levadura activa la cascada de señalización Ras, induciendo el crecimiento celular. De esta forma se pueden estudiar interacciones de proteínas que pueden ser activadores o represores transcripcionales, proteínas que requieran una modificación post-transduccional en el citoplasma y proteínas que sean tóxicas para las propias levaduras.

La cepa utilizada fue la cdc25H de *S. cerevisiae*, cepa mutante sensible a temperatura con una mutación en el aminoácido 1328 del gen *CDC25*. El gen *CDC25* tiene su homólogo en el gen humano *Sos* (*hSos*), el cual codifica un factor que cambia el guanil nucleótido que se une y activa a Ras, comenzando la ruta de señalización de la misma. La mutación *cdc25* presente en esta cepa permite el crecimiento a 25°C pero no a 37°C. Este sistema de interacción se basa en la capacidad de la proteína humana *Sos* (*hSos*) para complementar el defecto *cdc25* y activar la ruta de señalización Ras en levaduras. La expresión de *hSos* y su posterior localización en la membrana plasmática (debido a la interacción de las proteínas del doble híbrido) permite que la cepa *cdc25H* pueda crecer a 37°C.

El DNA que codifica la proteína de interés (“bait protein”) es clonado en el sitio de clonación múltiple (MCS) del vector pSos, generando una proteína de fusión entre *hSos* y la proteína de interés. El DNA que codifica la genoteca de expresión (proteína diana) es clonado en el MCS del vector pMyr y se expresa como una proteína de fusión, con una secuencia de miristilación que ancla a la proteína de fusión a la membrana. Estas proteínas de fusión se coexpresan en la cepa *cdc25H*, incubándose éstas a la temperatura restrictiva de 37°C. Si la proteína de interés y la genoteca de expresión interactúan físicamente, entonces la proteína *hSos* es llevada a la membrana plasmática activando la ruta de señalización Ras y permitiendo el crecimiento a 37°C de la cepa *cdc25H* (Figura M.5).



**Figura M.5:** Diagrama esquemático del mecanismo de activación de la proteína Ras utilizada en el sistema de doble híbrido CytoTrap.

### 5.2.1.- Construcción de la genoteca.

Para la construcción de una genoteca de expresión de *F. sylvatica* se siguieron las instrucciones del suministrador. Se partió de un lote de semillas tratadas con ABA, a las que se les extrajo el RNA total (apartado 4.3), y a partir del cual se procedió a la purificación de RNA poly(A<sup>+</sup>) (apartado 4.4). El primer paso en la construcción de la genoteca fue la síntesis de la primera cadena de cDNA seguido de la síntesis de la segunda cadena de cDNA, siguiendo las instrucciones del fabricante (Stratagene). Los fragmentos de cDNA se trataron con la polimerasa *Pfu* para obtener extremos romos a los cuales se ligaron adaptadores *EcoRI* con las siguientes secuencias:



Estos adaptadores tenían una longitud de 10 y 14 pb, complementarios cada uno para un extremo cohesivo *EcoRI*. Mientras que el oligonucleótido de 10 pb se fosforilaba, permitiendo su unión a otro extremo romo disponible en el cDNA y a otros adaptadores, el oligonucleótido de 14 pb permanecía desfosforilado para evitar que se ligara a otros extremos cohesivos. Una vez que se completó la ligación de los adaptadores y la ligasa se inactivó por calor, el oligonucleótido de 14 pb se fosforiló para posibilitar su ligación al vector desfosforilado.

La digestión con la enzima *XhoI* libera el adaptador *EcoRI* y el oligo residual unido al extremo 3' del cDNA. Estos dos fragmentos fueron posteriormente separados por una columna de goteo que contenía una suspensión uniforme del gel de Sepharosa CL-2B (éste separa las moléculas en base a su tamaño, fluyendo primero las moléculas más grandes de cDNA, luego las más pequeñas y finalmente los nucleótidos no incorporados). Se recogieron 12 fracciones, conteniendo cada una aproximadamente unos 100  $\mu$ l. Se utilizó una alícuota de 8  $\mu$ l para comprobar los tamaños fraccionados y determinar qué fracciones serían utilizadas para la ligación, mediante separación en gel de acrilamida no desnaturalizante al 5%. La cuantificación del DNA se realizó con SYBR Green por visualización en luz ultravioleta.

El siguiente paso fue la ligación del cDNA, tanto de la muestra de cDNA como del inserto control XR LacZ (10 ng/ $\mu$ l), al vector pMyr XR, siguiendo las instrucciones del fabricante (Stratagene) para, posteriormente, transformar las células ultracompetentes XL10-Gold (apartado 3.3.2.).

### 5.2.2.- Construcción del plásmido cebo.

El DNA que codifica la proteína cebo debe prepararse para insertarse en el vector pSos, ya sea por digestión con enzimas de restricción o por amplificación por PCR, y debe insertarse de tal forma que se exprese en la misma fase de lectura que la proteína hSos.

Para la realización de la construcción pSos-*FsGASA4*, la región codificante del cDNA correspondiente a *FsGASA4* fue amplificada por PCR, utilizando los oligonucleótidos que se detallan a continuación:



Las condiciones empleadas en la PCR fueron 94°C, 10 min, 94°C, 1 min, 60°C, 1 min, 72°C, 1 min durante 30 ciclos y 72°C, 10 min; finalmente se mantuvieron a 4°C. Posteriormente, el cDNA amplificado se subclonó en el sitio *BamHI-NotI* del vector pSos siguiendo las instrucciones del

fabricante. La reacción contenía 1 µl del vector pSos (0.1 µg/µl), 1 ó 2 µl de inserto (0.1µg/µl), 1 µl rATP 10 mM pH 7.0, 1 µl buffer ligasa 10x, 0.5 µl T<sub>4</sub> DNA ligasa y agua destilada hasta un volumen final de 10 µl. Se prepararon tres reacciones control, una sin vector (para comprobar que el inserto no está contaminado con el vector), una sin inserto (para comprobar la efectividad del tratamiento con la fosfatasa alcalina) y otra sin inserto y sin T<sub>4</sub> DNA ligasa (para comprobar la existencia de restos de vectores no digeridos). Las reacciones se incubaron a 12°C durante toda la noche. A continuación se procedió a la transformación de células competentes DH5α de *E. coli* (apartado 3.3.2), se seleccionaron colonias aisladas para la extracción y purificación de DNA plasmídico (apartado 4.2) y se secuenciaron los insertos (apartado 4.11) para comprobar que nuestro DNA se expresa en fase con el dominio Sos y que no presenta mutaciones.

La expresión de la proteína cebo se verificó por análisis de Western Blot, utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón [anticuerpo anti-Sos (BD Biosciences)] que inmunoreacciona con la proteína hSos, siguiendo un protocolo similar al descrito en el apartado 6.1.2. Para ello se utilizaron extractos proteicos de la cepa de levadura *cdc25H* crecida hasta saturación y como anticuerpo secundario se utilizó Anti-Mouse IgG (H+L) con una peroxidasa acoplada (Sigma, USA), diluido 1:100.000 en la solución de bloqueo.

### 5.2.3.- Ensayo de doble híbrido.

Antes de iniciar los ensayos de doble híbrido, el vector pSos “bait” (con el gen de interés) se debe cotransformar en la célula de levadura hospedadora con el vector pMyr o pMyr Lamin C para comprobar que la proteína cebo no interacciona con la señal de miristilación proporcionada por estos plásmidos de control negativo. Si hubiera crecimiento a 37°C podría deberse a que la proteína cebo contiene secuencias que la hacen ir a la membrana. Esto puede resolverse eliminando esas porciones, sin embargo, estas deleciones podrían eliminar porciones de la proteína requeridas para la interacción con las proteínas de la genoteca.

Los plásmidos cebo y diana se introdujeron en la cepa de levadura *cdc25H* por cotransformación, de esta forma se limita el número de generaciones que crecen antes del ensayo de interacción y se reducen los falsos positivos. La cotransformación es muy útil cuando el plásmido cebo es tóxico para las células, lo cual se determina comparando las curvas de crecimiento de las células de levadura competentes *cdc25H* que contienen el plásmido cebo y las que contienen el plásmido pSos Col I crecidas en medio selectivo.

Se prepararon células competentes *cdc25H* (apartado 3.4.1) y se transformaron para detectar interacciones proteína-proteína (apartado 3.4.2). Posteriormente se procedió a la evaluación de las transformaciones preparadas para detectar interacciones proteína-proteína (apartado 3.4.2.1). Las colonias de las transformaciones que contenían plásmidos simples se utilizaron en los ensayos de “mating”, donde se siguió el método standard suministrado por el fabricante. Básicamente se tomaron 25 µl de agua estéril por cada colonia y se colocaron en los pocillos de una placa de ELISA, las combinaciones que se hicieron así como los resultados esperados se muestran en la tabla M VII:

Transformación de levadura	SD(UL)/25°C	SD(-UL)/37°C	
		Glucosa	Galactosa
Tipo “mating” (a)	Tipo “mating” (α)		
pSos MAFB <sup>a</sup>	pMyr SB	+	+
pSos MAFB <sup>b</sup>	pMyr Lamin C	+	-
pSos Bait <sup>c</sup>	pMyr SB	+	+

**Tabla M. VII.**

<sup>a</sup> Control positivo.

<sup>b</sup> Control negativo.

<sup>c</sup> Control que confirma la integridad del vector pSos (la proteína SB expresada por el vector pMyr SB interacciona con la proteína Sos expresada en el vector pSos bait para recuperar el crecimiento a 37°C cuando se crecen en placas de SD/Galactosa(-UL)).

A continuación, 2.5 µl de cada suspensión de levaduras se incubaron en una placa YPAD a temperatura ambiente (22-25°C) durante 24 horas. Pasado ese tiempo se pasaron las células crecidas a pocillos independientes de placas ELISA, preparándose dos placas SD/Glucosa(-UL) y otras dos placas de SD/Galactosa(-UL). Se colocó una placa de cada tipo a 37°C mientras que las otras se

mantuvieron a temperatura ambiente (22-25°C). El crecimiento a 37°C se observó después de 5 días de incubación, comparándolo con los datos de la tabla M. VII.

#### 5.2.4.- Escrutinio de la genoteca.

La genoteca de cDNA en el vector pMyr y las colonias cotransformantes pSos “bait” se seleccionaron como sensibles a temperatura, y posteriormente se identificó a los posibles candidatos a 37°C, comprobándose mediante dos rondas de crecimiento dependiente de galactosa a 37°C.

##### 5.2.4.1.- Cotransformación e identificación de los posibles positivos.

Para ello se siguieron las pautas marcadas por el fabricante (Stratagene), donde a 10 ml de células competentes cdc25H( $\alpha$ ) preparadas del día (apartado 3.4.1), se añadieron 40  $\mu$ g de la construcción de la proteína cebo en pSos, 40  $\mu$ g de la genoteca de cDNA en el vector pMyr y 200  $\mu$ l de 1.4 M  $\beta$ -mercaptoetanol. El contenido se mezcló por inversión hasta obtener una mezcla homogénea y se separó en 20 tubos Eppendorf. Como control negativo, en otro tubo se añadieron a 500  $\mu$ l de células competentes de levadura, 2  $\mu$ g del vector pSos, 2  $\mu$ g de la genoteca de cDNA en el vector pMyr y 10  $\mu$ l de 1.4 M  $\beta$ -mercaptoetanol. Las transformaciones se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente (22-25°C), mezclándolas de modo ocasional. A continuación se les dio un choque de calor durante 20 min a 42°C y se colocaron en hielo durante otros 3 min. Las células se recogieron por centrifugación durante 30 seg a 14000 rpm y a temperatura ambiente (22-25°C), resuspendiéndolas en 0.5 ml de sorbitol 1 M. Cada reacción de transformación se creció en placas de SD/glucosa(-UL), utilizando aproximadamente 10 bolas de cristal de 425-600  $\mu$ m para asegurar el reparto homogéneo en la placa. Las placas se incubaron a temperatura ambiente (22-25°C) durante 48 horas. Pasado ese tiempo se hizo una réplica de los transformantes en placas SD/Galactosa (-UL), incubándolas a 37°C. Las placas de SD/Glucosa (-UL) se mantuvieron a temperatura ambiente para determinar la eficiencia de la transformación, que estuvo comprendida entre  $1 \times 10^4$ - $2 \times 10^4$  colonias. Para ello se empleó la siguiente fórmula:

$$[\text{N}^\circ \text{ de cfu} \times \text{Volumen total de la suspensión (500 } \mu\text{l)}] / [\text{Vol. de transformación plaqueada} \times \text{Cantidad de DNA utilizado (2 } \mu\text{g)}] = \text{cfu}/\mu\text{g DNA}$$

Al cabo de seis días se procedió a evaluar las réplicas de la transformación en SD/Galactosa (-UL). Para reprimir al promotor GAL1 (que conduce la expresión de la genoteca) del vector pMyr, se pasaron colonias de estas placas a otras de SD/Glucosa (-UL) y se incubaron a temperatura ambiente (22-25°C) durante 48 horas. Posteriormente se volvieron a traspasar colonias de estas últimas placas a dos nuevas placas de SD/Glucosa (-UL) y a otra de SD/Galactosa (-UL), siendo ésta la primera prueba para identificar posibles interacciones. Una placa de SD/Glucosa(-UL) y la de SD/Galactosa(-UL) se incubaron a 37°C durante 48 horas, mientras que se mantuvo la otra placa de SD/Glucosa(-UL) a temperatura ambiente (22-25°C). Pasadas las 48 horas se evaluó la prueba de interacción primaria identificando las colonias que crecieron a 37°C en placas de SD/Galactosa(-UL) pero no en las de SD/Glucosa(-UL). A continuación se realizó una prueba de interacción secundaria, pasando los posibles candidatos crecidos en la placa de SD/Glucosa(-UL) mantenida a temperatura ambiente, a una placa de SD/Glucosa(-UL) y a otra de SD/Galactosa(-UL) que se incubaron a 37°C durante 48 horas. Las colonias que crecieron en placas de SD/Galactosa(-UL) pero no en las de SD/Glucosa(-UL) a 37°C, tanto en las pruebas de interacción primaria como secundaria, se consideraron posibles positivos y se utilizaron para a su posterior análisis.

Los positivos se analizaron mediante PCR (apartado 6.1.3). Como oligonucleótidos se emplearon los del vector pMyr (Myr 5' primer: 5'-ACTACTAGCAGCTGTAATAC-3', Myr 3' primer: 5'-CGTGAATGTAAGCGTGACAT-3'). Las condiciones para la amplificación fueron 94°C-10 min, 30 ciclos a 94°C-1 min, 54°C-1 min, 72°C-30 seg, y finalmente 72°C-10 min. Los fragmentos amplificados fueron analizados mediante secuenciación (apartado 4.11).

## 6.- OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS.

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

#### 6.1.1.- Construcciones para la transformación de plantas de *A. thaliana*.

Los genes utilizados en la generación de plantas transgénicas fueron *FsPTP1* y *FsGASA4*. Estos genes se emplearon para la transformación de plantas de *A. thaliana* por medio de *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando el vector binario pBI 121 (Bevan, 1984) (Figura M.1.D, Tabla M.II).

El T-DNA de este vector contiene el gen marcador *GUS* ( $\beta$ -glucuronidasa) bajo el control del promotor 35S, y el gen *NPTII* (neomicina fosfotransferasa II) que confiere resistencia a kanamicina. La bacteria *A. tumefaciens* introducirá en las células vegetales las construcciones preparadas dentro del fragmento de T-DNA, que se encuentra entre las regiones denominadas LB y RB (“left border” y “right border”) del plásmido pBI 121.

Para la realización de las construcciones *pBI-FsPTP1* y *pBI-FsGASA4*, las regiones codificantes de los cDNAs correspondientes a *FsPTP1* y *FsGASA4* fueron amplificadas por PCR, utilizando en cada caso los oligonucleótidos que se detallan a continuación:

- *FsPTP1* transgén sentido: 5'-GGATCCATGGCCGCTACCTCTTC-3'
- *FsPTP1* transgén antisentido: 5'-CAGCTGTCATTTTGAGCTCCTCTCTG-3'
- *FsGASA4* transgén sentido: 5'-GGATCCATGGCTAAGTTTGTT-3'
- *FsGASA4* transgén antisentido: 5'-CCTAGGTACCGATTCAAACAA2Q-3'

Posteriormente, los cDNAs amplificados se subclonaron en el sitio *Bam*HI-*Sac*I del vector binario pBI 121 para la construcción *pBI-FsGASA4*, y en el sitio *Bam*HI-*Pvu*II para la construcción *pBI-FsPTP1*.

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

*A. tumefaciens* es una bacteria gram negativa que infecta a diferentes especies de plantas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. La cepa de *A. tumefaciens* utilizada en nuestros experimentos fue la C58C1, que contiene el plásmido Ti desarmado pGV2260 (Deblaere et al., 1985). Dentro del plásmido Ti se encuentra el T-DNA, en el que se inserta la construcción de interés, y este fragmento se integra en el genoma de la planta por un proceso de transferencia para el que se requiere el gen de virulencia (*vir*) presente en el plásmido pGV2260.

Para la obtención de células competentes de esta cepa de *Agrobacterium*, se preparó un cultivo saturado de células en 10 ml de medio LB líquido suplementado con rifampicina (0.14 mg/ml), incubando a 28 °C durante 2-3 días. Con 1 ml de este cultivo se inocularon 100 ml de LB, los cuales se incubaron a 28°C durante una noche hasta que la D.O.<sub>600</sub> fue de 0.5-1.0. Las células de este cultivo se recogieron por centrifugación a 3.000 rpm durante 20 min y a 4°C, y se lavaron dos veces con agua Milli Q estéril a 4°C. Las células obtenidas se resuspendieron en 4 ml de glicerol al 10% a 4°C, y esta suspensión se dividió en fracciones de 0.4 ml, que se almacenaron a -70°C.

#### 6.1.3.- Transformación de *A. tumefaciens* mediante electroporación.

Estas células competentes se transformaron con las construcciones *pBI121-FsGASA4* o *pBI121-FsPTP1* por electroporación (Dower et al., 1988). Para ello, se utilizaron cubetas de electroporación de 0.2 cm de anchura y las condiciones fueron 2 kV, 1 k $\Omega$  y 25  $\mu$ F. A una suspensión de 0.4 ml de células competentes se le añadieron 0.1-0.5  $\mu$ g del plásmido recombinante. Inmediatamente después de la electroporación, se añadió 1 ml de medio SOC a las células y se incubaron a 28°C durante 2-3 horas. Los transformantes se seleccionaron en placas con medio LB sólido suplementado con kanamicina (50  $\mu$ g/ml).

#### 6.1.4.- Extracción de plásmidos de *A. tumefaciens*.

Para confirmar que las células transformadas contenían la construcción adecuada, se realizó una extracción de los plásmidos, a partir de un cultivo saturado de las cepas transformadas en medio LB con kanamicina. Las células de 1 ml de cultivo se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 100 µl de tampón de lisis (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 7.5, EDTA 10 mM y 4 mg/ml de lisozima) a 4°C. La suspensión se agitó vigorosamente durante 10 seg y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Se volvió a agitar y se le añadieron 200 µl de NaOH 0.2 M con SDS al 1%. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante otros 30 min, al cabo de los cuales se añadieron 150 µl de NaAc 3M (pH 4.8), se mezcló y se incubó en hielo durante 5 min. Tras centrifugar a 12.000 rpm durante 5 min, al sobrenadante se le añadió un volumen igual de fenol:cloroformo (1:1), se mezcló mediante agitación y se volvió a centrifugar. De nuevo se recogió el sobrenadante, se le añadió 1 ml de etanol absoluto frío, se mezcló y después de una última centrifugación, el precipitado se resuspendió en 50 µl de agua.

#### 6.1.5.-Infiltración de plantas de *Arabidopsis thaliana* con *Agrobacterium tumefaciens*.

La transformación de *Arabidopsis* por medio de *A. tumefaciens* se realizó por el método de infiltración *in planta* (Clough y Bent, 1998). Este procedimiento ofrece varias ventajas frente a los métodos que requieren un proceso de cultivo *in vitro*. La transformación de plantas enteras no requiere regeneración de tejidos *in vitro*, lo que evita la variación somaclonal, y además, se reduce el tiempo requerido para obtener individuos transformados.

Se utilizó un cultivo saturado de *A. tumefaciens* para inocular 200 ml de medio LB (3:200). Este cultivo se incubó a 28°C durante 24 horas, las células se recogieron por centrifugación (3.000 rpm, 15 min a 4°C) y se resuspendieron en 400 ml de solución de infiltración [MgCl<sub>2</sub> 10 mM, sacarosa al 5%, detergente Silwet L-77 al 0.02% (v/v), MES 1 g/l y BAP (benzilaminopurina) 44 nM].

Las plantas de *A. thaliana* (ecotipo Col-0 y ecotipo Cvi) que iban a ser infiltradas, se crecieron en macetas (10-15 semillas por maceta) en las condiciones ya descritas (apartado 2.3) durante 6 semanas. Siete días antes de proceder a la transformación, se podaron las inflorescencias primarias para estimular la producción de inflorescencias secundarias. Para la inoculación de las plantas con *A. tumefaciens*, se colocaron 400 ml de la suspensión de *A. tumefaciens* en un recipiente de plástico, sobre el que se colocó la maceta con las plantas en floración en posición invertida, de modo que la parte aérea de la planta quedara sumergida en la suspensión celular.

Cuando la bacteria se pone en contacto con los capullos florales de *Arabidopsis*, la bacteria infecta al tejido. En este periodo de contacto, la bacteria transfiere al tejido el T-DNA del plásmido Ti, que se integra en el material genético de sus células, transcribiéndose más tarde como si fuera un gen propio de la planta.

Para cada construcción del pBI 121 producida, se infiltraron seis macetas. Después de la infiltración, las plantas se mantuvieron en un fitotrón en las mismas condiciones de crecimiento (apartado 2.3) durante 2-3 días y cubiertas con plástico, para evitar la pérdida de humedad y favorecer su recuperación.

#### 6.2.- Selección de semillas transgénicas.

Las plantas infiltradas (T0) se incubaron en un fitotrón hasta la producción de semillas en las condiciones ya descritas (apartado 2.3). Las semillas de estas plantas se recolectaron y se secaron a temperatura ambiente durante 2-5 días. Tras esterilizar la superficie de las semillas (apartado 2.1), se eliminó la dormición por estratificación durante 48 horas a 4 °C y se colocaron en placas con medio MS suplementado con kanamicina (50 µg/ml). Además se añadió cefotaxima (250 µg/ml) para evitar contaminaciones con *Agrobacterium*. Estas placas se incubaron a 21-24°C, con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad y una humedad del 70%. Las semillas se germinaron y crecieron hasta que emergieron las hojas primarias (10 días). En este momento se pudo diferenciar entre las semillas resistentes a kanamicina (generación T1) y las no resistentes (semillas no transformadas), ya que las primeras eran capaces de germinar y formar plántulas perfectamente desarrolladas.

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

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

El análisis estadístico de la segregación de la resistencia a kanamicina de las plantas T2, se realizó calculando el valor  $\chi^2$  con la corrección de Yates, cuya fórmula es la siguiente:

$$\chi^2_{\text{corr}} = \sum (|O-E| - 1/2)^2/E$$

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

El valor obtenido se comparó con los valores de la tabla de  $\chi^2$  para un grado de libertad. Si el valor obtenido corresponde a una probabilidad mayor de 0.5, la desviación obtenida no es significativa y, por lo tanto, los datos se ajustan aceptablemente a la hipótesis (Parker, 1989).

### 6.2.2.- Caracterización molecular de las plantas transgénicas.

Un grupo de 25-30 plántulas correspondientes a líneas T3 homocigotas para el gen insertado y resistentes a kanamicina, se transfirieron de las placas a un medio MS líquido y se utilizaron como material para extraer el RNA. Las muestras de ácidos nucleicos obtenidas se utilizaron para el análisis por Northern blot (apartado 4.9.2), que se realizó en condiciones restrictivas y utilizando como sonda la secuencia de la fase de lectura abierta del cDNA correspondiente al gen *FsPTP1* o bien la correspondiente al gen *FsGASA4*.

La obtención del DNA genómico de las líneas transgénicas nos permitió, por medio de PCR, usando oligonucleótidos específicos para cada transgén, confirmar la presencia de *FsPTP1* o *FsGASA4*, respectivamente, en el genoma de las líneas elegidas. Los oligos usados fueron:

- GASA4 sentido: 5'-ATGGCTAAGTTTGTGCTACCTT-3'
- GASA4 antisentido: 5'-GCACTTGGGGCCTCCTTCCTTGGT-3'
- PTP1 sentido: 5'-ATGGCCGCTACCTCTTCC-3'
- PTP1 antisentido: 5'-CTGGATGAAGTTATTGGCCT-3'

El análisis por Southern blot, nos permitió saber cuantas copias del transgén correspondiente estaban presentes en nuestras líneas transgénicas, para comprobar el número de copias del transgén.

### 6.2.3.- Caracterización fenotípica de las plantas transgénicas.

Para la caracterización fenotípica de estas líneas transgénicas analizamos varios aspectos fisiológicos mediante diferentes ensayos:

#### 1. Ensayos de dormición.

En el ensayo de dormición, se analizaron los porcentajes de germinación de semillas control (ecotipo Col-0 y ecotipo Cvi) y las transgénicas, que habían sido estratificadas durante 0, 24 y 120 horas a 4°C en oscuridad y posteriormente mantenidas en una cámara de germinación a 21°C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz.

#### 2. Ensayo de sensibilidad de las semillas a diferentes fitohormonas.

Se analizaron los porcentajes de germinación de las semillas en presencia de diferentes concentraciones de ABA (0.3-50  $\mu$ M) para estudiar la sensibilidad a esta hormona.

Del mismo modo, se realizaron ensayos de germinación en presencia de GA<sub>3</sub> (50-100  $\mu$ M), paclobutrazol (PCB, inhibidor síntesis giberelinas)(1-50  $\mu$ M) y ácido salicílico (0.25  $\mu$ M-1 mM)

#### 3. Ensayo de sensibilidad de las semillas a estrés osmótico y salino.

Se analizaron los porcentajes de germinación de las semillas de las plantas transgénicas en relación a los de las semillas control, en presencia de diferentes concentraciones de NaCl (100-300 mM) o de manitol (200-400 mM).

#### 4. Ensayo de sensibilidad de las semillas a estrés oxidativo.

Se analizaron los porcentajes de germinación de las semillas de las plantas transgénicas en relación a los de las semillas control y los mutantes con una inserción de T-DNA en presencia de paraquat (0.5 mM) y de paraquat (0.5 mM) suplementado con GA<sub>3</sub> (50 μM).

#### 5. Ensayo del contenido de Malondialdehído (MDA).

Para medir el daño oxidativo provocado por diferentes tipos de estrés se analizó el contenido de MDA (sustancia que reacciona con el ácido tiobarbitúrico, TBA), utilizando la técnica descrita por Wen et al. (2008). Para ello se crecieron diferentes tipos de plantas durante 7 días en diferentes tratamientos. El tejido vegetal (100 mg) congelado en nitrógeno líquido se homogeneizó en un Silamat S5 (Ivoclar Vivadent, Madrid) durante 20 seg utilizando bolas de vidrio de 425-600 microns (Sigma). Se colocó en N<sub>2</sub> líquido para mantener congelado el tejido, se añadió 1 ml de ácido tricloroacético 10% (TCA) y se agitó de nuevo en el Silamat durante 5-10 seg. A continuación, se centrifugó durante 10 min a 8.000xg; al sobrenadante se le añadió 1 ml de TCA 10% que contenía TBA 0,6%. La mezcla se calentó durante 30 min a 95°C y posteriormente se colocó en hielo. A continuación, se centrifugó durante 10 min a 8.000xg, se midió la D.O. del sobrenadante a 450, 532 y 600 nm. La concentración de MDA se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:  $6.45 \times (A_{532} - A_{600}) - 0.56 \times A_{450}$ .

#### 6. Determinación del tamaño celular.

Para comprobar las posibles diferencias en el tamaño de las células del tallo y las hojas de las líneas transgénicas respecto al tipo silvestre (Col-0) utilizado como control, pequeñas secciones de tejido (≈2 mm) se sumergieron en 500 μl de tampón Na-P 0.1 M, pH 7.2 que contenía paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0.25%, y se mantuvieron en una burbuja de vacío durante una hora a temperatura ambiente. Este tratamiento se repitió cuatro veces renovando el tampón de fijación cada vez, y se dejaron toda la noche a 4°C dentro del fijador pero sin vacío. Posteriormente, los tejidos se lavaron cuatro veces con tampón Na-P 0.1 M, pH 7.2 bajo vacío, durante 30 min cada vez.

El material ya fijado se analizó en el Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Salamanca, donde las muestras se deshidrataron y recibieron un baño de oro previo a su visualización en un microscopio electrónico de barrido.

#### 7. Ensayo de transpiración.

Los ensayos de transpiración se realizaron para analizar la pérdida de humedad en las plantas transgénicas de *Arabidopsis*. Para ello, se cortaron hojas del mismo estado de desarrollo y a diferentes tiempos (0, 10, 20, 40 y 80 min) y se realizaron las medidas del peso fresco a temperatura ambiente. Para la visualización directa de los estomas, diferentes muestras de hojas se observaron al microscopio electrónico de barrido, como se indica en el apartado anterior.

#### 8. Ensayo de termotolerancia.

Para analizar el efecto del estrés térmico, tanto en plantas del ecotipo silvestre Columbia como en las líneas transgénicas que sobreexpresan el gen *FsGASA4* se siguieron diferentes estrategias.

Para el estudio de la termotolerancia basal y adquirida, se utilizó la técnica descrita por Ko et al. (2007), donde las semillas esterilizadas y estratificadas durante 3 días, se expusieron a una temperatura de 50°C durante 3 horas, para estudiar la termotolerancia basal, para ponerlas posteriormente en las condiciones que se mencionan en el apartado 2.1 en diferentes tratamientos (MS, GAs 50 y 100 μM y SA 50 μM). La emergencia de los cotiledones se cuantificó al cabo de 5 días. Para estudiar la termotolerancia adquirida se les dio un segundo choque de temperatura a los 7 días, exponiéndolas a 50°C durante 2.5 horas. Finalmente se mantuvieron en las condiciones mencionadas en el apartado 2.1 durante 10 días, calculando el porcentaje de germinación durante ese periodo de tiempo.

Otra estrategia utilizada fue el ensayo de elongación de hipocotilos, que consiste en medir la longitud que alcanza el hipocotilo durante la germinación de las semillas cuando se las somete a un tratamiento térmico (Hong y Vierling, 2000). Para ello, las semillas esterilizadas y estratificadas de cada línea, se sembraron en placas cuadradas de 12 x 12 cm que contenían diferentes tratamientos (MS, GA<sub>3</sub> 50 μM, SA 50 μM). Las placas se dividieron en lotes y cada uno de ellos fue sometido a uno de los siguientes tratamientos: 90 minutos a 38°C; 2 horas a 45°C; 90 minutos a 38 °C, 2 horas a 22°C y 2 horas a 45°C. Las placas control se mantuvieron a 22°C. Las placas se incubaron en posición vertical y en oscuridad a 22°C durante 3 días. Pasado este tiempo se midió la longitud del hipocotilo de cada línea.

## 9. Medida de los niveles hormonales.

Para determinar los niveles hormonales se utilizaron plántulas del ecotipo silvestre (Col-0), de las líneas transgénicas que sobreexpresan el gen *FsGASA4*, y de las líneas mutantes con una inserción de T-DNA. Las semillas se germinaron en placas con medio MS, GA<sub>3</sub> 100 µM y NaCl 100 mM durante 7 días. Finalmente las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se liofilizaron (Virtis, mod. Benchtop 3).

Para la determinación del ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (JA) y ácido salicílico (SA) se siguió el protocolo descrito en Durgbanshi et al. (2005), estas medidas se llevaron a cabo en el Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural de la Universidad Jaime I.

## **7.- OBTENCIÓN DE MUTANTES DE INSERCIÓN DE T-DNA.**

Para evaluar el papel de los genes *GASA4* y *PTP1* en *Arabidopsis*, se obtuvieron mutantes de inserción de T-DNA, At5g15230 (SALK\_042431) para el gen *GASA4* y At1g71860 (SALK\_071533) para el gen *PTP1*, de la colección del Salk Institute. Las inserciones de T-DNA cercanas a las regiones 5' no codificantes se confirmaron por PCR, utilizando en cada caso los oligonucleótidos que se detallan a continuación:

- FsPTP1 mutante sentido: 5'-ATGGCGACCGGTAAAACCTCTTC-3'
- FsPTP1 mutante antisentido: 5'-CTCGTCCAGCATTTGTCCCCGC-3'
- FsGASA4 mutante sentido: 5'-GAGGAGTGTGGTTCTTTGG-3'
- FsGASA4 mutante antisentido: 5'-TAAAAAGGGAACGAAGGGAG-3'

Además, en las líneas que no dieron producto de PCR con los oligonucleótidos específicos del gen, se comprobó la presencia de la inserción de T-DNA usando el oligonucleótido específico del gen del extremo 5' en combinación con el oligonucleótido específico del borde izquierdo del T-DNA (5'-GCGTGGACCGCTTGCTGCACCT-3').

Los estudios fenotípicos realizados en estas líneas fueron los mismos que los que se detallan en el apartado 7.2.3.

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

### **8.1.- Fotografía y autorradiografía.**

Los geles de agarosa para la separación de DNA y RNA fueron fotografiados con una cámara digital DC 290 Zoom (Kodak) y el software Kodak 1 D Image Analysis, mientras eran irradiados con un transiluminador de luz ultravioleta (UVP modelo TM-20, 302 nm).

Las películas de radiografía X-Omat AR procedían de Kodak (Amersham). El revelado de estas películas se realizó siguiendo la técnica habitual utilizada en fotografía, mediante la inmersión en líquido revelador, posterior fijación y secado (apartado M.4.9.3).

Las fotografías de plántulas, semillas y placas fueron tomadas con una cámara digital DC 290 Zoom (Kodak) en nuestro laboratorio.

### **8.2.- Análisis informático.**

El análisis de restricción de los clones aislados se realizó con el programa DNA Strider™ 1.1 (Ch. Marck y C.E.A.).

El diseño de oligonucleótidos se llevó a cabo con el programa Oligo® 4.05, Primer Analysis Software (National Biosciences, Inc.).

Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron visualizadas mediante la aplicación EditView (ABI PRISM™; Perkin Elmer), y se analizaron por comparación con la base de datos GENEMBL (<http://www2.ebi.ac.uk/fasta3>), que engloba a las bases de datos GenBank, EMBL (general) y EPLN (específica de plantas) y utiliza el programa FASTA (Pearson y Lipman, 1988) de comparación de

secuencias. Las secuencias de aminoácidos deducidas de las secuencias nucleotídicas se enviaron a la base de datos SWISSPIRALL, que engloba a las bases de datos Swiss-Prot y NBRF/PIR y utiliza el programa FASTA de comparación de secuencias. Para la construcción de los árboles filogenéticos se utilizó el método CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) con la aplicación Megalign de DNASTAR LASERGENE.

### **8.3.- Presentación de datos.**

El programa utilizado en la escritura ha sido Microsoft® Word XP (Microsoft Corporation). Para las figuras se ha utilizado el programas Adobe Photoshop® 7.0 (Adobe Systems). Las imágenes digitalizadas se obtuvieron con el “Cannon Scan LiDE 80”.

Las representaciones gráficas se han realizado, con las aplicaciones Cricket Graph 1.3.2 (Cricket Software) y Microsoft Excel XP para hojas de cálculo y realización de gráficas.

Para la lectura de las imágenes obtenidas por medio del phosphorimager Bas-IP (Fujifilm) se utilizó el programa Fujifilm Mac-Bas.

A lo largo de toda la memoria, las referencias en el texto se ordenan cronológicamente, siguiéndose un orden alfabético para autores de artículos publicados en el mismo año.

En la escritura se ha procurado seguir las normas gramaticales del Diccionario de la Real Academia de la Lengua Española [Vigésimo segunda edición (2001), Espasa Calpe, Madrid] y el Vocabulario Científico y Técnico de la Real Academia de las Ciencias Exactas, Físicas y Naturales [Tercera edición (1996), Espasa Calpe, Madrid].

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

*Resultados*

## **1.- MANTENIMIENTO Y ELIMINACIÓN DE LA DORMICIÓN DE SEMILLAS DE HAYA (*Fagus sylvatica* L.): EFECTO DEL ÁCIDO ABCSÍCICO (ABA) Y DEL ÁCIDO GIBERÉLICO (GA<sub>3</sub>).**

En la realización de esta parte del trabajo se utilizaron semillas de haya (*Fagus sylvatica* L.) que presentaban un estado de dormición endógena y, por tanto, eran incapaces de germinar sin un tratamiento frío previo (Nicolás, 1996). Como paso previo en este estudio, se analizaron los efectos de distintos tratamientos hormonales en el mantenimiento o eliminación de la dormición de semillas de haya, para comprobar los resultados obtenidos por nuestro grupo y estandarizar los datos en el lote de semillas utilizado en este trabajo. Estas semillas fueron desprovistas del pericarpio y la testa, como se describe en el apartado 2.1 de Materiales y Técnicas, para acelerar la salida de la dormición y posibilitar la entrada en la semilla de los diferentes compuestos estudiados (Nicolás, 1996).

A continuación, las semillas fueron imbibidas en distintas soluciones, durante 1-6 semanas, a una temperatura de 4°C (estratificación o tratamiento frío, previamente descrito como eficaz para romper la dormición de las semillas de esta especie).

Las soluciones empleadas para la imbibición de las semillas fueron las siguientes:

- ABA (100 µM): hormona vegetal capaz de mantener las semillas en dormición.
- GA<sub>3</sub> (100 µM): hormona vegetal que elimina la dormición de estas semillas.
- Paclobutrazol (PCB) (10 µM): inhibidor de la síntesis de giberelinas.

Siempre se utilizó agua como control de la germinación, que se consideró como emergencia radicular.

En la tabla R.I. se muestran los porcentajes de germinación obtenidos en los distintos tratamientos después de diferentes periodos de imbibición. Sus efectos en la dormición de las semillas o en su eliminación, se describen a continuación.

La estratificación o tratamiento frío a 4°C consigue eliminar gradualmente la dormición a lo largo del periodo de estudio, alcanzando porcentajes de germinación próximos al 50% tras 6 semanas de tratamiento, por lo que se puede considerar que, a partir de este momento, las semillas comienzan a salir de la dormición.

La adición exógena de ácido abscísico (ABA) consigue revertir los efectos del tratamiento frío en la eliminación de la dormición, disminuyendo considerablemente los porcentajes de germinación hasta un 5% tras 6 semanas de imbibición, lo que sugiere la implicación de esta hormona en el mantenimiento de la dormición de estas semillas y corrobora los datos observados por Nicolás et al. (1996).

% germinación/tiempo (semanas)						
Tratamientos	1	2	3	4	5	6
<b>Agua estéril (4°C)</b>	0%	2%	3%	7%	10%	47%
<b>ABA 100 µM (4°C)</b>	0%	0%	0%	0%	2%	5%
<b>GA<sub>3</sub> 100 µM (4°C)</b>	0%	4%	15%	47%	62%	80%
<b>PCB 10 µM (4°C)</b>	0%	0%	0%	1%	3%	5%

**Tabla R.I.:** Efectos de la estratificación fría a 4°C, ABA (100 µM), GA<sub>3</sub> (100 µM) y paclobutrazol (10 µM) en los porcentajes de germinación de semillas durmientes de *Fagus sylvatica* L. tras ser sometidas a periodos de imbibición de 1 a 6 semanas a 4°C.

La aplicación al medio de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) va a potenciar el efecto de la estratificación y provoca una rápida eliminación de la dormición, aumentando los porcentajes de germinación desde las primeras semanas de tratamiento, alcanzándose valores del 47% en tan sólo 4 semanas y del 80% tras 6 semanas de imbibición.

Finalmente, tras la adición de paclobutrazol (un inhibidor de la síntesis de GAs) se obtienen unos porcentajes de germinación próximos a cero durante todo el tratamiento, anulándose los efectos activadores de las bajas temperaturas, lo que indica que la síntesis de GAs es necesaria para la eliminación de la dormición durante la estratificación, como ya observaron Nicolás et al. (1997).

## **2.- CARACTERIZACIÓN Y EXPRESIÓN DE UNA PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASA DE *Fagus sylvatica* RELACIONADA CON LA ELIMINACIÓN DE LA DORMICIÓN Y REGULADA POR ABA.**

Una vez comprobado el efecto de los diferentes tratamientos en el mantenimiento o eliminación de la dormición en nuestro lote de semillas, uno de nuestros objetivos era el aislamiento y caracterización de un clon de cDNA que codificara una proteína tirosina fosfatasa que pudiera estar relacionada con la dormición/germinación de semillas y regulada por ácido abscísico (ABA), para estudiar su función en la regulación hormonal de este proceso.

Para ello, utilizamos una aproximación por RT-PCR (apartado 4.10.2 de Materiales y Técnicas), utilizando mRNA de semillas tratadas con ácido abscísico (ABA), hormona que mantiene a las semillas en

dormición. Estos RNAs se utilizaron para la síntesis de cDNAs por transcripción inversa y los productos de la reacción se sometieron a PCR empleando oligonucleótidos degenerados correspondientes a dominios conservados en este tipo de proteínas (PTP). De esta manera se obtuvo un fragmento de 550 pb, que codificaba una posible proteína tirosina fosfatasa y que se denominó FsPTPf1. Este fragmento se clonó en el vector pBluescript SK<sup>+</sup>.

## **2.1.- Aislamiento y caracterización del clon de cDNA FsPTP1.**

El clon parcial FsPTPf2 se aisló utilizando el fragmento obtenido por RT-PCR como sonda en la búsqueda de una genoteca de cDNA construida a partir de mRNA de semillas de haya (Nicolás, 1997). Finalmente se obtuvo el clon completo FsPTP1 mediante la técnica de RACE (apartado 5 de Materiales y Técnicas). La secuencia nucleotídica de este cDNA ha quedado registrada en la base de datos EMBL con el n° de acceso AM231527.

### **2.1.1.- Análisis de la secuencia nucleotídica.**

La inserción de este clon en el plásmido pBluescript SK<sup>+</sup> permitió su secuenciación en ambas direcciones, utilizando los iniciadores denominados “Reverse” y M13 (-20) Universal” en las reacciones de secuenciación. La secuencia completa de este clon de cDNA presentaba una longitud de 1698 pb, con una fase de lectura abierta de 992 nucleótidos y una región 5' y 3' no codificante de 186 y 518 nucleótidos respectivamente. Adicionalmente, la región 3' no codificante contenía una cola de poly(A) con 6 restos de adenosina.

La secuencia de nucleótidos correspondientes al clon de cDNA FsPTP1, así como su traducción en aminoácidos aparece en la figura R.1.

### **2.1.2.- Estudio comparativo del clon FsPTP1 con otras tirosina fosfatasas.**

La secuencia de nucleótidos del clon de cDNA denominado FsPTP1 y su correspondiente traducción en aminoácidos, fueron enviadas a las bases de datos disponibles (GENEMBL y SWISSPROT) para encontrar otros genes y proteínas ya descritos que presentaran secuencias similares. La comparación con todas las secuencias incluidas en estas bases, reveló la existencia de homología con secuencias aminoacídicas que codifican proteínas tirosina fosfatasas (PTP) de diversas especies vegetales como *Phaseolus vulgaris* (n° de acceso AY603965), que presenta un 71,4% de identidad, *Glycine max* (n° de acceso AJ006308) con un 70,5%, *Pisum sativum* (n° de acceso AJ005589) con un 68,6% y *Arabidopsis thaliana* (n° de acceso AY070403) que presenta un 68,9% de identidad.

Esta comparación queda reflejada en la figura R.2, en la que se comprueba la similitud entre estas proteínas, por lo que se consideró que este clon codifica una proteína de este tipo y por ello se denominó FsPTP1.

1	CCA	CTA	ATC	TAA	TAC	GAC	TCA	CTA	TAG	GGC	AAG	CAG	TGG	TAT	CAA	CGC	AGA	GTA	CGC	GGG
61	GGT	GGT	CAA	GGC	AGA	AGG	CAG	AAC	CCT	CAA	AAC	CGT	ATC	ACA	CAG	CAC	CAC	CTT	ACC	CAC
121	CCC	AAA	AAA	ACT	GAA	CTG	GGG	AAC	CAC	ATT	TCT	AAG	CGC	GGC	CAC	CAC	CAG	CGG	AGA	AGA
181	TCA	GCC	ATG	GCC	GCT	ACC	TCT	TCC	ACC	GCA	AAC	TCC	GCC	TTC	TCA	CCC	GAT	TCA	CCT	CCC
241	AGA	CTC	CCT	CTC	ACA	CCC	GAT	CAG	GTT	CAG	CAT	TGC	TCC	GAA	GCT	CTC	ACT	TTC	TTC	ATC
301	R	L	P	L	T	P	D	Q	V	Q	H	C	S	E	A	L	T	F	F	I
361	D	K	L	Q	M	P	H	I	L	N	Q	E	F	A	H	L	Q	A	N	R
421	ATA	ACT	CCA	TCT	GAG	ATG	AGG	AGA	AGC	TGT	ACT	GTG	GCT	TTT	GAC	AAT	GTC	AAT	ATG	AAC
481	AAA	AAC	CGC	TAT	ACC	GAT	GTC	GTA	CCA	TTT	GAC	AAG	AAT	AGG	GTT	GTT	CTT	AAC	TCG	TGT
541	K	N	R	Y	T	D	V	V	P	F	D	K	N	R	V	V	L	N	S	C
601	AAG	GAT	TAC	AGA	CCG	GCT	GCA	AAG	GGC	TAC	AAT	ATC	AAT	GCA	AGC	TTC	ATC	ACT	TCT	TCC
661	K	D	Y	R	P	A	A	K	G	Y	I	N	A	S	F	I	T	T	S	S
721	TCT	GAA	AGC	ATT	TCT	CAG	TTT	ATT	GCC	ACA	CAA	GGT	CCA	TTC	CCA	CAA	ACC	TAT	GAG	GAT
781	S	E	S	I	S	Q	T	I	A	T	G	P	L	P	A	L	T	Y	E	D
841	TTT	TGG	GAG	ATG	GTA	ATG	CAG	AAT	CGT	TGC	CCT	GTG	GTT	GTG	ATG	CTG	ACT	AGG	TTA	GTC
901	R	W	E	M	V	M	Q	N	R	C	P	V	V	V	M	L	T	R	L	V
961	GAC	AAG	ATG	GTA	AAA	TGT	GGC	GAT	TAT	TTC	CAA	GCC	GAA	GAT	GGT	CCC	AGG	GAA	ATT	GGT
1021	D	K	M	V	K	C	G	D	Y	F	Q	A	E	D	G	P	R	E	I	G
1081	AAT	ATA	CAT	ATA	GTC	ACT	AAA	TGG	ATA	AAA	ACT	ATC	GAC	ACT	TCA	TTA	GTG	TTG	CGC	CAT
1141	N	I	H	I	V	T	K	W	I	K	T	I	D	T	S	L	V	L	R	H
1201	TTG	GAG	GTG	AAG	TAT	AAA	GCA	TCA	GAG	GAA	CCC	ATG	TCT	GTT	CTA	CAT	ATT	CAG	TAT	CAG
1261	L	E	V	K	Y	K	E	S	E	E	E	P	M	S	V	L	H	I	Q	Y
1321	CCT	GAA	TGG	CCC	GAT	CAT	GGA	GTT	CCA	AAT	GAC	ACA	GTT	GCT	GTG	CGT	GAA	ATT	TTA	AAA
1381	P	E	W	P	D	H	G	V	P	N	D	T	V	A	V	R	E	I	L	K
1441	AGA	ACA	TAC	CAT	GTA	CCA	CCC	AAT	CTT	GGC	CCA	GTT	GTG	GTG	CAC	TGC	AGT	GCA	GGT	ATT
1501	R	T	Y	H	V	P	P	N	L	G	P	V	V	V	H	C	S	A	G	I
1561	GGG	AGA	ACA	GGA	ACA	TAT	TGC	ACA	ATT	CAT	AAC	ACA	ATT	CAG	AGA	ATC	CTA	GCT	GGA	GAC
1621	G	R	T	G	T	Y	C	T	I	H	N	T	I	Q	R	I	L	A	G	D
1681	ATG	TCT	GCG	TTA	AAT	CTT	GTT	AAT	ACC	ATA	AGC	ATG	TTC	AGG	TCC	CAG	AGA	ATT	GGA	ATG
	M	S	A	L	N	L	V	N	T	I	S	M	F	R	S	Q	R	I	G	M
	GTC	CAA	ACA	CCG	GAT	CAA	TTT	CGT	TTT	TGC	TTT	AAA	GCA	ATC	ATT	GAT	GAA	TTA	GAA	GAC
	V	Q	T	P	D	Q	F	R	F	C	F	K	A	I	I	D	E	L	E	D
	CTG	ATC	TCA	GAT	TTC	AAC	ACA	GAG	AGG	AGC	TCA	AAA	TGA	TCA	ATG	ACT	GTT	CCT	CAT	CAT
	L	I	S	D	F	N	T	E	R	S	S	K	*							
	TAG	TAC	CAA	TGC	TGA	ATA	AGA	CAG	AGA	AGT	CTG	CTT	ATT	TCT	CCA	AAG	TTG	AAG	AAA	TAT
	GCA	ATT	GTA	TGC	TTC	TCC	CAG	TAC	GTT	TGT	CTC	CAG	CAG	CTG	GTC	TGC	TGC	CTC	ATC	ATC
	1321	ATT	ATG	CTG	GAA	CTA	AGA	ACA	TTG	CTG	AAC	CGC	TAA	TTT	CAT	TTT	CTT	TAA	AAC	CTC
	1381	TTC	TCT	TCC	TAT	AAA	TAT	ATA	TAG	GCA	CCC	AAG	GAG	CTG	AAT	AAT	TCA	AAT	ACA	ATC
	1441	TTC	ATG	TTA	TAA	TGG	TTC	CCT	GCA	GAT	TGT	TAG	AAA	CAT	GAA	CTG	ACT	TGG	AGC	CAG
	1501	TGA	GCT	TGT	ACA	TTT	TGA	ACT	GCC	TGT	TTT	CTG	CTA	AGG	CCA	ATA	ACT	TCA	TCC	AGT
	1561	CTA	GAC	TTA	CAA	TAA	TGG	ACA	ATG	TGT	ATG	TTG	AAA	TGA	CCA	TTA	GTA	CTA	AAA	ACT
	1621	ATT	GTT	TAT	ACT	TTA	TAA	GGT	TCT	CTA	TTA	GAC	AGT	GGT	CTT	TAT	TAG	TAA	GAC	AAA
	1681	GAA	AAA	AAA	AAA	AGG	GAG													AAA

**Figura R.1.:** Secuencia nucleotídica del clon FsPPT1 y secuencia de aminoácidos deducida a partir de ella. El asterisco (\*) corresponde al codón de paro.

**2.1.3.-Características de la proteína deducida de la secuencia nucleotídica.**

La proteína FsPPT1 deducida de la secuencia nucleotídica consta de 330 aminoácidos que forman un polipéptido con un tamaño molecular de 37.4 kDa y un punto isoelectrico de 6.49.

El análisis de su composición muestra un porcentaje de aminoácidos cargados de un 29.39%, un 30% de aminoácidos polares y un 32.12% de hidrofóbicos. Aunque no destaca la presencia de ningún aminoácido predominante, la valina es el aminoácido mayoritario con una frecuencia del 7.88%, mientras que el triptófano resulta ser el más minoritario con una frecuencia del 0.91% (Figura R.3.).

El análisis de la secuencia aminoacídica mediante la base de datos PROSITE, reveló la presencia de dos posibles dianas de N-glicosilación [en la posición 110-113 (NASF) y 228-231 (NDTV)], varias dianas de fosforilación para proteína quinasa C [97-99 (SCK), 293-295 (SQR), 325-327 (TER), 328-330 (SSK)] y caseína quinasa II [60-63 (TPSE), 97-100 (SCKD), 117-120 (SSSE), 135-138 (TYED), 206-209 (SEEE)], así como posibles sitios de N-miristilación [257-262 (GIGRTG), 262-267 (GTYCTI)] y de fosforilación para tirosina-quinasa [197-203 (RHLEVKY)].

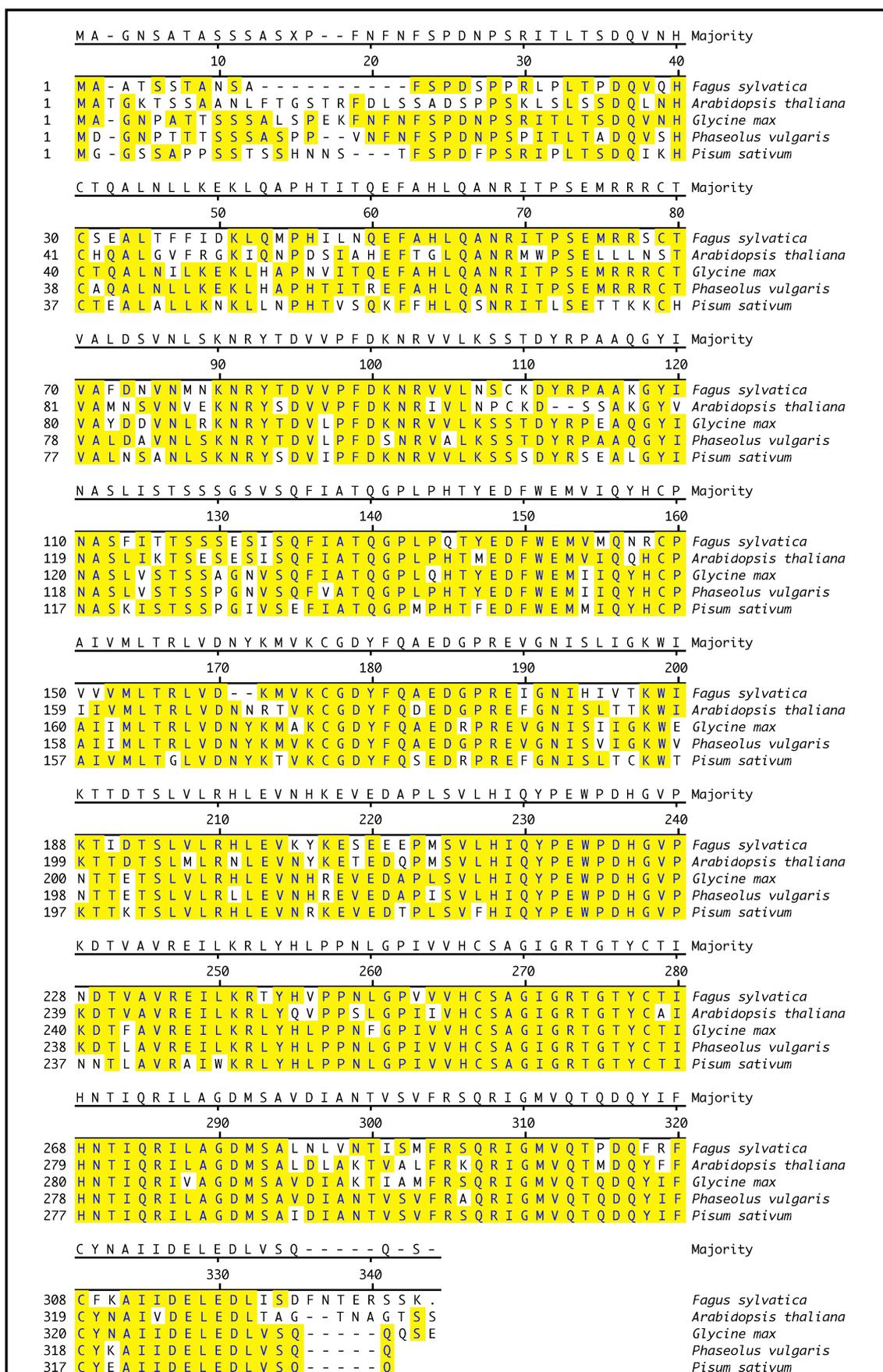


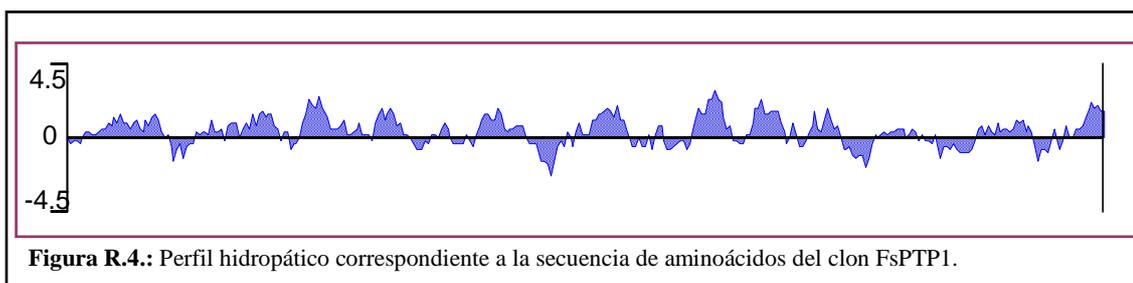
Figura R.2.: Comparación de la secuencia aminoacídica deducida del clon FsPTP1 con otras PTP de *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Glycine max* y *Arabidopsis thaliana*.

Aminoácidos	Número	% Peso	% Frecuencia
<b>Cargados (RKHYCDE)</b>	97	34.56	29.39
<b>Ácidos (DE)</b>	37	12.05	11.21
<b>Básicos (KR)</b>	33	12.72	10
<b>Polares (NCQSTY)</b>	99	29.05	30
<b>Hidrofóbicos(AILFWV)</b>	106	30.99	32.12
<b>A Ala</b>	18	3.42	5.45
<b>C Cys</b>	8	2.20	2.42
<b>D Asp</b>	19	5.84	5.76
<b>E Glu</b>	18	6.21	5.45
<b>F Phe</b>	15	5.90	4.55
<b>G Gly</b>	12	1.83	3.64
<b>H His</b>	10	3.66	3.03
<b>I Ile</b>	23	6.95	6.97
<b>K Lys</b>	14	4.79	4.24
<b>L Leu</b>	21	6.35	6.36
<b>M Met</b>	12	4.21	3.64
<b>N Asn</b>	18	5.49	5.45
<b>P Pro</b>	21	5.45	6.36
<b>Q Gln</b>	15	5.13	4.55
<b>R Arg</b>	19	7.93	5.76
<b>S Ser</b>	25	5.82	7.58
<b>T Thr</b>	24	6.48	7.27
<b>V Val</b>	26	6.89	7.88
<b>W trp</b>	3	1.49	0.91
<b>Y Tyr</b>	9	3.92	2.73

**Figura R.3.:** Composición de aminoácidos de la proteína deducida a partir de la secuencia nucleotídica del clon FsPTP1.

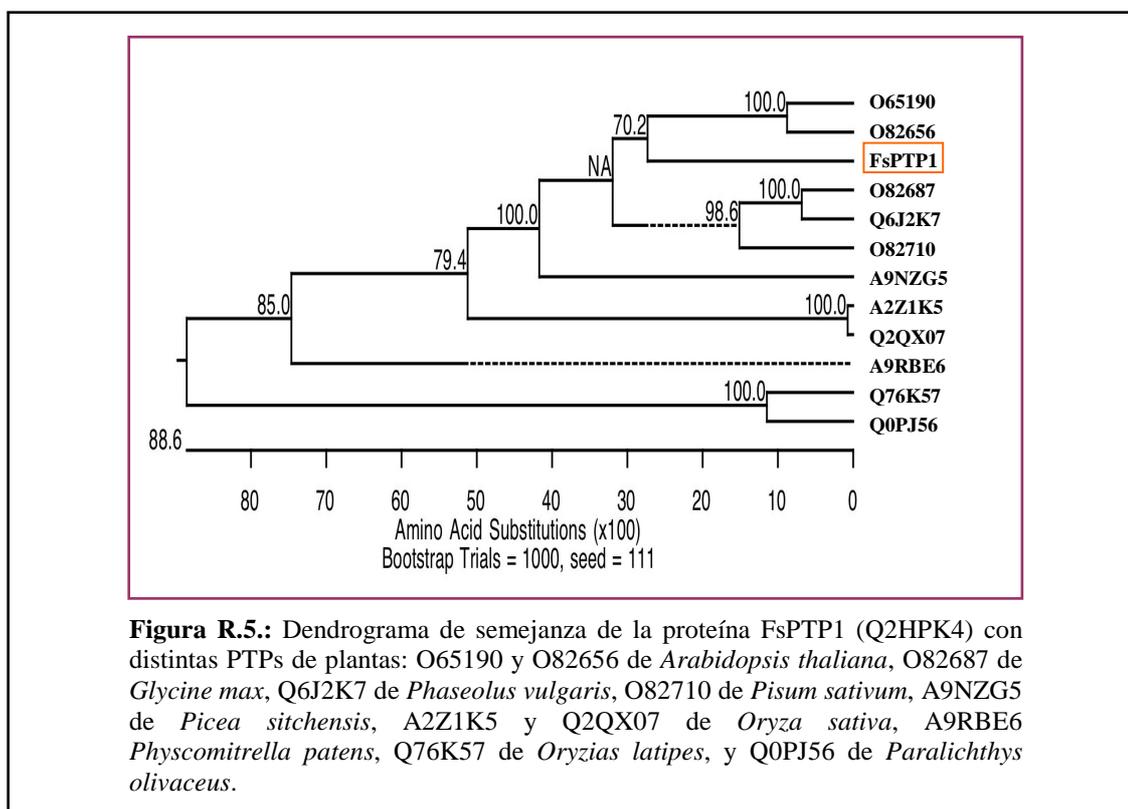
La secuencia característica de este tipo de proteínas tirosina fosfatasas (PTPs), (V/D)HCXAGXGR(T/S)G, que se corresponde con el sitio activo, aparece en nuestra proteína en la posición 252-262 (VHCSAGIGRTG). Adicionalmente, encontramos en este patrón unos residuos (CX<sub>5</sub>R) que formarían un lazo entre el extremo C-terminal de la lámina  $\beta$ 10 y la hélice  $\alpha$ 4 localizada al final del sitio catalítico, que serviría para unir el fosfato al sitio activo (Taberner et al., 2008).

El estudio del perfil de hidrofobicidad obtenido según el algoritmo de Kyte y Doolittle (Fig. R.4), pone de manifiesto que esta proteína presenta un carácter principalmente hidrofílico, aunque también aparecen algunas regiones de carácter hidrofóbico.



#### 2.1.4.- Relación filogenética de FsPTP1 con otras PTPs vegetales.

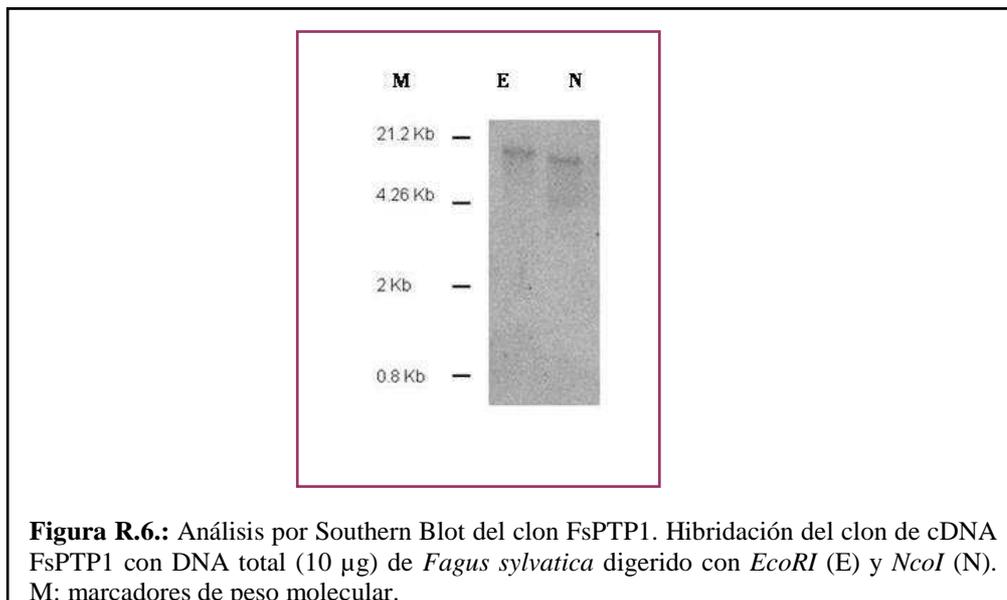
El esquema de la figura R.5 muestra la relación filogenética entre FsPTP1 y diferentes PTPs descritas en plantas. El dendrograma de semejanza muestra que la proteína se encuentra situada en una rama independiente dentro de un grupo en el que se encontraría junto con O65190 y O82656 de *Arabidopsis thaliana*, las cuales tienen un dominio catalítico con un 87% de similitud con el de FsPTP1.



#### 2.1.5.- Análisis por Southern Blot.

Para determinar el número de copias del gen clonado presentes en el genoma de *Fagus sylvatica*, se purificó el DNA total de haya y se sometió a digestión con dos enzimas de restricción: *EcoRI* y *NcoI*. Los fragmentos obtenidos se separaron en gel de agarosa y se hibridaron en condiciones restrictivas (65°C) con una sonda construida a partir del clon FsPTP1. La correspondiente autorradiografía

muestra la presencia de un gen simple por genoma haploide en *F. sylvatica*, ya que al cortar el DNA con estas dos endonucleasas aparece, en ambos casos, una única banda (Figura R.6).



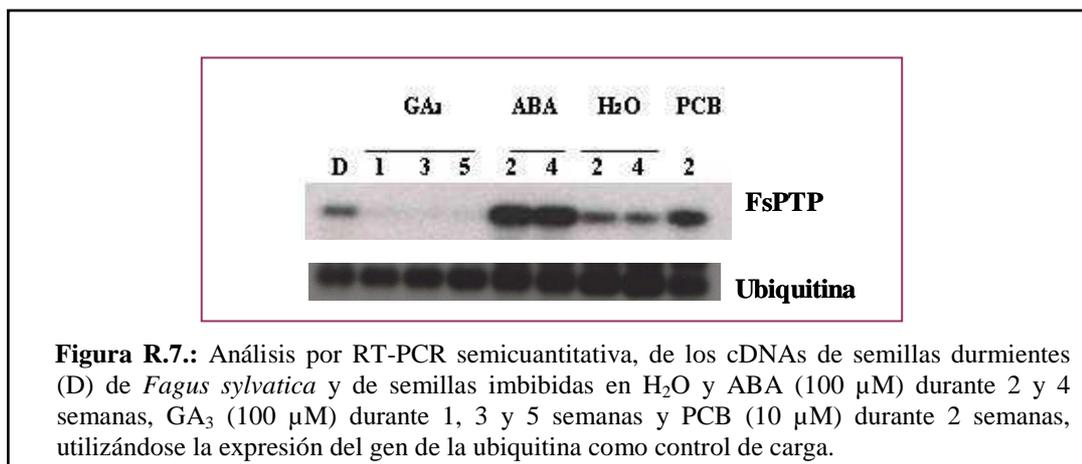
## 2.2.- Expresión del clon FsPTP1.

Una vez caracterizado este clon, se procedió al análisis de la expresión del gen correspondiente en semillas durmientes sometidas a los distintos tratamientos utilizados en este trabajo. Para ello se aislaron los RNAs de las semillas imbibidas durante 1 a 6 semanas en H<sub>2</sub>O, ABA, GA<sub>3</sub> y PCB, y dado que los niveles de expresión de este gen eran muy bajos (datos no mostrados), se obtuvieron los cDNAs correspondientes y se analizaron por RT-PCR semicuantitativa (apartado 4.10.2 de Materiales y Técnicas).

### 2.2.1.- Estudio de la expresión del clon FsPTP1 durante la estratificación y en respuesta a diferentes tratamientos.

En el estudio de la expresión de este clon, se analizaron los niveles de sus transcritos durante la estratificación, tratamiento que produce la salida de la dormición, y los efectos de la aplicación exógena de ABA, que va a revertir los efectos del frío, así como del ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), que potencia el efecto de las bajas temperaturas, y del paclobutrazol (PCB), inhibidor de la biosíntesis de giberelinas.

Como se puede observar en la figura R.7, los niveles de expresión son bajos en semillas durmientes así como en el tratamiento de estratificación fría a 4°C, tratamiento que produce una lenta salida de la dormición, mientras que no se detecta expresión tras la aplicación exógena de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), tratamiento que provoca una rápida salida de la dormición. Por su parte, en los tratamientos con ABA y PCB, que mantienen a las semillas en dormición, se observa un notable aumento en los niveles de expresión de este gen durante todo el período de estudio. Por tanto, según estos datos, la expresión de FsPTP1 estaría regulada por ABA y posiblemente relacionada con la dormición de semillas de haya.

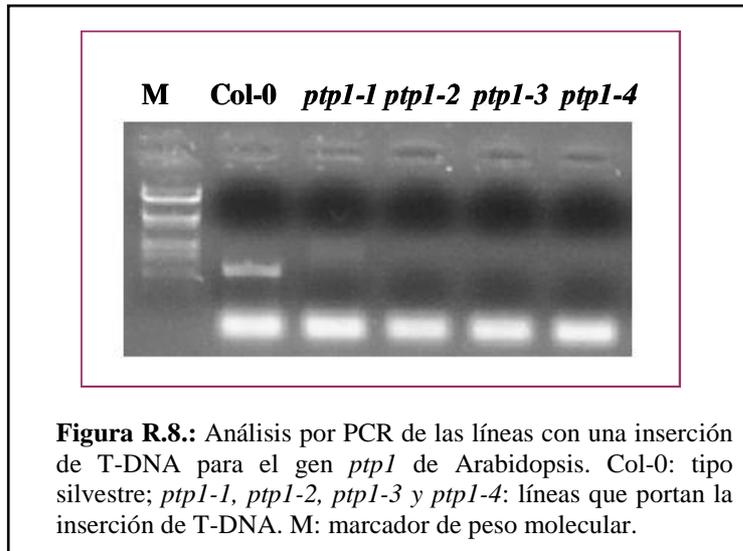


### 3.- ANÁLISIS FUNCIONAL DE *FsPTP1*.

Una vez comprobado que esta fosfatasa de haya estaba inducida por ABA y, por tanto, podría estar relacionada con la dormición de semillas, el siguiente paso fue realizar un análisis funcional de dicha proteína. Por ello, y debido a la imposibilidad de obtener plantas transgénicas de haya, procedimos a la generación de plantas transgénicas de *A. thaliana*, junto con la obtención de mutantes de pérdida de función del gen endógeno *PTP1* de Arabidopsis, el homólogo de nuestra fosfatasa de haya en Arabidopsis.

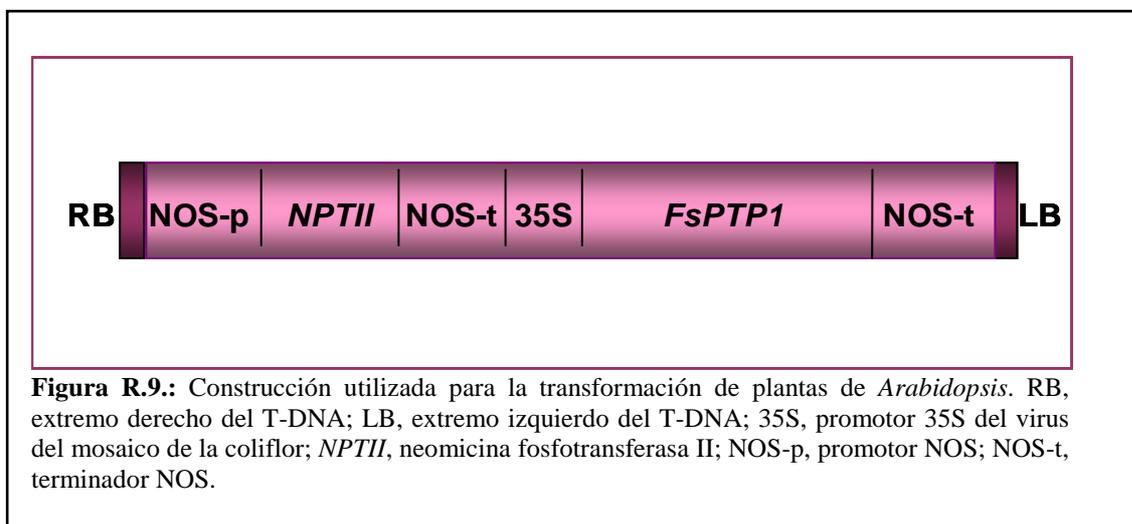
#### 3.1.- Estudio y caracterización de los mutantes de T-DNA *ptp1*.

En este análisis se utilizaron mutantes de pérdida de función con una inserción de T-DNA en el gen At1g71860 (*PTP1* de *Arabidopsis thaliana*), SALK\_071533 (Salk Institute, San Diego, CA, USA); la inserción de T-DNA se encuentra cercana al extremo 5' del exón 1 de dicho gen. Las semillas con dicha inserción se seleccionaron por su resistencia al antibiótico kanamicina, conferida por el gen *NPTII*; una vez obtenidas las líneas homocigóticas, quedó demostrado por análisis de PCR (apartado 4.10.1 de Materiales y Técnicas) (Figura R.8) que los diferentes mutantes *ptp1* son nulos para la PTP, ya que la expresión del mensajero queda totalmente suprimida, como era de esperar por la zona en la que se inserta el T-DNA, es decir, en uno de los exones iniciales.



### 3.2.- Generación de las líneas transgénicas 35S:*FsPTP1*.

Adicionalmente al análisis de mutantes, se abordó la generación de plantas transgénicas de *A. thaliana* (ecotipos Columbia y Cabo Verde) que sobreexpresaran el gen *FsPTP1*, y los análisis fenotípicos y moleculares que se detallan posteriormente, utilizando los mutantes de pérdida de función y las semillas de tipo silvestre como controles. Para realizar la transformación, diseñamos la construcción que se detalla en la figura R.9, que contiene la región codificante del clon *FsPTP1* bajo la regulación del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, el gen *NOS* de *Agrobacterium* que codifica la nopalina sintetasa, el gen de la neomicina fosfotransferasa *NPTII* que confiere resistencia a kanamicina y las regiones RB (“right border”) y LB (“left border”) del T-DNA del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. El vector utilizado para introducir estas construcciones fue pBIN 121 de *Agrobacterium* y la transformación de plantas de *A. thaliana* se realizó por el método de infiltración *in planta* (apartado 7.1.5 de Materiales y Técnicas). Las semillas transformadas (en las que *A. tumefaciens* ha introducido el T-DNA con las construcciones que contienen la región codificante del gen *FsPTP1*) se seleccionaron por su resistencia al antibiótico kanamicina, conferida por el gen *NPTII*, sembrándolas en medio MS con kanamicina (50 µg/ml).



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

La eficiencia de transformación fue aproximadamente del 0,2%.

### 3.3.- Segregación de los transgenes de la progenie.

Las semillas provenientes de las plantas T1 muestran segregación de la resistencia a kanamicina conferida por el gen *NPTII* incluido en el T-DNA introducido en las plantas. Las tablas R.II. y R.III. resumen la segregación observada en la T2 para cada línea de la generación T1 de cada ecotipo.

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

Líneas	KanR	KanS	3R:1S (1 inserto)	15R:1S (2 insertos)	63R:1S (3 insertos)
P1	70,5	29,47	0,84	88,11	485,83
P2	75	25	0,01	56,84	340,23
P3	77	23	0,12	45,06	283,47

**Tabla R.II.:** Segregación de la resistencia a kanamicina en la generación T2 de las líneas transgénicas en el ecotipo Columbia (Col-0). KanR: número de semillas resistentes a kanamicina; KanS: número de semillas sensibles a kanamicina. Se indica la  $\chi^2$  para cada cociente.

Líneas	KanR	KanS	3R:1S (1 inserto)	15R:1S (2 insertos)	63R:1S (3 insertos)
V1	90	10	11,21	0,535	40,69
V2	96,96	3,03	24,58	1,26	0,596
V3	69	31	1,613	100,36	541,58

**Tabla R.III.:** Segregación de la resistencia a kanamicina en la generación T2 de las líneas transgénicas en el ecotipo Cabo Verde (Cvi). KanR: número de semillas resistentes a kanamicina; KanS: número de semillas sensibles a kanamicina. Se indica la  $\chi^2$  para cada cociente.

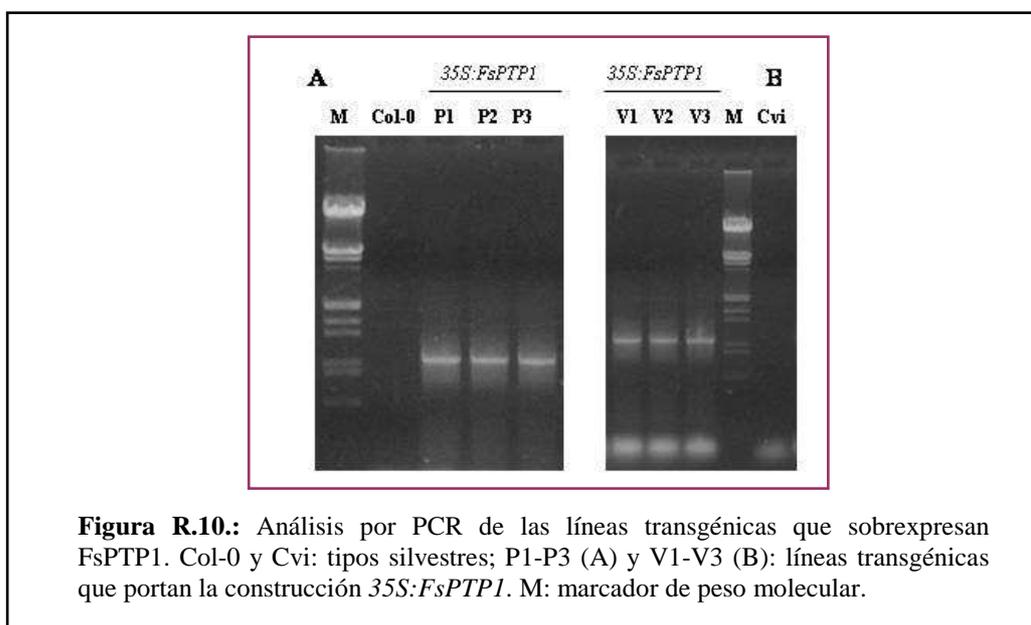
La transmisión del gen de resistencia a kanamicina de la generación T1 a la T2, está de acuerdo con la segregación de inserciones del T-DNA como un marcador dominante en hemizigosis. Se analizaron aproximadamente 100 semillas en la T2, que provenían de 3 líneas independientes para el ecotipo Col-0 (Tabla R.II.) y de 3 líneas independientes para el ecotipo Cvi (Tabla R.III.).

Las líneas P1, P2 y P3 del ecotipo Col-0 y la línea V3 del ecotipo Cvi, muestran una distribución de resistencia a kanamicina que se ajusta a una segregación mendeliana de una inserción en un solo locus, con un cociente 3:1 de semillas resistentes sobre semillas sensibles. El resto de las líneas no presenta un patrón de segregación mendeliano. Esta segregación puede ser debida a la pérdida de expresión del gen *NPTII* en algunas semillas.

### 3.4.- Caracterización molecular del transgén *FsPTP1*.

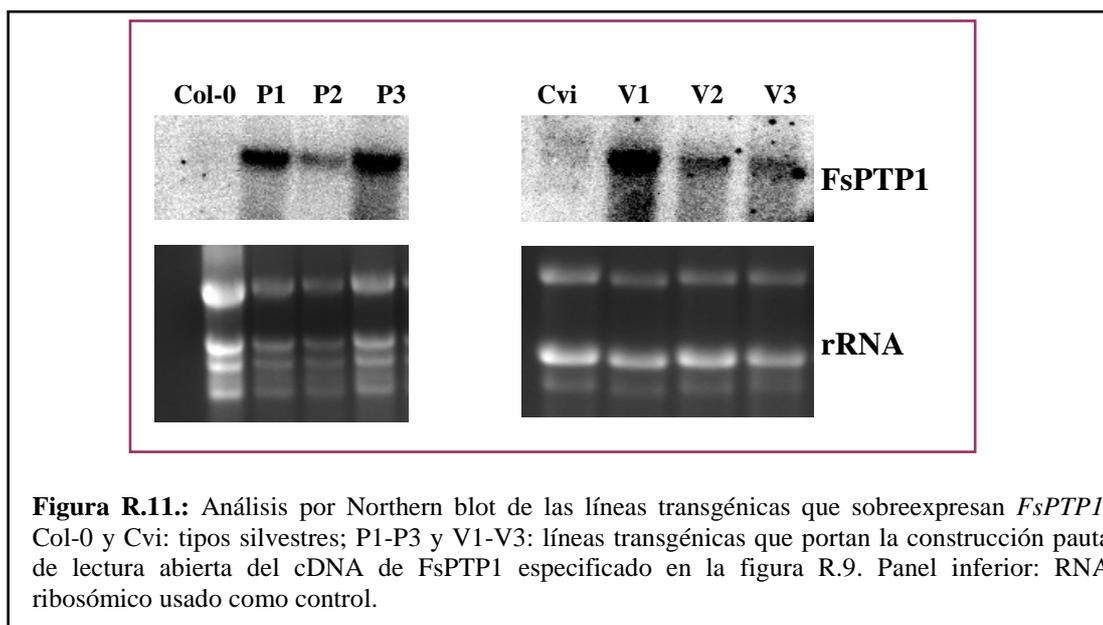
Una vez seleccionadas las plantas transgénicas homocigóticas (T3) para el gen *FsPTP1* en ambos ecotipos, se realizaron los correspondientes ensayos moleculares y fenotípicos.

En primer lugar, comprobamos, mediante PCR (apartado 4.10.1 de Materiales y Técnicas), que las líneas P1, P2 y P3 del ecotipo Col-0, así como las líneas V1, V2 y V3 del ecotipo Cvi, eran portadoras de dicho gen, como así se pone de manifiesto en la figura R.10, sin embargo, como era de esperar, los ecotipos silvestres correspondientes (Col-0 y Cvi) no contienen el transgén.



**Figura R.10.:** Análisis por PCR de las líneas transgénicas que sobreexpresan *FsPTP1*. Col-0 y Cvi: tipos silvestres; P1-P3 (A) y V1-V3 (B): líneas transgénicas que portan la construcción *35S:FspTP1*. M: marcador de peso molecular.

El análisis por Northern blot de los RNAs totales aislados de plantas del ecotipo silvestre y de las plantas transgénicas (Figura R.11), ponen de manifiesto la elevada expresión del gen *FsPTP1* en las diferentes líneas transgénicas que han sido utilizadas en esta memoria para su caracterización molecular y fenotípica.



### 3.5.- Análisis fenotípicos de las plantas transgénicas *35S:F<sub>s</sub>PTP1*.

#### 3.5.1.- Efectos de la sobreexpresión de *FsPTP1* en la dormición de semillas.

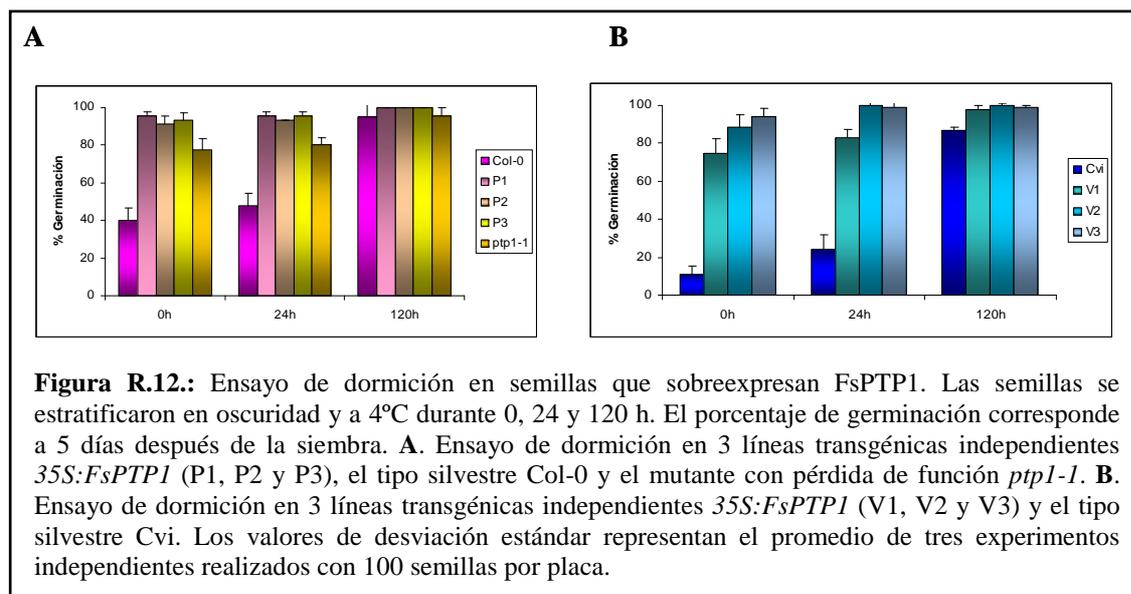
Como ya se ha comentado anteriormente, la expresión de *FsPTP1* es inducida por ABA en semillas (apartado 2.2.1 de Resultados) y disminuye durante la estratificación y tras el tratamiento con  $GA_3$ , lo cual correlaciona la acumulación de esta proteína con el grado de dormición de la semilla o bien con algún proceso mediado por ABA en la semilla durmiente. Por ello, nos pareció interesante estudiar el efecto de la sobreexpresión de *FsPTP1* en la dormición y germinación de las semillas transgénicas de *A. thaliana* (ecotipos Col-0 y Cvi). Para ello realizamos ensayos de dormición, en los que se analizaron los porcentajes de germinación en semillas de las líneas transgénicas seleccionadas y en las semillas de los dos tipos silvestres (Figura R.12). Las semillas de *A. thaliana* del tipo silvestre Col-0 presentan dormición primaria cuando se recogen de la planta madre, y son incapaces de germinar aunque las condiciones ambientales sean apropiadas si no son sometidas a ciertos tratamientos para eliminar la dormición, como la estratificación o la aplicación de GAs (Koornneef y Karssen, 1994). Así, las semillas del ecotipo Columbia presentan porcentajes de germinación en torno al 40% en semillas sin estratificar o tras 24h de tratamiento frío, alcanzando valores superiores al 90% tras 120 horas de tratamiento frío (Figura R.12.A). Las líneas transformadas Col-0;*35S:F<sub>s</sub>PTP1* presentan una dormición reducida comparada con el tipo silvestre; en ausencia de estratificación a 4°C, estas semillas son capaces de germinar y alcanzar valores cercanos al 100% de germinación.

Por otro lado, las semillas del ecotipo Cabo verde (Figura R.12.B) presentan una dormición más profunda que el resto de ecotipos; estas semillas tienen dependencia de la luz para finalizar el proceso de dormición y comenzar la germinación (Cadman et al., 2006). Como se observa en la figura R.12.B, las semillas del ecotipo silvestre apenas van a germinar sin el tratamiento previo de estratificación, mientras que tras 24h de tratamiento tan sólo germinan el 20%, llegando a porcentajes de 80% tras 120 horas de

estratificación. Sin embargo, las líneas transformadas *Cvi;35S:F<sub>s</sub>PTP1* presentan una dormición reducida en ausencia de estratificación, siendo capaces de alcanzar valores del 70-100% de germinación.

Todos estos datos indican que las semillas de las líneas transformadas no presentan dormición y sugiere un papel para *F<sub>s</sub>PTP1* en la regulación de la dormición de semillas o en los procesos que determinan el paso de dormición a germinación.

Por su parte, los mutantes con pérdida de función del gen endógeno *PTP1* presentan un menor grado de dormición que el tipo silvestre, pero es inferior al presente en las líneas transgénicas.



### 3.5.2.- Efecto de la sobreexpresión de *F<sub>s</sub>PTP1* en la sensibilidad al ABA.

Para analizar si la sobreexpresión de *F<sub>s</sub>PTP1* afecta a la sensibilidad al ABA, se realizaron una serie de ensayos de germinación en presencia de distintas concentraciones de la hormona (1, 2 y 3  $\mu$ M) utilizando como control semillas de *A. thaliana* de los tipos silvestres Col-0 y Cvi, así como uno de los mutantes (*ptp1-1*).

Como podemos observar en la figura R.13.A, las semillas del tipo silvestre (Col-0) presentaban porcentajes de germinación del 90% (en el caso del mutante *ptp1-1*, estos valores eran del 60%), 15 días después de la estratificación en presencia de ABA 1  $\mu$ M. A concentraciones superiores (2 y 3  $\mu$ M) los porcentajes de germinación disminuían drásticamente, siendo del 20% a una concentración de 2  $\mu$ M y del 5% a una concentración de ABA 3  $\mu$ M, para el ecotipo silvestre, mientras que los mutantes son incapaces de germinar. Por otra parte, las semillas transgénicas *35S:F<sub>s</sub>PTP1* germinan prácticamente en su totalidad en concentraciones de ABA 1  $\mu$ M, alcanzando porcentajes de germinación del 60% para concentraciones de ABA 2  $\mu$ M, y entre el 20-60% para concentraciones de ABA 3  $\mu$ M.

Por otra parte, en la figura R.13.B, comprobamos que algunas de las semillas de tipo silvestre (Cvi) eran capaces de germinar después de 15 días tras la estratificación, en diferentes concentraciones de

ABA (1, 2 y 3  $\mu\text{M}$ ), aunque estos porcentajes eran muy inferiores a los alcanzados por las semillas que sobreexpresan FsPTP1. Observamos que, para concentraciones de ABA 1  $\mu\text{M}$ , las semillas transgénicas *35S:F<sub>s</sub>PTP1* alcanzaban porcentajes de germinación de entre el 90-100%, respecto al 35% del tipo silvestre (Cvi); para concentraciones de ABA 2  $\mu\text{M}$  eran de entre el 85-90% respecto al 25% del tipo silvestre, y para concentraciones de ABA 3  $\mu\text{M}$  de entre el 50-70% respecto al 20% del ecotipo silvestre.

Estos resultados indicarían que las semillas de las líneas transgénicas en los diferentes ecotipos (Columbia y Cabo verde) presentan una cierta insensibilidad a dicha hormona, como se puede observar en las figuras R.13.C y D.

### 3.5.3.- Insensibilidad al PCB de las semillas de las plantas *35S:F<sub>s</sub>PTP1*.

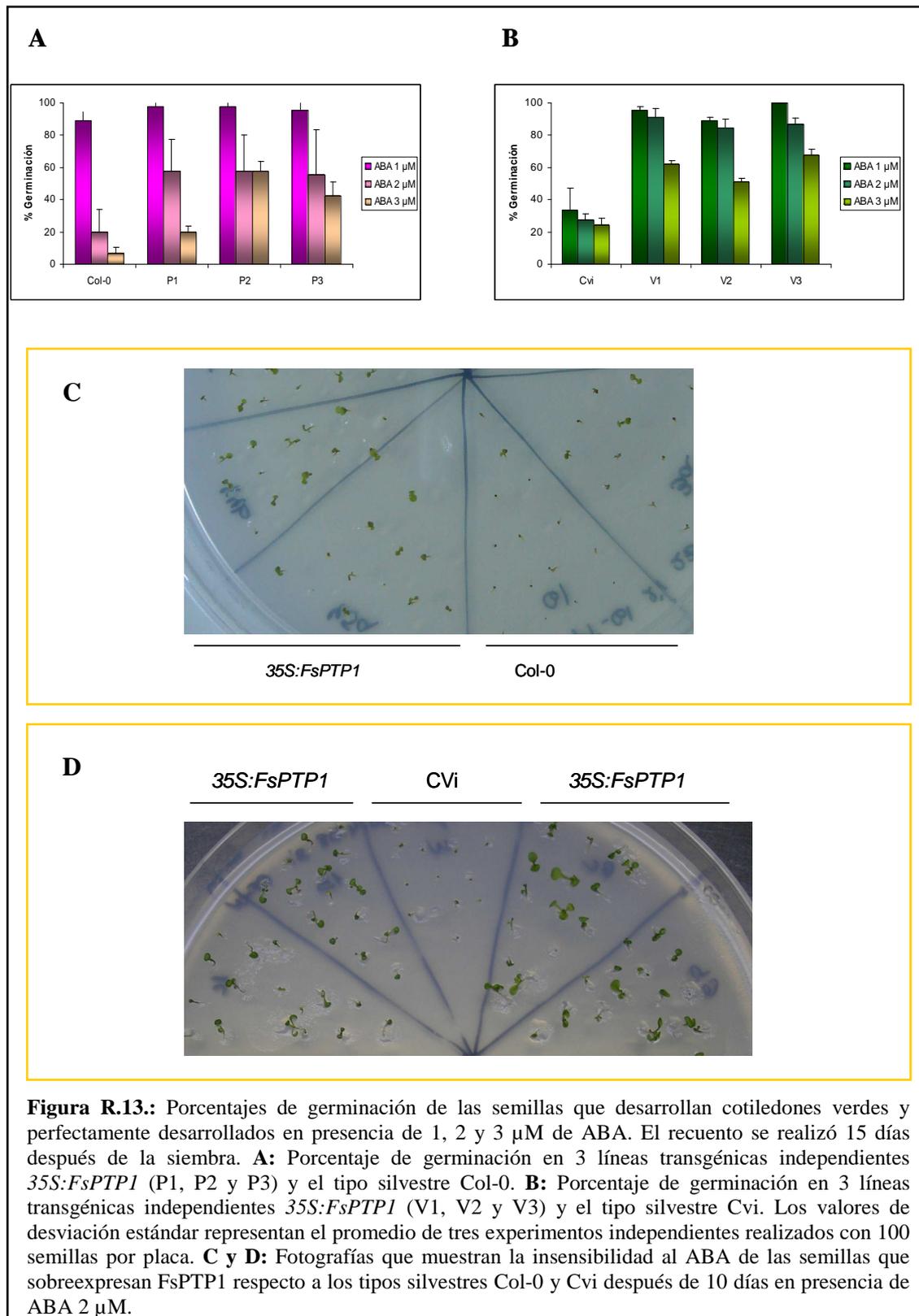
Debido a que el ABA y las GAs juegan papeles antagónicos en la germinación de semillas, se hizo un ensayo para estudiar la germinación en presencia de paclobutrazol (PCB), un inhibidor de la síntesis de GAs.

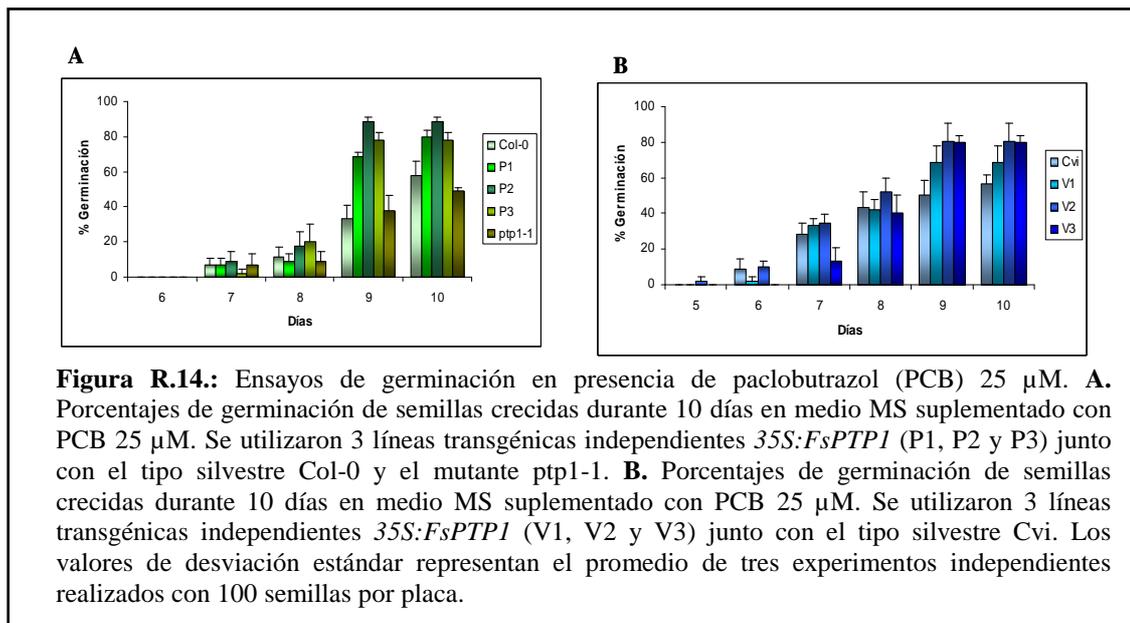
En la figura R.14 se observa que, en contraste con las semillas del tipo silvestre (Col-0 y Cvi) y con el mutante *ptp1-1*, las líneas transgénicas *35S:PTP1* presentan porcentajes de germinación más elevados en presencia de una concentración de PCB (25  $\mu\text{M}$ ), que provoca tanto un retraso como una disminución en los porcentajes de germinación de las semillas. Esta reducción del requerimiento de GAs en nuestras semillas transgénicas sugiere que la expresión de FsPTP1 regula positivamente la germinación de semillas a través del bloqueo de la señal del ABA.

### 3.5.4.- Resistencia al estrés salino y osmótico en las semillas de las plantas *35S:F<sub>s</sub>PTP1*.

Para completar el estudio fenotípico de las semillas que sobreexpresan FsPTP1, y debido a la estrecha relación entre el ABA y la adaptación a diferentes tipos de estrés, se realizaron una serie de ensayos de germinación bajo condiciones de estrés salino y osmótico. Para ello se sembraron semillas de los dos ecotipos silvestres (Col-0 y Cvi) y semillas que sobreexpresan el transgén *F<sub>s</sub>PTP1* en medio MS suplementado con NaCl 350 mM o con manitol 300 y 400 mM.

Como se observa en la figura R.15.A, en un medio suplementado con NaCl 350 mM las líneas transgénicas *35S:F<sub>s</sub>PTP1* son capaces de alcanzar porcentajes de germinación más elevados que las semillas del tipo silvestre; 10 días después de la siembra las semillas que sobreexpresan el transgén *F<sub>s</sub>PTP1* alcanzan valores entre el 70-90% de germinación, mientras que en las semillas de plantas control (Col-0 y Cvi) los valores son del 60 y el 40% respectivamente. En el mutante *ptp1-1*, los porcentajes de germinación no superan el 20%.





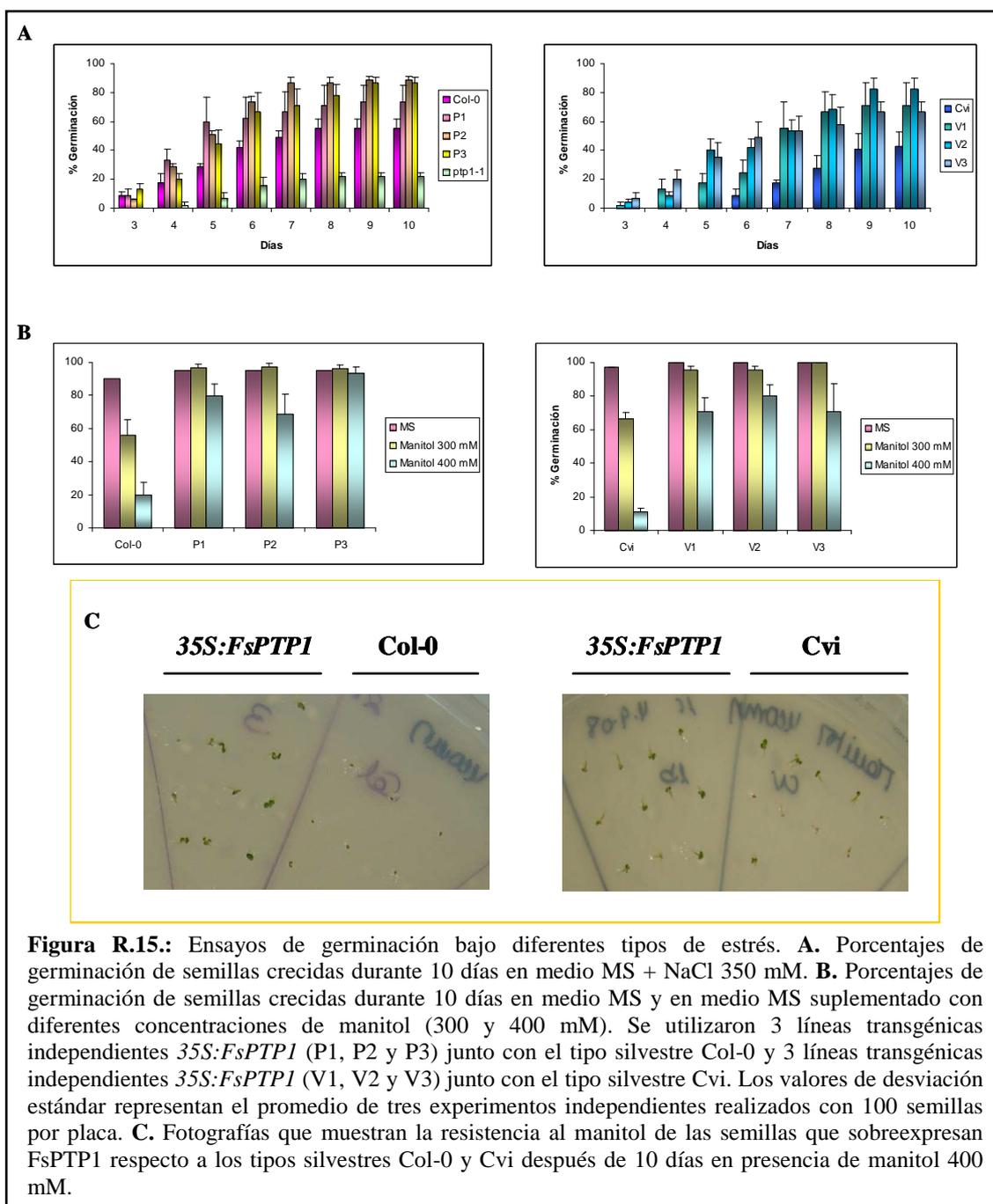
En el caso del estrés osmótico provocado por la adición al medio de manitol, se observa que la resistencia a estas condiciones es muy superior en las plantas transgénicas que en sus correspondientes controles. Así, 10 días después de la siembra los porcentajes de germinación son próximos al 100% para concentraciones de manitol 300 mM en las diferentes líneas transgénicas (P1-P3, V1-V3), mientras que estos porcentajes se reducen en los ecotipos silvestres al 55 y 65 % para Col-0 y Cvi respectivamente. Para una concentración de manitol 400 mM, las semillas de los diferentes ecotipos silvestres presentan unos porcentajes de germinación entre el 10 y el 20%, para Cvi y Col-0 respectivamente, mientras que las líneas transgénicas P1, P2 y P3 presentan unos porcentajes de germinación entre el 65-100% y las líneas V1, V2 y V3, entre el 65-75% (Figura R.15.B).

Estos resultados indican que la sobreexpresión de *F<sub>s</sub>PTP1* confiere mayor resistencia tanto al estrés salino como al estrés osmótico causado por el manitol.

### 3.5.5.- Efecto de la sobreexpresión de *F<sub>s</sub>PTP1* en la transpiración.

Para analizar otras características fenotípicas de nuestras líneas transgénicas y comprobar si la sobreexpresión de esta proteína tirosina fosfatasa inducida por ABA, tiene algún efecto fisiológico en otros órganos de la planta, determinamos los efectos de esta sobreexpresión en otro proceso regulado por ABA, en concreto, en la transpiración por las hojas.

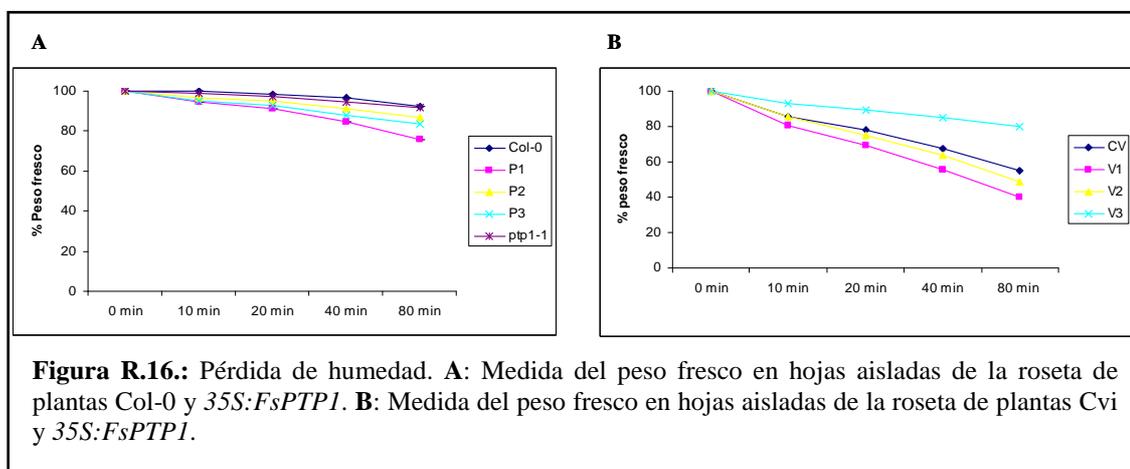
El ABA controla el mecanismo de la apertura y cierre estomático, induciendo el cierre de los estomas, y por tanto, reduciendo la pérdida de agua, en condiciones de sequía. Por eso, realizamos las medidas de la pérdida de humedad en nuestras líneas transgénicas en comparación con plantas de tipo silvestre. Para ello, se cortaron hojas en diferentes tipos de plantas y se realizaron 5 medidas del peso fresco a diferentes tiempos ( $t=0$ ,  $t=10$ ,  $t=20$ ,  $t=40$  y  $t=80$  minutos), en condiciones de humedad relativa del 35%.



Como puede apreciarse en la figura R.16.A, tanto el tipo silvestre (Col-0) como las líneas transgénicas *35S:FspTP1* pierden progresivamente peso fresco, y por lo tanto contenido hídrico, a lo largo del tiempo, pero no se observa un comportamiento significativamente diferente entre las líneas transgénicas P1, P2 y P3 y las del tipo silvestre (Col-0). Por tanto, la sobreexpresión de *FspTP1* no parece tener efecto en el control de la transpiración regulada por ABA en el ecotipo Columbia.

Sin embargo, como se observa en la figura R.16.B, la disminución de peso fresco de las hojas es menor en la línea transgénica V3 que en el ecotipo silvestre Cabo verde. Concretamente, 80 minutos después del corte de la hoja, esta línea mantiene aproximadamente un 80% del peso fresco inicial, en comparación con el 50% del peso fresco en las hojas de Cvi; por tanto, la sobreexpresión de *FspTP1*

parece reducir la pérdida de agua por transpiración, al menos, en esta línea. En el resto de las líneas transgénicas *35S:F<sub>s</sub>PTP1* (V1 y V2), apenas hay diferencias con el tipo silvestre.

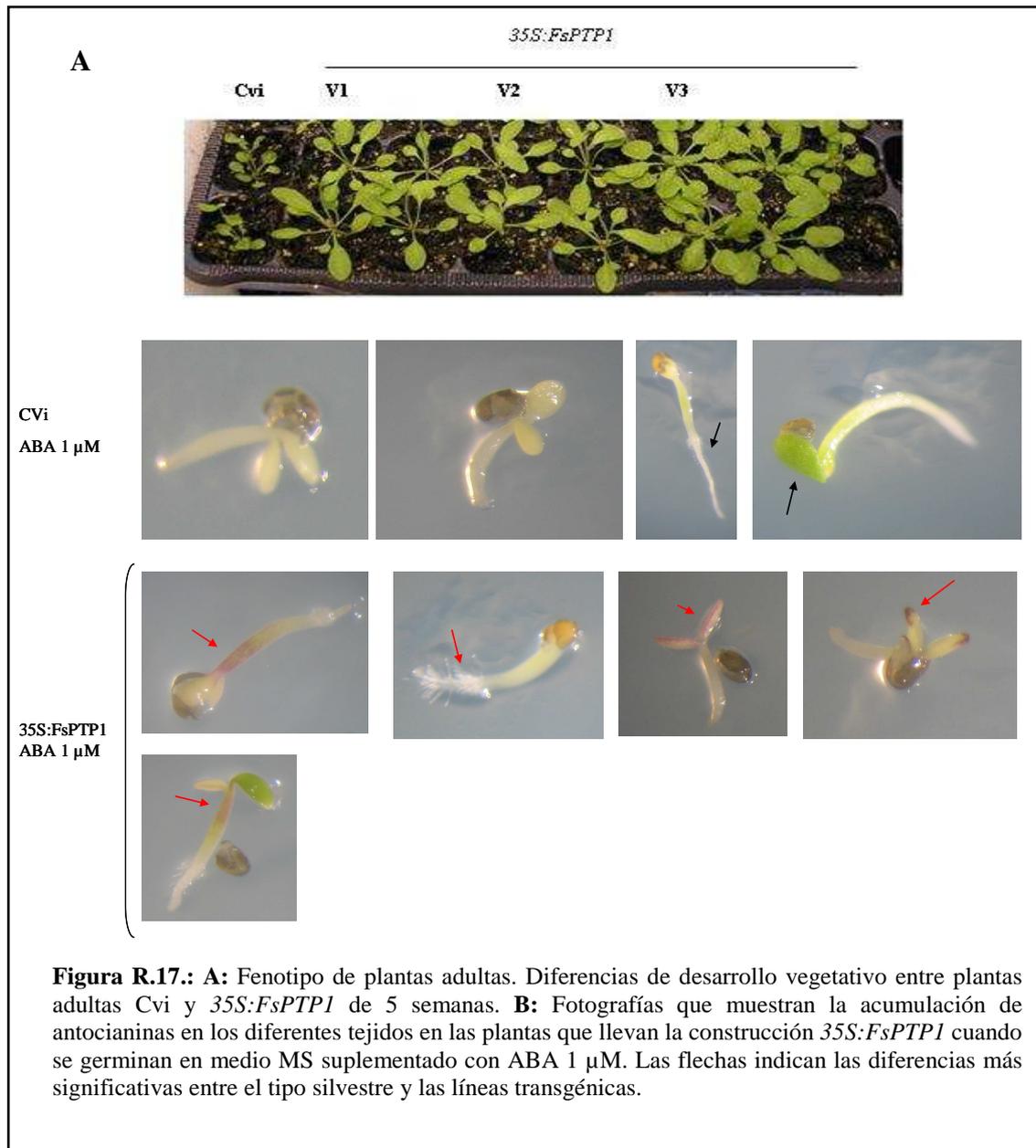


### 3.5.6.- Fenotipo de las plantas transgénicas *35S:F<sub>s</sub>PTP1*.

La sobreexpresión de *F<sub>s</sub>PTP1* presenta efectos fenotípicos diferentes según se trate del ecotipo Columbia o Cabo verde.

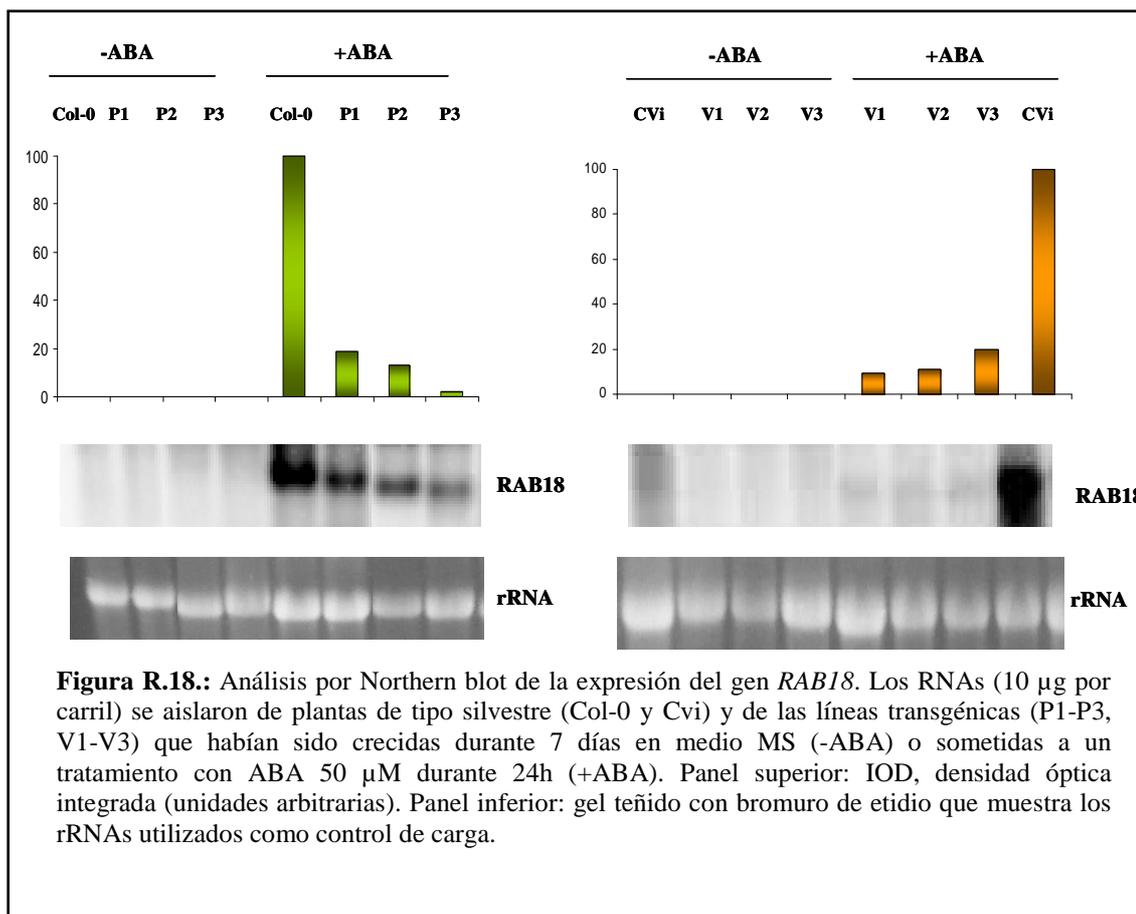
Las plantas transformadas con la construcción *35S:F<sub>s</sub>PTP1* en el ecotipo Columbia, presentan tallos y silicuas más finas que el tipo silvestre; sin embargo, no se aprecian diferencias significativas entre los mutantes con una inserción de T-DNA y el tipo silvestre.

La sobreexpresión de *F<sub>s</sub>PTP1* en plantas del ecotipo Cabo verde si tiene un efecto fenotípico muy claro en los tejidos vegetativos de las plantas transgénicas adultas, ya que, como se puede apreciar en la figura R.17.A, las plantas que portan la construcción *35S:F<sub>s</sub>PTP1*, presentan una hoja de roseta de mayor tamaño y con mayor número de hojas que las plantas del tipo silvestre, siendo el número medio de hojas de 10 en comparación con las 6 presentes en el ecotipo silvestre. Además, se observa que cuando a estas líneas se las somete a diferentes concentraciones de ABA exógeno (0,5, 1, 2 y 3  $\mu$ M), se observa una acumulación de antocianinas (figura R.17.B) en diferentes tejidos vegetativos, como cotiledones y epicotilo, además de un desarrollo anómalo de la raíz, similar a los mutantes *ctrl* de triple respuesta de etileno, comparado con el tipo silvestre presenta un desarrollo vegetativo normal.



### 3.6.- Análisis de la expresión de genes de respuesta a ácido abscísico en plantas transgénicas *35S:F<sub>s</sub>PTP1*.

Para examinar en mayor profundidad si la reducción de la sensibilidad al ABA en nuestras líneas transgénicas iba acompañada por una modificación en la expresión de genes de respuesta a ABA, se estudió la inducción del gen *RABI8* (Lang y Palva, 1992), que presenta una fuerte inducción por esta hormona. El análisis de los niveles de transcritos para este gen (figura R.18), tanto en plantas de tipo silvestre como en las plantas transgénicas *35S:F<sub>s</sub>PTP1* tratadas con ABA 50  $\mu$ M, muestra una fuerte reducción de la expresión de este gen en las líneas transgénicas que sobreexpresan *FsPTP1*, mientras que los niveles de expresión son muy elevados en los dos tipos silvestres (Col-0 y Cvi), lo que indicaría que *FsPTP1* estaría regulando negativamente la expresión de este gen.



#### 4. CARACTERIZACIÓN Y EXPRESIÓN DE UN GEN DE LA FAMILIA GASA (Gibberellic Acid-Stimulated in Arabidopsis) DE *Fagus sylvatica*.

##### 4.1.- Aislamiento y caracterización del clon de cDNA FsGASA4.

El clon de cDNA FsGASA4 había sido aislado por el Dr. D. Reyes en nuestro laboratorio, en una búsqueda diferencial de genes inducidos por giberelinas en una genoteca de cDNA construida a partir de mRNA de semillas de haya (Nicolás et al., 1997).

La secuencia nucleotídica de este cDNA ha quedado registrada en la base de datos EMBL con el n° de acceso AM231807.

##### 4.1.1.- Análisis de la secuencia nucleotídica.

La secuencia completa de este clon de cDNA presentaba una longitud de 682 pb, con una fase de lectura abierta de 323 nucleótidos y regiones 5' y 3' no codificantes de 89 y 268 nucleótidos respectivamente.

La secuencia de nucleótidos correspondiente a este clon de cDNA, así como su traducción en aminoácidos aparece en la figura R.19.

```

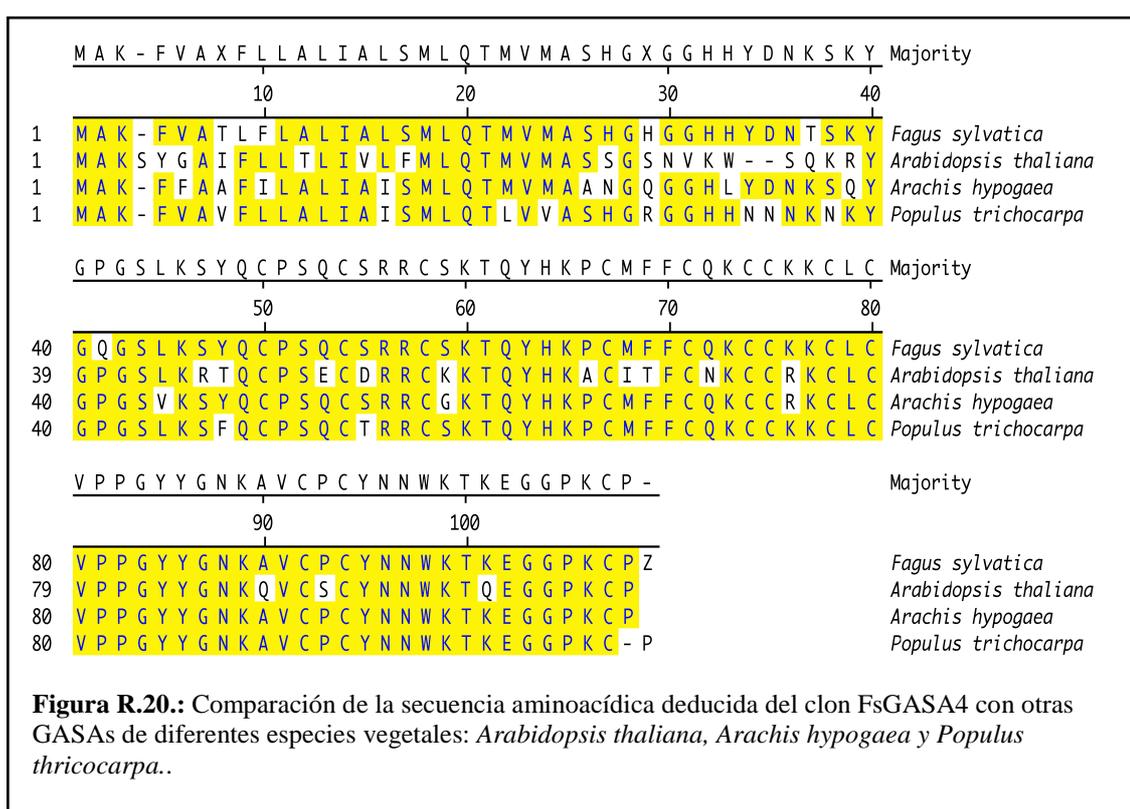
1  AA  TTC GGC ACG AGA TTT TCT TCT TCC AAT TGT GCC TTT GCC TTT TGA GGT TCT GAC AAG
60  CTT AAG AGG GGT TTG ATT GTA GCA ATG ACC ATG GCT AAG TTT GTT GCT ACC TTG TTC TTG
      M A K F V A T L F L
120 GCC CTC ATT GCC CTC TCC ATG CTT CAA ACC ATG GTT ATG GCT TCT CAT GGG CAT GGT GGT
      A L I A L S M L Q T M V M A S H G H G G
180 CAT CAT TAT GAC AAC ACT AGC AAG TAT GGA CAA GGG AGT CTC AAG AGC TAC CAA TGC CCA
      H H Y D N T S K Y G Q G S L K S Y Q C P
240 TCA CAA TGC TCG AGG AGG TGC AGC AAG ACC CAA TAC CAT AAG CCT TGC ATG TTC TTC TGT
      S Q C S R R C S K T Q Y H K P C M F F C
300 CAG AAG TGC TGC AAA AAG TGC CTG TGT GTG CCC CCA GGG TAT TAT GGG AAT AAA GCT GTG
      Q K C C K K C L C V P P G Y Y G N K A V
360 TGC CCT TGC TAC AAC AAC TGG AAG ACC AAG GAA GGA GGC CCC AAG TGC CCT TGA ATT CCC
      C P C Y N N W K T K E G G P K C P *
420 ATC CTT GCC CTT TCA AAT GTT ATC CTA TGA TCC TAT CAT TAG CAT ACT ACT GCA TTA CTA
480 CTA ACT TTT ATA TGT ATT TCT CTT TGA GAT GGG CCT GTT TTG TTG GGT TGA GGA CTT AAA
540 ATG CTG TAT CAA TCA GTC ACT CCT TAG GGG TTT TAC CTA AAT GAG AGT GGC TAG TCT ATA
600 AGT TAT CTG TGA AAT CAC TGG TTT CAC TAA TTA ATA TTT TTG GGG GGG CCC GGA ACC AAT
660 TCG CCC TAT AGG ATC GAT ACA TC

```

**Figura R.19.:** Secuencia nucleotídica del clon FsGASA4 y secuencia de aminoácidos deducida a partir de ella. El asterisco (\*) corresponde al codón de paro.

#### 4.1.2.- Estudio comparativo del clon FsGASA4 con otros miembros de la familia GASA.

La secuencia de nucleótidos del clon de cDNA y su correspondiente traducción en aminoácidos, fueron enviadas a las bases de datos disponibles (GENEMBL y SWISSPROT) para encontrar otros genes y proteínas ya descritos que presentaran secuencias similares. La comparación con todas las secuencias incluídas en estas bases (figura R.20), reveló la existencia de homología con secuencias aminoacídicas de diferentes miembros de la familia GASA de diversas especies vegetales como *Populus thricocarpa* (nº de acceso A9P8E0) que presenta un 86,9% de similitud, *Arachis hypogaea* (nº de acceso B400077) con un 75,7% de similitud y *Arabidopsis thaliana* (nº de acceso P466690) que presenta un 67,6% de similitud, de lo que se dedujo que este clon correspondía a un gen perteneciente a la familia génica denominada GASA (*Giberellic Acid Stimulated in Arabidopsis*), concretamente a una GASA de tipo 4, y por tanto se le denominó FsGASA4.



#### 4.1.3.-Características de la proteína deducida de la secuencia nucleotídica.

La proteína FsGASA4 deducida de la secuencia nucleotídica consta de 107 aminoácidos que forman un polipéptido con un tamaño molecular de 11.95 kDa y un punto isoelectrico de 8.49.

El análisis de su composición muestra un porcentaje de aminoácidos cargados de un 21.36%, un 25.45% de aminoácidos polares y destacando un 41.36% de hidrofóbicos. Hay que destacar la abundancia en leucina (14.09%), serina (9.09%), prolina (8,64%) y alanina (7.27%), a la vez que el bajo contenido en aspártico, histidina y glutamina (1,82%) (Figura. R.21).

El análisis de la secuencia aminoacídica mediante la base de datos PROSITE, reveló la presencia de un dominio rico en cisteína (característico de este grupo) en la posición 50-93, un sitio de N-glicosilación (35-38), tres dianas de fosforilación (en los residuos 36-39, 43-45, 51-53), un sitio de N-miristilación (52-55), así como una diana de fosforilación dependiente de AMPc (35-40).

Adicionalmente, la base de datos SignalP v3.0 reveló la existencia de una secuencia señal de anclaje en el aminoácido 25, dentro de la región N-terminal, que probablemente sirve para su secreción al espacio extracelular, siendo ésta una característica de este grupo de proteínas.

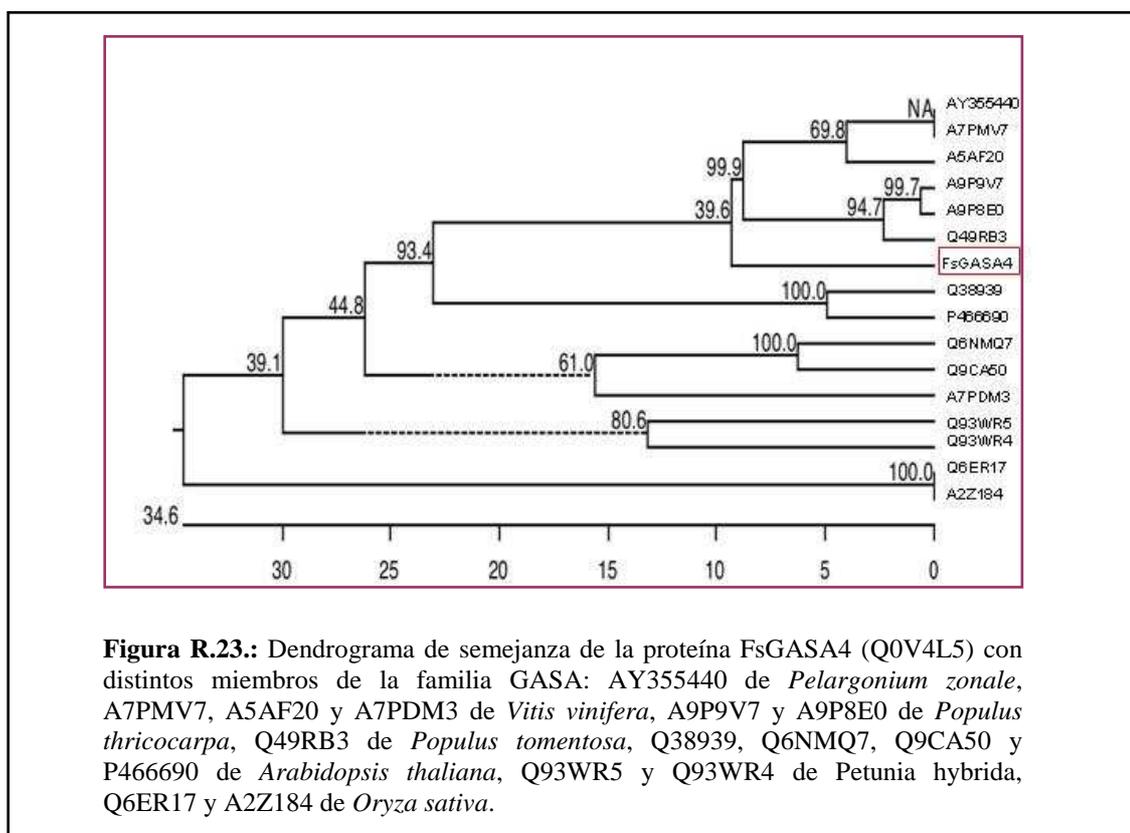
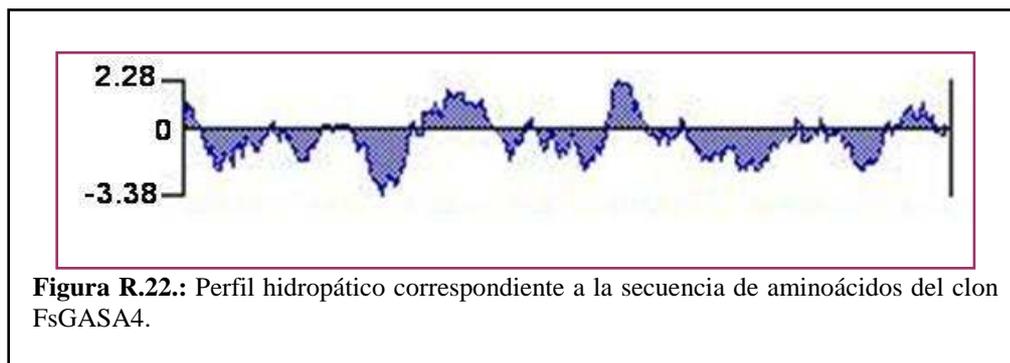
El estudio del perfil de hidrofobicidad obtenido según el algoritmo de Kyte y Doolittle (Figura. R.22), pone de manifiesto una de las características de este grupo de proteínas, que es su carácter principalmente hidrofóbico, estando varias de estas regiones en el extremo N-terminal.

#### 4.1.4.- Relación filogenética de FsGASA4 con otros miembros de la familia GASA.

El esquema de la figura R.23 muestra la relación filogenética entre FsGASA4 y diferentes miembros de la familia GASA descritos en plantas. El dendrograma de semejanza muestra que la proteína se encuentra situada en una rama independiente dentro de un grupo en el que se encontraría junto con AY355440 de *Pelargonium zonale*, A5AF20 y A7PMV7 de *Vitis vinifera*, A9P9V7, A9P8E0 de *Populus thricocarpa* y Q49RB3 de *Populus tomentosa*.

Aminoácidos	Número	% Peso	% Frecuencia
<b>Cargados (RKHYCDE)</b>	47	25.73	21.36
<b>Ácidos (DE)</b>	11	5.62	5
<b>Básicos (KR)</b>	17	10.24	7.73
<b>Polares (NCQSTY)</b>	56	24.3	25.45
<b>Hidrofóbicos(AILFWV)</b>	91	42.3	41.36
<b>A Ala</b>	16	4.68	7.27
<b>C Cys</b>	10	4.25	4.55
<b>D Asp</b>	4	1.9	1.82
<b>E Glu</b>	7	3.72	3.18
<b>F Phe</b>	11	6.67	5
<b>G Gly</b>	14	3.29	6.36
<b>H His</b>	4	2.26	1.82
<b>I Ile</b>	15	6.99	6.82
<b>K Lys</b>	6	3.17	2.73
<b>L Leu</b>	31	14.45	14.09
<b>M Met</b>	8	4.32	3.64
<b>N Asn</b>	6	2.82	2.73
<b>P Pro</b>	19	7.6	8.64
<b>Q Gln</b>	4	2.11	1.82
<b>R Arg</b>	11	7.08	5
<b>S Ser</b>	20	7.17	9.09
<b>T Thr</b>	11	4.58	5
<b>V Val</b>	12	4.9	5.45
<b>W trp</b>	6	4.6	2.73
<b>Y Tyr</b>	5	3.36	2.27

**Figura R.21.:** Composición de aminoácidos de la proteína deducida a partir de la secuencia nucleotídica de FsGASA4.

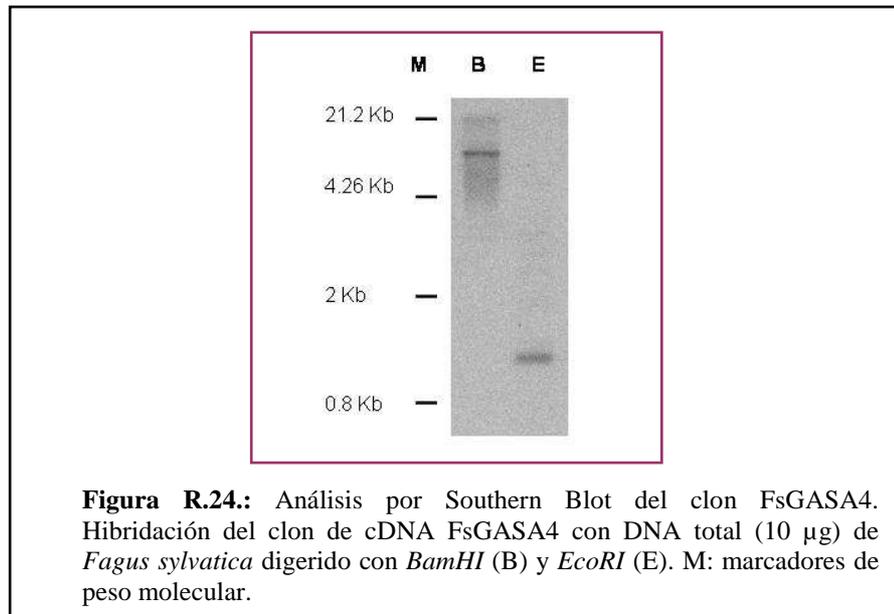


#### 4.1.5.- Análisis por Southern Blot.

Para determinar el número de copias del gen clonado presentes en el genoma de *Fagus sylvatica*, se purificó el DNA total de haya y se sometió a digestión con dos enzimas de restricción: *BamHI* y *EcoRI*. Los fragmentos obtenidos se separaron en gel de agarosa y se hibridaron en condiciones restrictivas (65°C) con una sonda construida a partir del clon FsGASA4. La correspondiente autorradiografía muestra la presencia de un gen simple por genoma haploide en *F. sylvatica*, ya que al cortar el DNA con estas dos endonucleasas aparece, en ambos casos, una única banda (Figura R.24).

#### 4.2.- Expresión del clon FsGASA4.

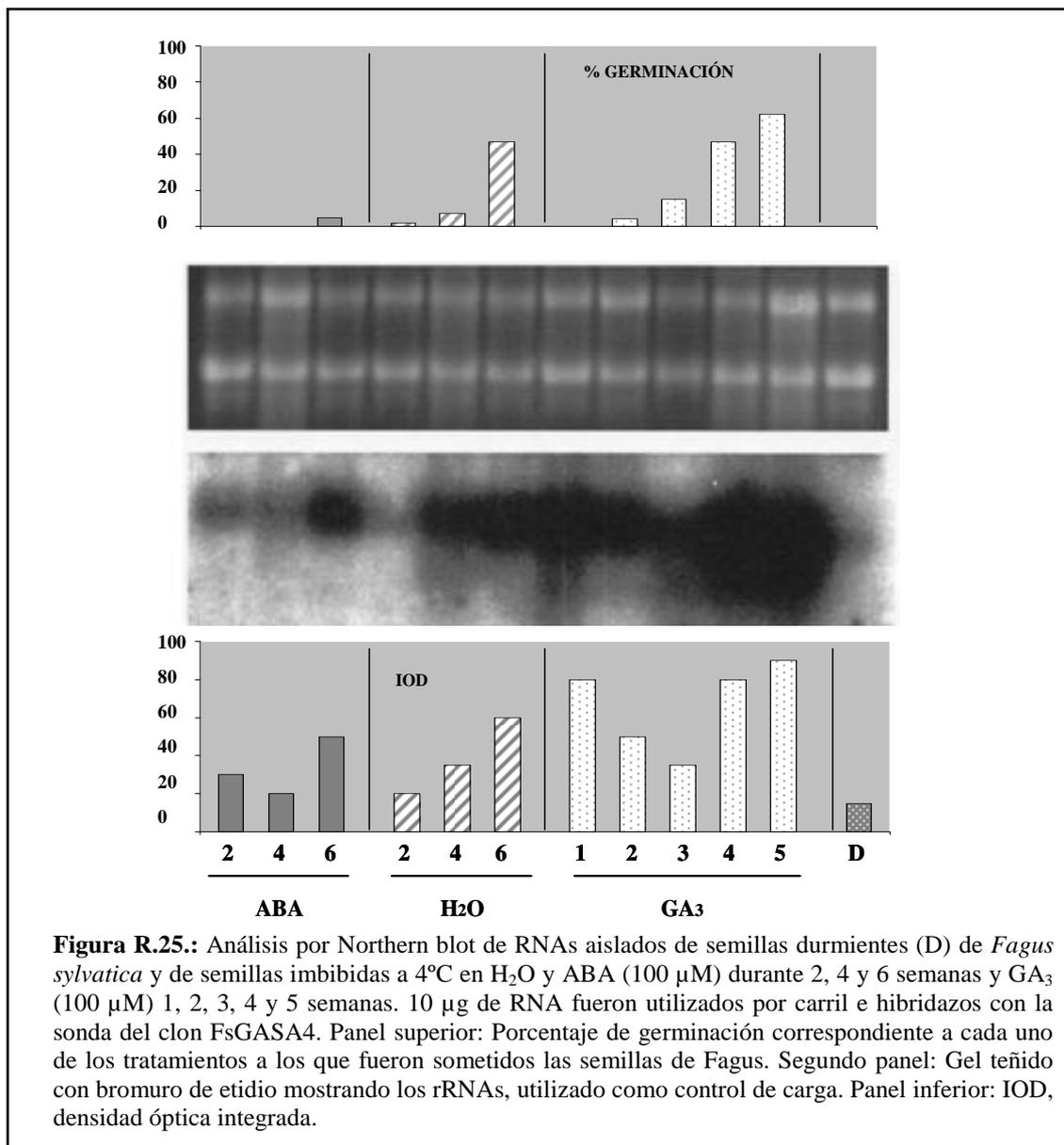
Una vez caracterizado este clon, se procedió al análisis de la expresión del gen correspondiente en semillas durmientes sometidas a los distintos tratamientos utilizados en este trabajo. Para ello se aislaron los RNAs de las semillas imbibidas durante 2 a 6 semanas en H<sub>2</sub>O, ABA y GA<sub>3</sub>, y se analizaron por la técnica de Northern blot.



##### 4.2.1.- Estudio de la expresión del clon FsGASA4 durante la estratificación y en respuesta a diferentes tratamientos.

En el estudio de la expresión de este clon, se analizaron los niveles de sus transcritos durante la estratificación y los efectos de la aplicación exógena de ABA y de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>).

Como se puede observar en la figura R.25, los niveles de expresión del mensajero correspondiente a FsGASA4 son muy bajos en semillas durmientes, aumentando durante la estratificación, tratamiento que provoca una lenta salida de la dormición, fundamentalmente tras seis semanas en agua a 4°C. En presencia de GA<sub>3</sub>, hormona que va a producir una rápida salida de la dormición, se observa un notable incremento en los niveles de expresión del transcrito. Sin embargo, en el tratamiento con ABA, que mantiene a las semillas en dormición, los niveles de expresión son inferiores a los observados en el control en agua. Por tanto, los niveles de expresión de este gen claramente se correlacionan con el proceso de salida de la dormición, por lo que se podría pensar que este gen podría estar relacionado con el mismo.

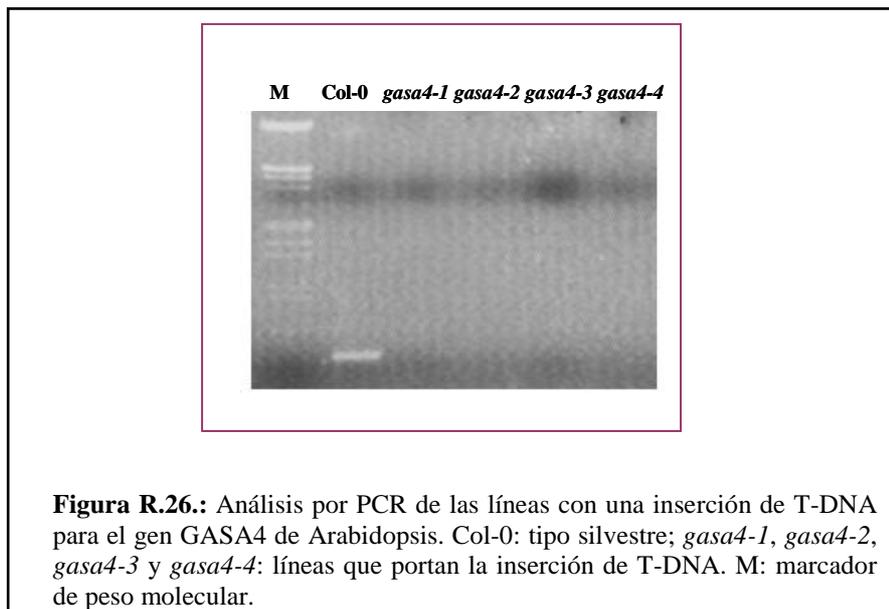


## 5.- ANÁLISIS FUNCIONAL DE FSGASA4.

El siguiente paso, y al igual que en el caso de *FsPTPI*, fue la realización de un análisis funcional de este gen, por lo que se utilizaron mutantes de pérdida de función del gen *GASA4* de *Arabidopsis thaliana*, así como también se obtuvieron plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan el gen *FsGASA4* de haya.

### 5.1.- Estudio y caracterización de los mutantes de T-DNA *gasa4*.

Se utilizaron mutantes de pérdida de función con una inserción de T-DNA en el gen At5g15230 (*GASA4* de *Arabidopsis thaliana*), SALK\_042431 (Salk Institute, San Diego, CA, USA); la inserción de T-DNA se encuentra cercana al extremo 5' del exón 1 de dicho gen. Las semillas con dicha inserción se seleccionaron por su resistencia al antibiótico kanamicina, conferida por el gen *NPTII*; una vez obtenidas las líneas homocigóticas, quedó demostrado por análisis de PCR (apartado 4.10.1 de Materiales y Técnicas) (Figura R.26) que los diferentes mutantes *gasa4* son nulos, ya que la expresión del mensajero queda totalmente suprimida, como era de esperar por la zona en la que se inserta el T-DNA, es decir, en uno de los exones iniciales.

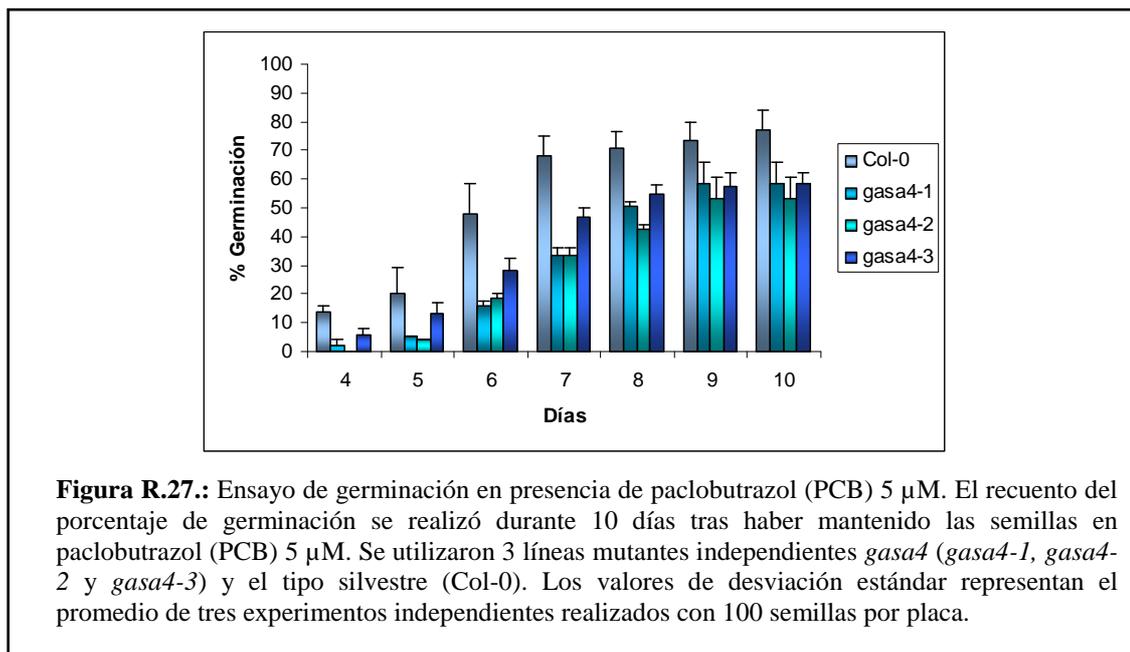


Estas líneas se utilizaron para la realización de análisis fenotípicos.

Para analizar si la pérdida de función del gen *GASA4* afecta a la sensibilidad de las semillas al PCB, un inhibidor de la síntesis de giberelinas, se realizaron una serie de ensayos de germinación en presencia de PCB 5  $\mu$ M, utilizando como control semillas de *A. thaliana* de tipo silvestre (Col-0).

Como podemos observar en la figura R.27, los mutantes muestran un menor porcentaje de germinación, tomándose como tal el desarrollo de cotiledones verdes, que el tipo silvestre. Mientras que el tipo silvestre (Col-0) alcanza porcentajes de germinación cercanos al 80% al cabo de 10 días, en las líneas mutantes se reduce hasta el 50-60%.

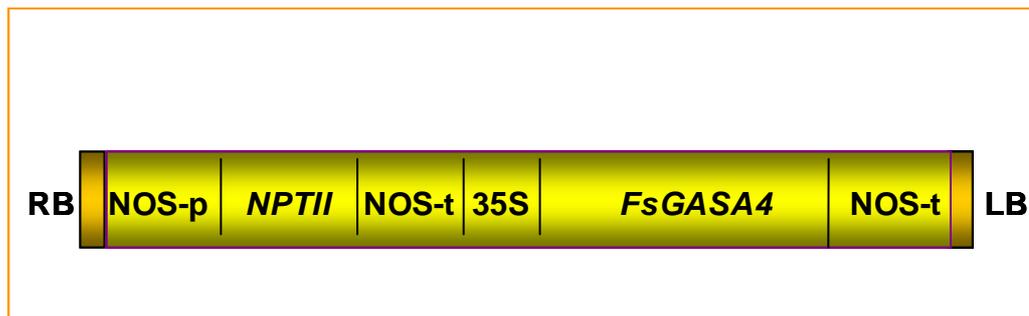
Estos resultados indican que la mutación en el gen *GASA4* confiere una mayor sensibilidad al PCB, y mayor requerimiento de giberelinas.



## 5.2.- Generación de las líneas transgénicas 35S:*FsGASA4*.

Para profundizar en el estudio del papel de este gen en la ruta de señalización de las GAs y en los procesos regulados por esta hormona, especialmente en la dormición/germinación de semillas, y teniendo en cuenta el desconocimiento existente sobre las posibles funciones de este tipo de genes, principalmente en semillas, decidimos realizar un análisis funcional mediante la sobreexpresión de *FsGASA4* en *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0, ya que, como ya hemos comentado, aún no es posible realizar transformaciones genéticas en haya. Para ello se siguió la misma estrategia descrita en el apartado R.2.3 para la obtención de plantas transgénicas 35S:*FsPTP1*. En este caso, diseñamos la construcción que aparece en la figura R.28, que contiene la región codificante del clon *FsGASA4* bajo la regulación del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, el promotor y el terminador del gen *NOS* de *Agrobacterium* que codifica la nopalina sintetasa, el gen de la neomicina fosfotransferasa *NPTII* que confiere la resistencia a kanamicina y las regiones RB (“right border”) y LB (“left border”) del T-DNA del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*, y con la que obtuvimos plantas transgénicas que sobreexpresan *FsGASA4* mediante la técnica de infiltración *in planta* (apartado M.7.1.5 de Materiales y Técnicas).

Las semillas transformadas se seleccionaron por la resistencia a kanamicina conferida por el gen *NPTII*, de idéntico modo al descrito en el apartado R.2.3.



**Figura R.28.:** Construcción usada para la transformación de plantas de *Arabidopsis*. RB, extremo derecho del T-DNA; LB, extremo izquierdo del T-DNA; 35S, promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor; *NPTII*, neomicina fosfotransferasa II; NOS-p, promotor NOS; NOS-t, terminador NOS.

### 5.3.- Segregación del transgén *FsGASA4* en la progenie.

Los patrones de segregación de resistencia a kanamicina de todas las líneas transgénicas *35S:F<sub>s</sub>GASA4*, se realizaron mediante la misma aproximación estadística descrita en el apartado R.2.4, obteniéndose en este caso los valores de  $\chi^2$  que se detallan en la tabla R.IV.

Líneas	KanR	KanS	3R:1S (1 inserto)	15R:1S (2 insertos)	63R:1S (3 insertos)
G1	72	28	0,33	77,06	435,08
G2	74	26	0,013	63,24	370,55
G3	75	25	0,0133	56,84	340,23
G4	62	38	8,33	166,66	835,38
G5	72	28	0,33	77,06	435,08

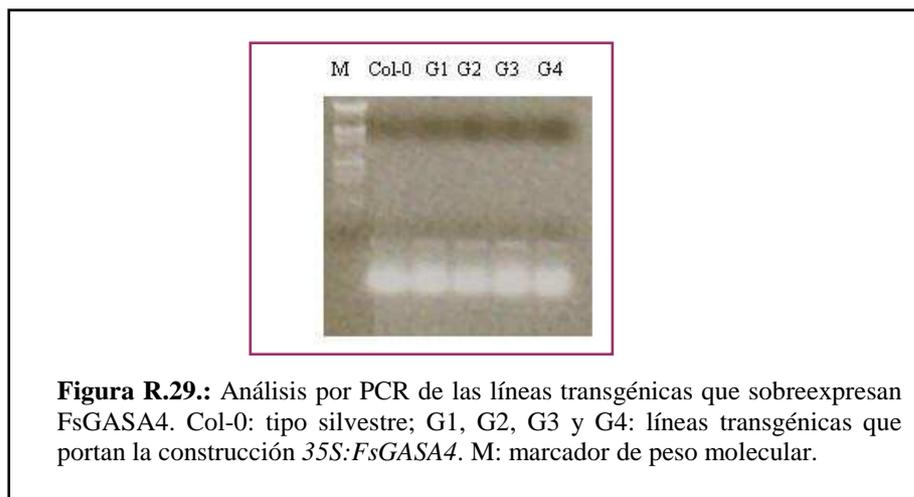
**Tabla R.IV.:** Segregación de la resistencia a kanamicina en la generación T2 de las líneas transgénicas. KanR: número de semillas resistentes a kanamicina; KanS: número de semillas sensibles a kanamicina. Para cada cociente se indica la  $\chi^2$ .

Según este cálculo estadístico (Parker, 1989), las líneas que presentan un valor de  $\chi^2$  menor de 3.841 son G1, G2, G3 y G5, por tanto, estas líneas muestran una resistencia a kanamicina que se ajusta a la segregación mendeliana de una única inserción del gen *FsGASA4*.

### 5.4.- Caracterización molecular del transgén *FsGASA4*.

Una vez obtenidas las plantas transgénicas homocigotas (T3) para el gen *FsGASA4* de las líneas G1, G2, G3 y G4, fueron caracterizadas molecularmente mediante PCR, Southern y Northern blot.

La incorporación del gen *FsGASA4* en el genoma de las líneas transgénicas seleccionadas se comprobó mediante ensayos por PCR (Figura R.29), como se indica en el apartado 4.10.1 de Materiales y Técnicas. La presencia del gen en el ecotipo silvestre Col-0 hace pensar que se trata del gen endógeno *GASA4* de *A. thaliana*, ya que la homología entre ambos es muy elevada.



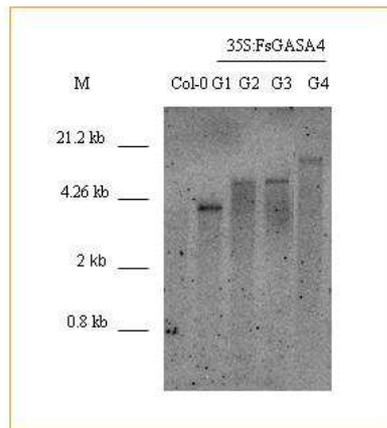
Mediante análisis por Southern blot (Figura R.30) se confirmó la inserción del gen *FsGASA4*, utilizando para ello una sonda específica del gen, en el genoma de las plantas transgénicas como gen de copia única.

La expresión del transgén se analizó por Northern blot (Figura R.31), utilizando una sonda específica del gen, observándose una mayor expresión del gen *FsGASA4* en las líneas transgénicas G1, G2, G3 y G4, mientras que en las plantas de tipo silvestre (Col-0) no se detecta su expresión.

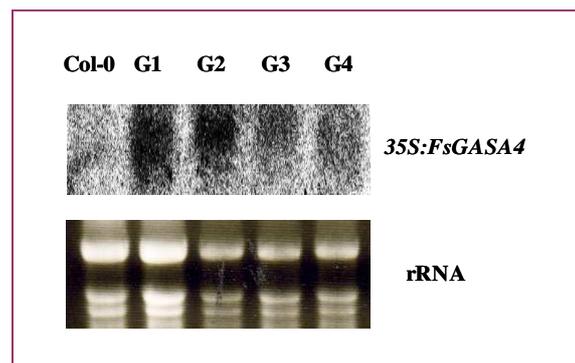
#### 5.5.- Caracterización fenotípica de las semillas de las plantas *35S:GASA4*.

A pesar de la poca información que se tiene sobre esta gran familia génica (GASA) a la que pertenece *FsGASA4*, especialmente en semillas, los datos que teníamos acerca de la expresión de este gen en semillas de haya (inducida por GAs), nos hacía pensar que *FsGASA4* podía estar relacionada en el control de la transición de dormición a germinación en semillas.

Para estudiar más a fondo la función de este gen, realizamos una serie de análisis con semillas de las líneas transgénicas seleccionadas G1, G2, G3 y G4, portadoras del transgén *FsGASA4*, utilizando como control semillas del ecotipo silvestre (Col-0).



**Figura R.30.:** Análisis por Southern blot de las líneas transgénicas que sobreexpresan FsGASA4. Col-0: tipo silvestre; G1, G2, G3 y G4: líneas transgénicas que portan la construcción *35S:F sGASA4*. El DNA genómico (5 µg) fue digerido con *EcoRI* e hibridado con una sonda específica del gen *FsGASA4*.

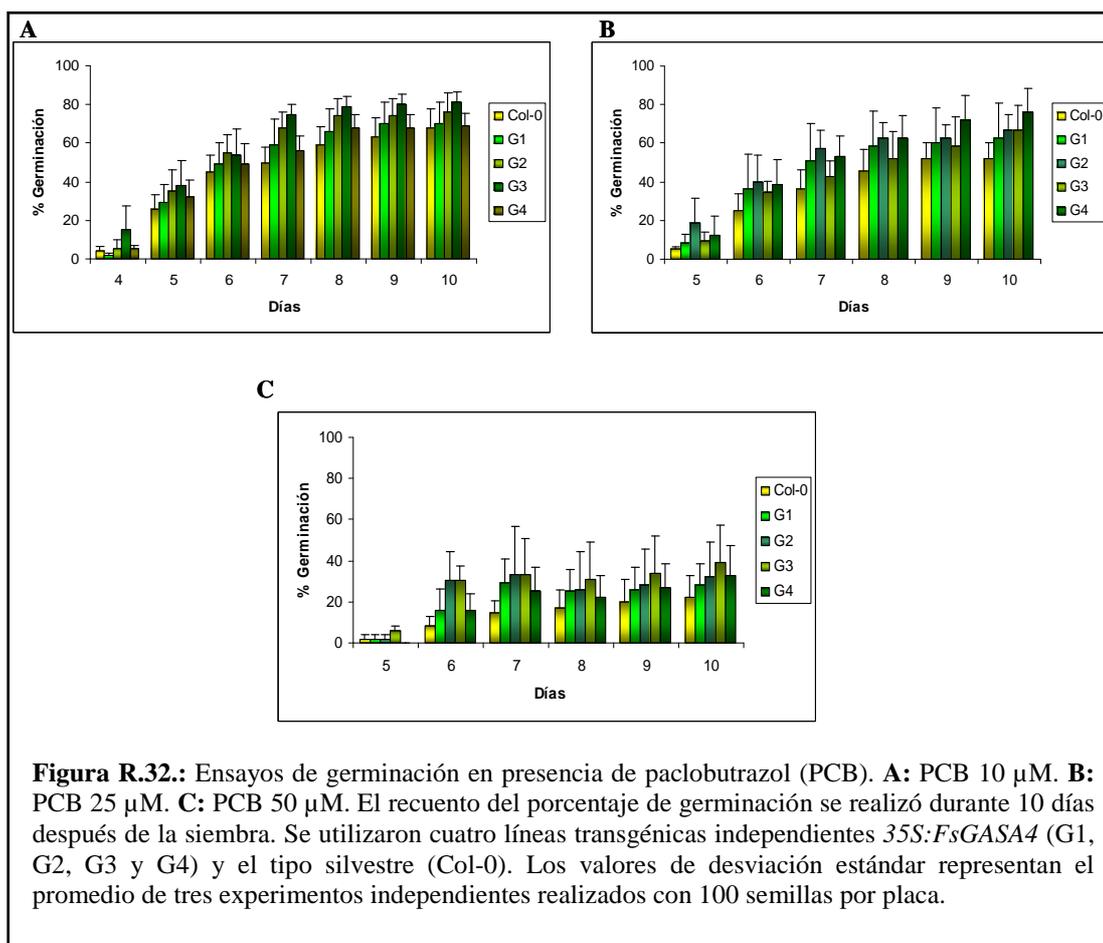


**Figura R.31.:** Análisis por Northern blot de las líneas transgénicas que sobreexpresan FsGASA4. Col-0: tipo silvestre; G1, G2, G3 y G4: líneas transgénicas que portan la construcción *35S:F sGASA4*. Se utilizaron 10 µg de RNA por muestra, que se hibridaron con una sonda obtenida a partir de la pauta de lectura abierta del cDNA de *FsGASA4*. Panel inferior: RNA ribosómico usado como control.

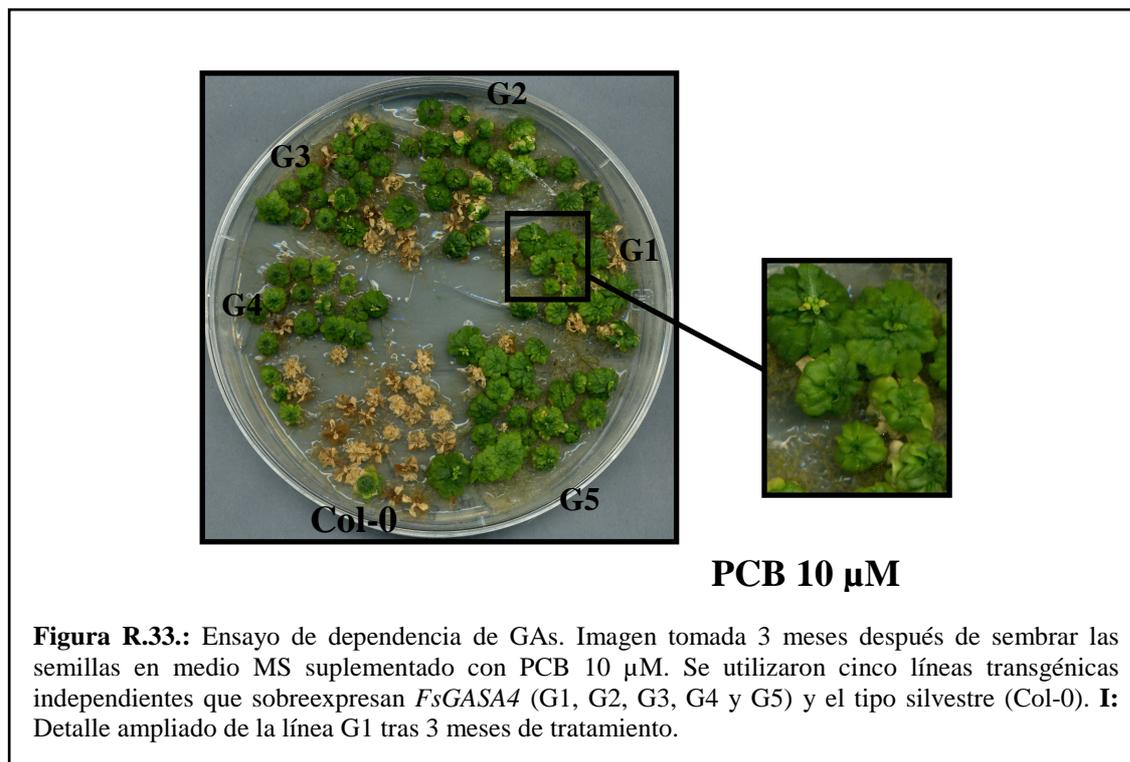
### 5.5.1.- Insensibilidad al PCB de las semillas de las plantas *35S:F sGASA4*.

Debido a que las GAs juegan un papel importante en la salida de la dormición de semillas, se hizo un ensayo para estudiar la germinación en presencia de paclobutrazol (PCB), un inhibidor de la síntesis de GAs.

En la figura R.32 se observa el porcentaje de germinación para diferentes concentraciones de PCB (10, 25 y 50 µM). Vemos que, en contraste con las semillas del tipo silvestre, las líneas transgénicas *35S:GASA4* son capaces de germinar más y desarrollar cotiledones verdes en presencia de diferentes concentraciones de PCB.



Adicionalmente, comprobamos que el requerimiento de GAs era menor en las líneas transgénicas *35S:F<sub>s</sub>GASA4* que en el tipo silvestre (Col-0), ya que tras 3 meses de crecimiento en medio MS suplementado con PCB (10  $\mu$ M), las líneas transgénicas sobrevivían y eran incluso capaces de florecer y formar silicuas, mientras que la mayoría de las plántulas del tipo silvestre morían en las mismas condiciones (Figura R.33).

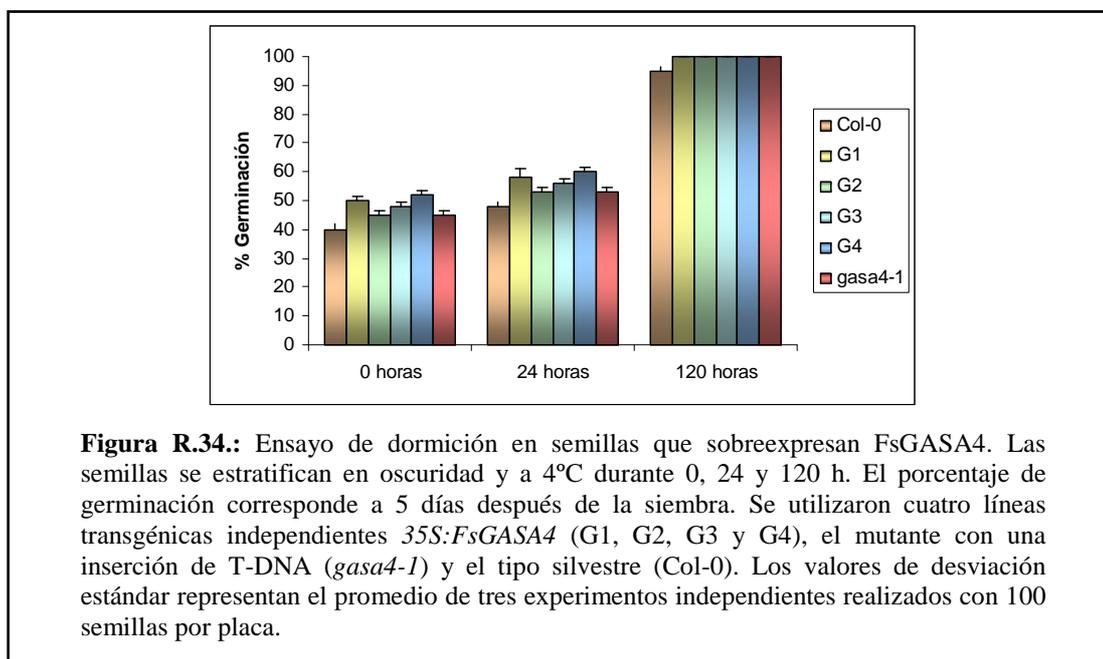


#### 5.5.2.- Estudio de la dormición en semillas que sobreexpresan *FsGASA4*.

Para realizar los ensayos de dormición de semillas de las líneas transgénicas *35S:F<sub>s</sub>GASA4*, y al igual que en los experimentos detallados en el apartado 2.6.1 de Resultados, las semillas fueron previamente estratificadas durante 0, 24 y 120 horas en oscuridad y posteriormente germinadas en condiciones de día largo a 21°C.

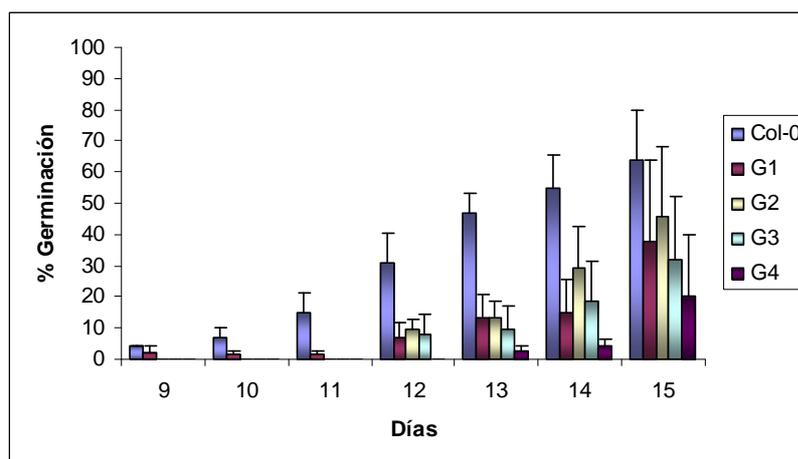
Las semillas de *A. thaliana* ecotipo Col-0 presentan una dormición endógena que impide que la semilla germine si no se elimina mediante aplicación de GAs o estratificación (Koorneef y Karszen, 1994). Así, comprobamos que, en estas semillas, los porcentajes de germinación son muy bajos (aproximadamente el 40%) 5 días después de la siembra si no se han sometido a estratificación previa. Las semillas procedentes de las plantas transgénicas portadoras de la construcción *35S:GASA4* (G1, G2, G3 y G4) presentan porcentajes de germinación similares al tipo silvestre (entre el 45-50%) al igual que el mutante con una inserción de T-DNA (aproximadamente el 45%) (Fig. R.34). A medida que sometemos a las semillas Col-0 a períodos más largos de estratificación, se produce una reducción de la dormición y los porcentajes de germinación alcanzan valores cercanos al 48% y 95% después de períodos de estratificación de 24 y 120 horas. En las semillas de plantas G1, G2, G3 y G4, así como en el mutante *gasa4-1*, también se aprecia una reducción de la dormición debida a los tratamientos de estratificación, llegando a valores similares al del tipo silvestre. Por tanto, el tratamiento de estratificación disminuye la dormición de las semillas de las plantas que sobreexpresan *FsGASA4*, así como la del mutante *gasa4-1*, pero siguen presentando porcentajes de germinación muy similares al ecotipo silvestre, por lo que el grado de dormición parece ser semejante. El hecho de que no se aprecien diferencias en el mutante *gasa4-1* respecto a las líneas transgénicas ni al ecotipo silvestre, puede ser debido al solapamiento de función de

otros miembros de la familia GASA de Arabidopsis, ya que muchas de ellas presentan funciones redundantes, o bien a que realmente este gen no tiene ninguna función en el proceso de salida de la dormición.



### 5.5.3.- Sensibilidad al ABA de las semillas de las plantas *35S:F<sub>s</sub>GASA4*.

Para analizar si la sobreexpresión de FsGASA4 afecta a la sensibilidad de las semillas al ABA, se estudió la germinación de las semillas de las cuatro líneas *35S:F<sub>s</sub>GASA4* elegidas para la realización de este trabajo, que se sembraron en medio MS y se analizaron los porcentajes de germinación en presencia de ABA 1  $\mu$ M, utilizando siempre el ecotipo Col-0 como control. Como se puede observar en la figura R.35, 15 días después de la siembra en presencia de ABA, las semillas del ecotipo silvestre son capaces de alcanzar valores de germinación del 64%; sin embargo, las semillas de las plantas que sobreexpresan el transgén FsGASA4 sufren una inhibición de la germinación en presencia de ABA (entre el 20-46% de germinación), lo que significa que la sobreexpresión de FsGASA4 en las semillas provoca un aumento en la sensibilidad al ABA.



**Figura R.35.:** Ensayo de germinación en ABA de semillas *35S:F<sub>s</sub>GASA4*. Porcentajes de germinación de las semillas que desarrollan cotiledones verdes y perfectamente desarrollados en presencia de ABA 1  $\mu$ M. El recuento se realizó durante 15 días después de la siembra. Se utilizaron cuatro líneas transgénicas independientes *35S:F<sub>s</sub>GASA4* (G1, G2, G3 y G4) y el tipo silvestre Col-0. Los valores de desviación estándar representan el promedio de tres experimentos independientes realizados con 100 semillas por placa.

#### 5.5.4.- Resistencia a diferentes tipos de estreses abióticos (osmótico, salino, térmico y oxidativo) en las semillas de las plantas *35S:F<sub>s</sub>GASA4*.

Para completar el estudio fenotípico de las semillas que sobreexpresan *F<sub>s</sub>GASA4*, se realizaron una serie de ensayos de germinación bajo diferentes condiciones de estrés abiótico, como son el salino, osmótico, oxidativo y térmico.

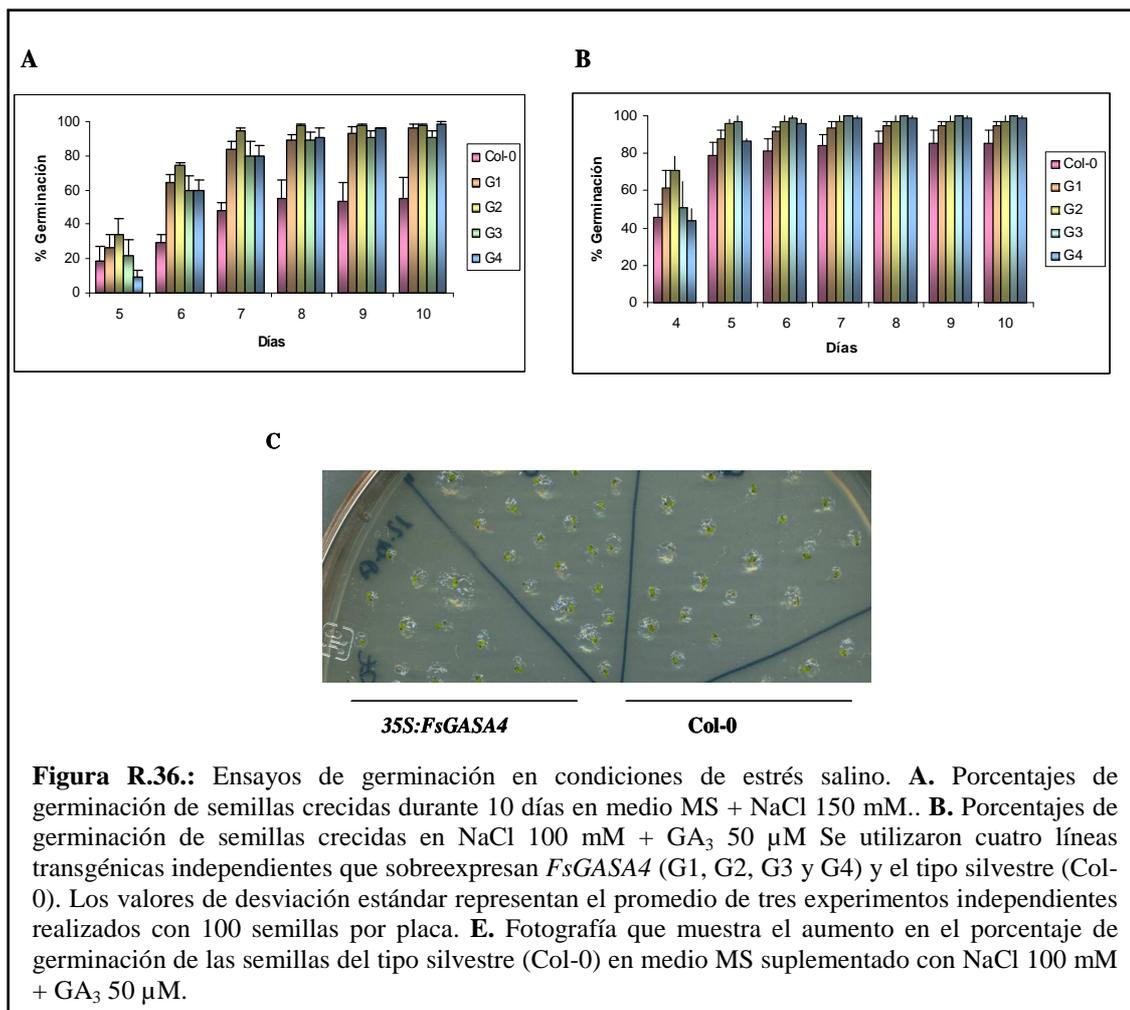
En la figura R.36.A se puede observar cómo en un medio suplementado con NaCl 150 mM las líneas transgénicas *35S:F<sub>s</sub>GASA4*, en contraste con las semillas silvestres, son capaces de alcanzar porcentajes de germinación mayores; 7 días después de la siembra las semillas que sobreexpresan el transgén *F<sub>s</sub>GASA4* alcanzan valores del 80% de germinación, siendo del 100% al cabo de 10 días, mientras que las semillas de plantas control (Col-0) sólo llegan al 50%.

En condiciones de estrés osmótico debido a la suplementación del medio MS con una concentración de manitol 400mM (Figura R.37.A), se observa un aumento en el porcentaje de germinación a lo largo del tiempo en las líneas transgénicas *35S:F<sub>s</sub>GASA4* en comparación con el tipo silvestre (Col-0), que al cabo de 15 días sólo alcanza valores del 50%, estando entre el 65-90% para las semillas de las plantas transgénicas. En el caso de los mutantes de pérdida de función, los porcentajes de germinación son similares en todos los casos a los observados en el tipo silvestre (datos no mostrados), lo que puede ser debido a la existencia de redundancia con otros miembros de esta familia génica.

Dado que el gen *F<sub>s</sub>GASA4* está fuertemente inducido por GAs, decidimos analizar si la adición exógena de ácido giberélico era capaz de mejorar las respuestas de las semillas del tipo silvestre (Col-0) tanto al estrés salino como al osmótico. Para ello crecimos las diferentes líneas *35S:F<sub>s</sub>GASA4* y el tipo silvestre en un medio con NaCl 100 mM suplementado con GA<sub>3</sub> 50  $\mu$ M. Como se observa en la figura R.36.B, la adición exógena de esta hormona mejora la resistencia de las plantas del tipo silvestre (Col-0) al estrés salino, ya que se produce un adelanto de un día en la germinación, llegándose a alcanzar porcentajes

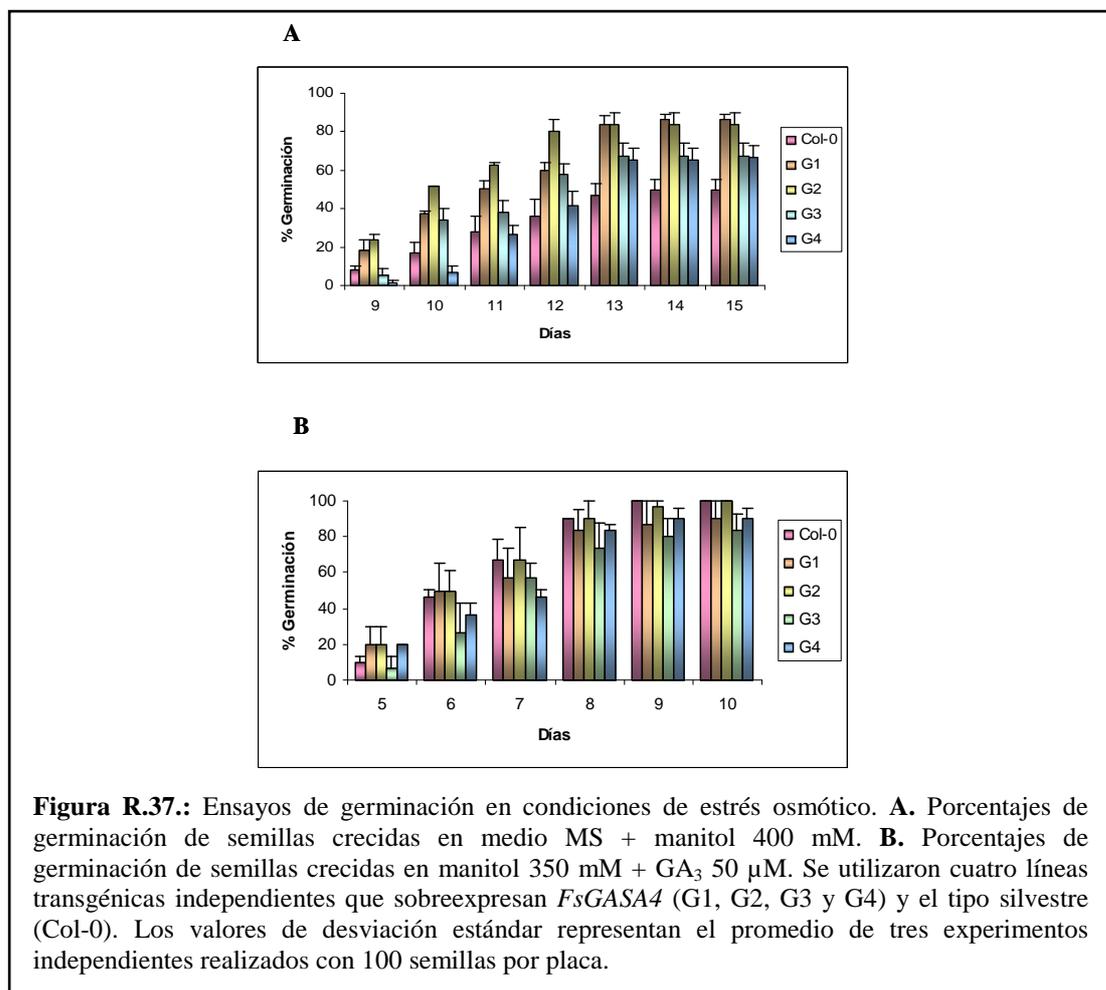
del 80% en el día 5 respecto al 20% que aparecía cuando se crecían en ausencia de GA<sub>3</sub>. También se observa un aumento en la germinación tanto de las líneas transgénicas como del mutante, ya que germinan prácticamente en su totalidad después de 5 días de siembra. En la figura R.37.B se observa como la adición exógena de GA<sub>3</sub> 50 μM a un medio con manitol 350 mM mejora la resistencia de las plantas de las diferentes líneas transgénicas (G1, G2, G3 y G4) y del tipo silvestre (Col-0), produciéndose un adelanto de cuatro días en la germinación y alcanzando porcentajes del 100% al cabo de 9 días.

Estos resultados indican que la aplicación exógena de GA<sub>3</sub> revierte los efectos tanto del estrés salino como del estrés osmótico, y la sobreexpresión de *FsGASA4* mejora la resistencia a los mismos.

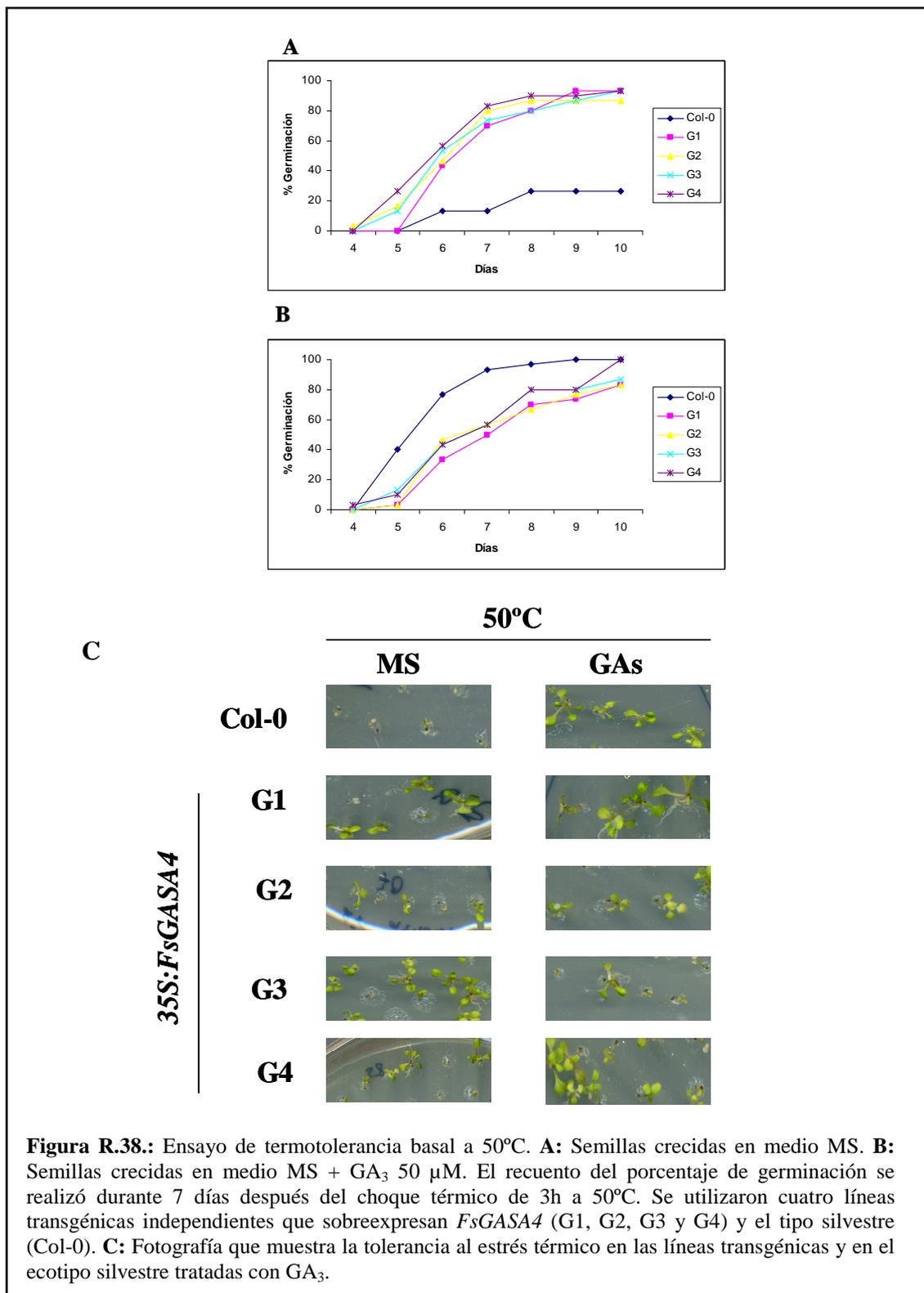


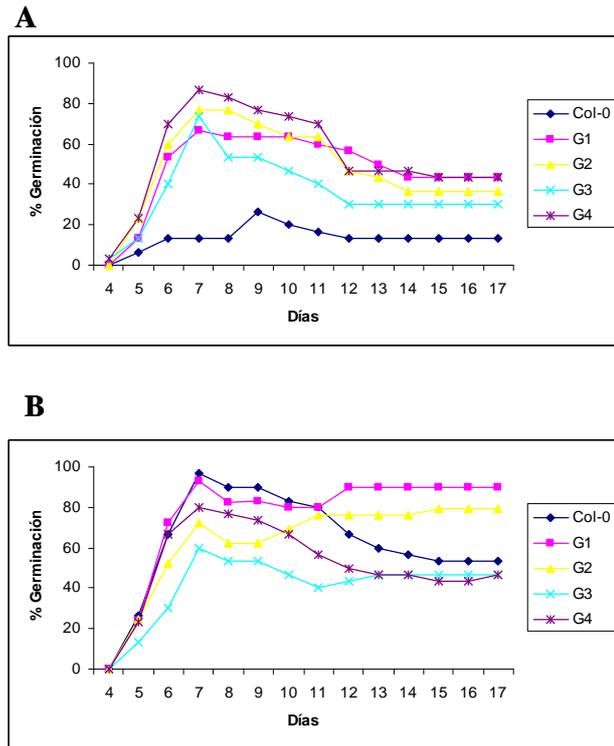
Como demostraron Ko et al., 2007, la expresión constitutiva del gen *GASA4* en *A. thaliana* aumenta la tolerancia de las plantas al estrés térmico, por lo que quisimos comprobar si las semillas que sobreexpresan el gen *FsGASA4* eran capaces de tener una mejor respuesta que el tipo silvestre frente a una situación de estrés térmico, y si la adición de GAs al medio de germinación aumentaba la capacidad de tolerancia térmica en las semillas del tipo silvestre (Col-0). Se siguió el procedimiento descrito en el apartado 7.2.3.10 de Materiales y Técnicas para estudiar la termotolerancia basal y adquirida. Para ello, semillas de las cuatro líneas 35S:*FsGASA4* elegidas para la realización de este trabajo y el tipo silvestre (Col-0) se sembraron en medio MS y en medio MS suplementado con GA<sub>3</sub> 50 μM. Como se observa en la figura R.38.A, las semillas de las plantas que sobreexpresan el gen *FsGASA4* presentan un mayor

grado de termotolerancia basal (% de germinación entre el 80-90%) que el tipo silvestre (Col-0) tras 10 días después del choque térmico, alcanzando este último valores de germinación sólo del 20%.



En el estudio de la termotolerancia basal y adquirida (Figura R.39.A), no se observan grandes diferencias tras el segundo choque de temperatura entre las diferentes líneas, habiendo una considerable disminución en el porcentaje de germinación de todas las plantas. Sin embargo, en la figura R.38.B, se comprueba que la adición de GAs provoca un claro aumento en el porcentaje de germinación de las semillas del tipo silvestre (Col-0), llegando a alcanzar valores del 100% de germinación tras el primer choque de temperatura (termotolerancia basal). En relación a la termotolerancia adquirida (figura R.39.B), también se observa un aumento de la germinación en las semillas del tipo silvestre, llegando a alcanzar valores del 60% en relación al 20% que se obtenía cuando no se trataban con GA<sub>3</sub>, al igual que se produce un ligero aumento en el porcentaje de germinación en las semillas transgénicas.





**Figura R.39.:** Ensayo de termotolerancia basal y adquirida a 50°C. **A:** Semillas crecidas en medio MS. **B:** Semillas crecidas en medio MS + GA<sub>3</sub> 50 µM. El recuento del porcentaje de germinación se realizó durante 4 días después del primer choque térmico (3h, 50°C) y durante 10 días después del segundo choque de temperatura (2.5h, 50°C). Se utilizaron cuatro líneas transgénicas independientes que sobreexpresan *FsGASA4* (G1, G2, G3 y G4) y el tipo silvestre (Col-0).

La última estrategia utilizada para comprobar la tolerancia térmica fue el ensayo de elongación de hipocotilos (apartado 7.2.3.10 de Materiales y Técnicas), donde las líneas que sobreexpresan el transgén *FsGASA4* y el tipo silvestre, se sometieron a diferentes tratamientos térmicos en medio MS y en medio MS suplementado con GA<sub>3</sub> 50 µM, para posteriormente, medir la longitud que alcanza el hipocotilo durante el crecimiento postgerminativo (Hong y Vierling, 2000). En la tabla R.IV se observa cómo en los tres tratamientos térmicos en medio MS, se produce una mayor elongación del hipocotilo en las líneas transgénicas *35S:FsGASA4* que en el tipo silvestre (Col-0). Por su parte, la aplicación exógena de GAs provoca un aumento en la elongación del hipocotilo en todos los casos.

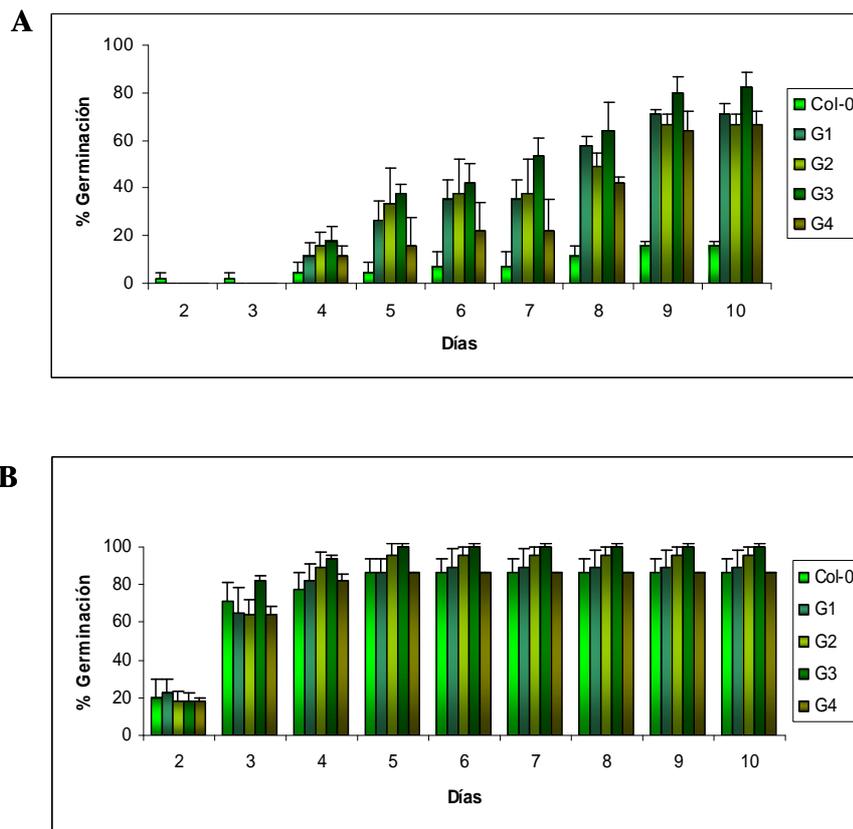
Tratamiento						
Líneas	38°C		38-22-45°C		45°C	
	MS	GAs 50µM	MS	GAs 50µM	MS	GAs 50µM
Col-0	0.022±0.031	0.144±0.041	0.15±0.073	0.308±0.173	0.022±0.031	0.266±0.071*
G1	0.121±0.041	0.399±0.072*	0.433±0.031*	0.488±0.011*	0.288±0.136*	0.37±0.095*
G2	0.299±0.095*	0.344±0.102*	0.441±0.023*	0.541±0.102*	0.299±0.143*	0.388±0.11*
G3	0.199±0.098	0.288±0.16*	0.433±0.104*	0.475±0.113*	0.199±0.054	0.399±0.072*
G4	0.199±0.027	0.249±0.12	0.458±0.077*	0.426±0.133*	0.266±0.054*	0.388±0.083*

**Tabla R.IV.:** Ensayo de elongación del hipocotilo de semillas *35S:FsGASA4*. Las medidas (cm ± SD) se tomaron tres días después de los diferentes tratamientos térmicos. Se usaron tres líneas transgénicas independientes *35S:FsGASA4* (G1, G2, G3 y G4) y el tipo silvestre (Col-0). Las muestras que difieren significativamente de las medidas del ecotipo Col-0 en medio MS según el Test de Fischer (p-value < 0.05) se marcan con un asterisco.

Estos resultados indican que tanto la sobreexpresión de *FsGASA4* como la adición de GAs aumentan la termotolerancia basal y adquirida en la germinación y en la elongación del hipocotilo.

En condiciones de estrés oxidativo debido a la suplementación del medio MS con paraquat (0.5 mM) (Figura R.40.A), se observa un retraso de unos dos días en la germinación de las semillas de las plantas transgénicas *35S:FsGASA4* respecto a las del ecotipo silvestre (Col-0); y a tiempos más largos la germinación en las líneas transgénicas G1, G2, G3 y G4 aumenta de forma considerable respecto al tipo silvestre (Col-0), llegando a alcanzar valores entre el 70-90% al cabo de 10 días, mientras que en el ecotipo Columbia apenas llegan al 20% pasado ese mismo tiempo. Por tanto, la sobreexpresión de *FsGASA4* confiere a las semillas mayor tolerancia frente al estrés oxidativo provocado por el paraquat.

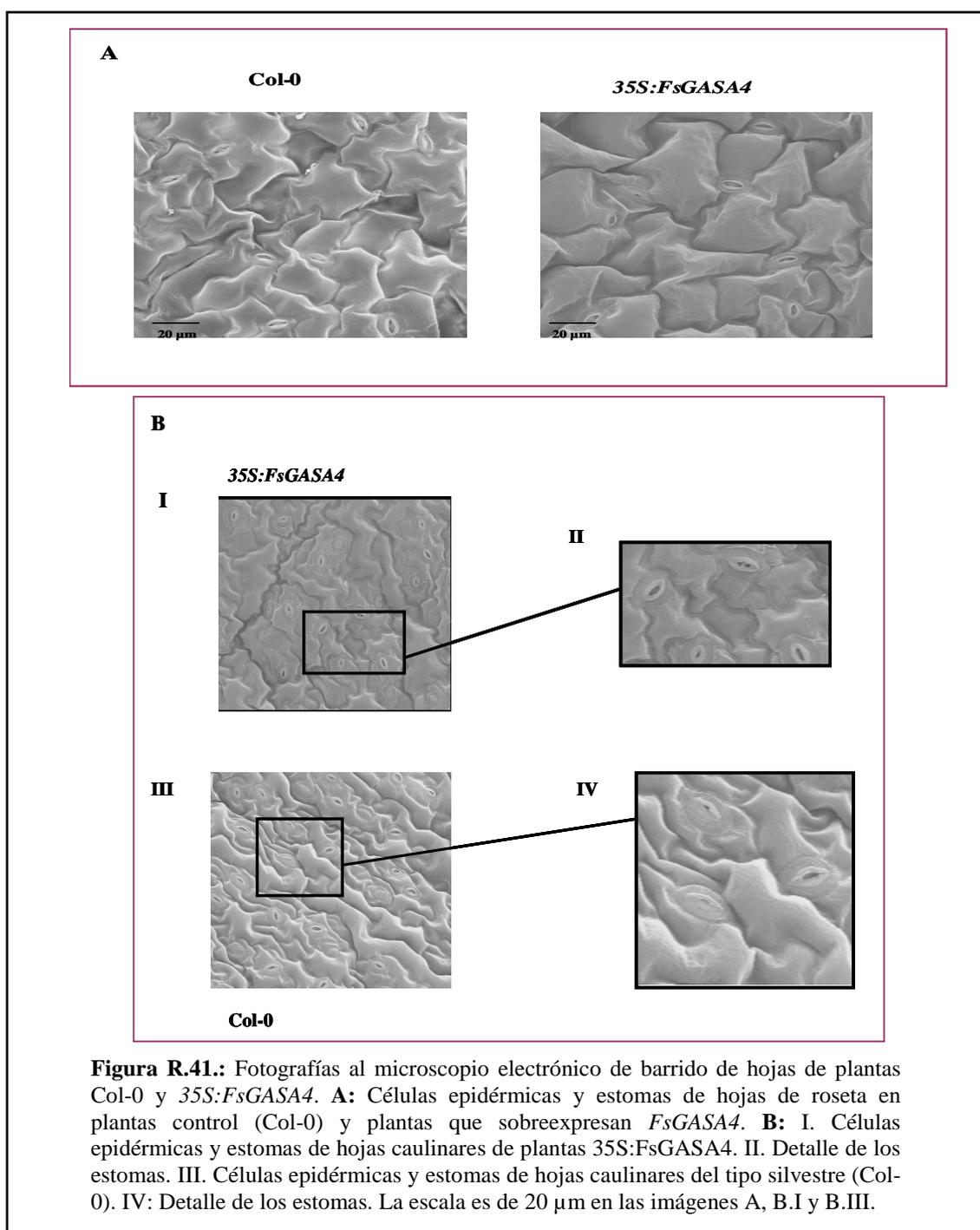
La hipersensibilidad al paraquat de las semillas del tipo silvestre (Col-0) se ve revertida por la adición de GAs. En la figura R.40.B se comprueba que la adición de GA<sub>3</sub> provoca un incremento de los porcentajes de germinación en las semillas del tipo silvestre, así como un leve incremento en las semillas de las líneas transgénicas, y un adelanto en el comienzo de la germinación.



**Figura R.40.:** **A:** Ensayo de germinación en paraquat 0.5 mM. **B:** Efecto de las giberelinas en la sensibilidad al paraquat. Los histogramas muestran los porcentajes de germinación (emergencia radicular) en medio MS en presencia de paraquat 0.5 mM junto con una concentración de GA<sub>3</sub> de 50 μM. El recuento se realizó durante 10 días después de la siembra. Se utilizaron cuatro líneas transgénicas independientes (G1, G2, G3 y G4) y el tipo silvestre (Col-0). Los valores de desviación estándar representan el promedio de tres experimentos independientes realizados con 100 semillas por placa.

### 5.6.- Determinación del tamaño celular y cierre estomático de plantas que sobreexpresan *FsGASA4*.

Para comprobar si la sobreexpresión de *FsGASA4* tenía un efecto en el aumento del tamaño de las células y en la inhibición del cierre estomático, como se ha descrito con la sobreexpresión del gen *GIP2* de *Petunia hybrida* (homólogo del gen *GASA4*) (Wigoda et al., 2006), realizamos preparaciones para el microscopio electrónico de barrido a partir de las hojas y tallos de las plantas que sobreexpresan el transgén *FsGASA4* y del ecotipo silvestre, previa fijación, deshidratación y recubrimiento con un baño de oro (apartado 7.2.3 de Materiales y Técnicas). Al comparar la superficie de las hojas en ambas preparaciones (Figura R.41.A y B), destaca el mayor tamaño de las células epidérmicas que aparecen tanto en las hojas de la roseta como en las caulinares, así como el reducido número de estomas y la mayor apertura de estos, en las plantas que portan la construcción *35S:F<sub>s</sub>GASA4* respecto a lo que se visualizan en las hojas del ecotipo silvestre. Estos datos sugieren que la sobreexpresión del gen *FsGASA4* podría promover la elongación celular, así como aumentar la apertura estomática.



### 5.7.- Análisis de los niveles hormonales en semillas y plántulas que sobreexpresan F<sub>s</sub>GASA4.

Dado que las respuestas a diferentes tipos de estreses están reguladas por fitohormonas, y ante los fenotipos observados en las líneas 35S:F<sub>s</sub>GASA4, procedimos a cuantificar los niveles de ABA, ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA) de las líneas que sobreexpresan F<sub>s</sub>GASA4, del mutante *gasa4-1* y del tipo silvestre (Col-0) (apartado 7.2.3.10 de Materiales y Técnicas), tanto en semillas como en plántulas de 7 días crecidas en medio MS. De esta forma comprobamos que aunque se producían variaciones en los niveles de ABA y ácido jasmónico (JA), los resultados más llamativos se observaban en los niveles de ácido salicílico (SA), siendo más del doble en las semillas transgénicas que en las semillas del tipo silvestre. En plántulas de 7 días crecidas en medio MS, la diferencia en los niveles de SA es menor que en

semillas, aunque siguen siendo superiores en la línea que sobreexpresa FsGASA4 que en el mutante o en el Columbia.

Estos datos sugieren que la mayor resistencia que presentan las semillas que sobreexpresan el transgén *FsGASA4* a los diferentes tipos de estreses abióticos analizados puede ser debida al incremento que presentan en los niveles de SA, ya que existen evidencias de que el SA no sólo desempeña un papel muy importante en las respuestas frente al estrés biótico, sino también frente a diferentes tipos de estreses abióticos (metales tóxicos, estrés térmico, estrés osmótico y salino) (Horváth et al., 2007).

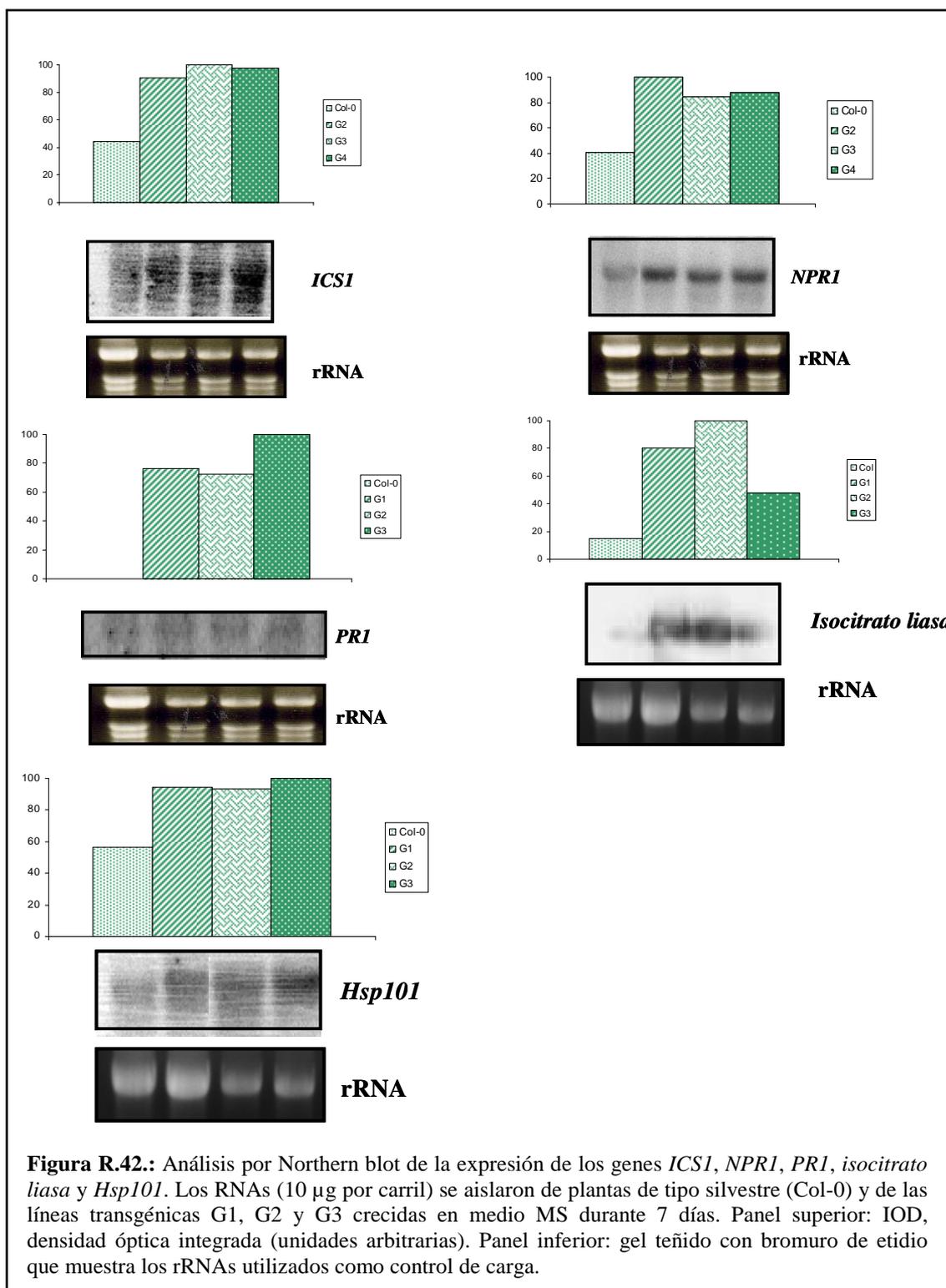
Semillas					
	ng/g peso fresco	Col-0	<i>gasa4-1</i>	G2	G3
	ABA	94.23±0.88	85.83±1.82	135.21±2.08	118.54±1.83
	JA	59.49±3.92	43.92±1.35	48.33±9.14	36.46±2.3
	SA	486.54±16.73	505.33±11.37	1276.04±20.85	1332.29±37.22
Plántulas					
7 días					
	ng/g peso fresco	Col-0	<i>gasa4-1</i>	G2	
	SA	1994.05±67.12	2073.78±29.88	2421.09±41.9	

**Tabla R.V.:** Medidas del contenido de ABA, JA y SA en semillas y plántulas de 7 días crecidas en medio MS. Se utilizaron dos líneas transgénicas independientes *35S:F<sub>s</sub>GASA4* (G2 y G3), el mutante *gasa4-1* y el tipo silvestre (Col-0). Los valores de desviación estándar representan el promedio de tres experimentos independientes.

#### 5.8.- Análisis de la expresión génica en plantas que sobreexpresan FsGASA4.

Para estudiar con mayor profundidad la posible influencia de FsGASA4 con la biosíntesis y el mecanismo de acción del ácido salicílico (SA), así como su papel en la mejora de la germinación en respuesta a estrés, se analizó la expresión de diversos genes implicados en estos procesos y que se detallan a continuación: *ICS1* (implicado en la ruta de biosíntesis del SA), *NPR1* (mecanismo de acción del SA), *PRI* (mecanismo de acción del SA), *isocitrato liasa* (clave en el ciclo del glioxilato y cuya expresión aumenta en presencia de SA en semillas) (Rajjou et al., 2006), y *Hsp101* (implicado en termotolerancia).

Como se puede observar en la figura R.42, los niveles de expresión de todos estos genes aumentan considerablemente en las plantas que sobreexpresan FsGASA4 respecto al ecotipo silvestre Columbia. Estos datos sugieren que la sobreexpresión de FsGASA4 puede estar regulando estos procesos.



### 5.9.- Efecto del ácido salicílico (SA) en las respuestas de la planta a diferentes tipos de estrés abiótico.

Debido a los elevados niveles de ácido salicílico (SA) encontrados en las semillas de las líneas *35S:F<sub>s</sub>GASA4*, quisimos comprobar si la aplicación exógena de SA tenía algún efecto en las respuestas a

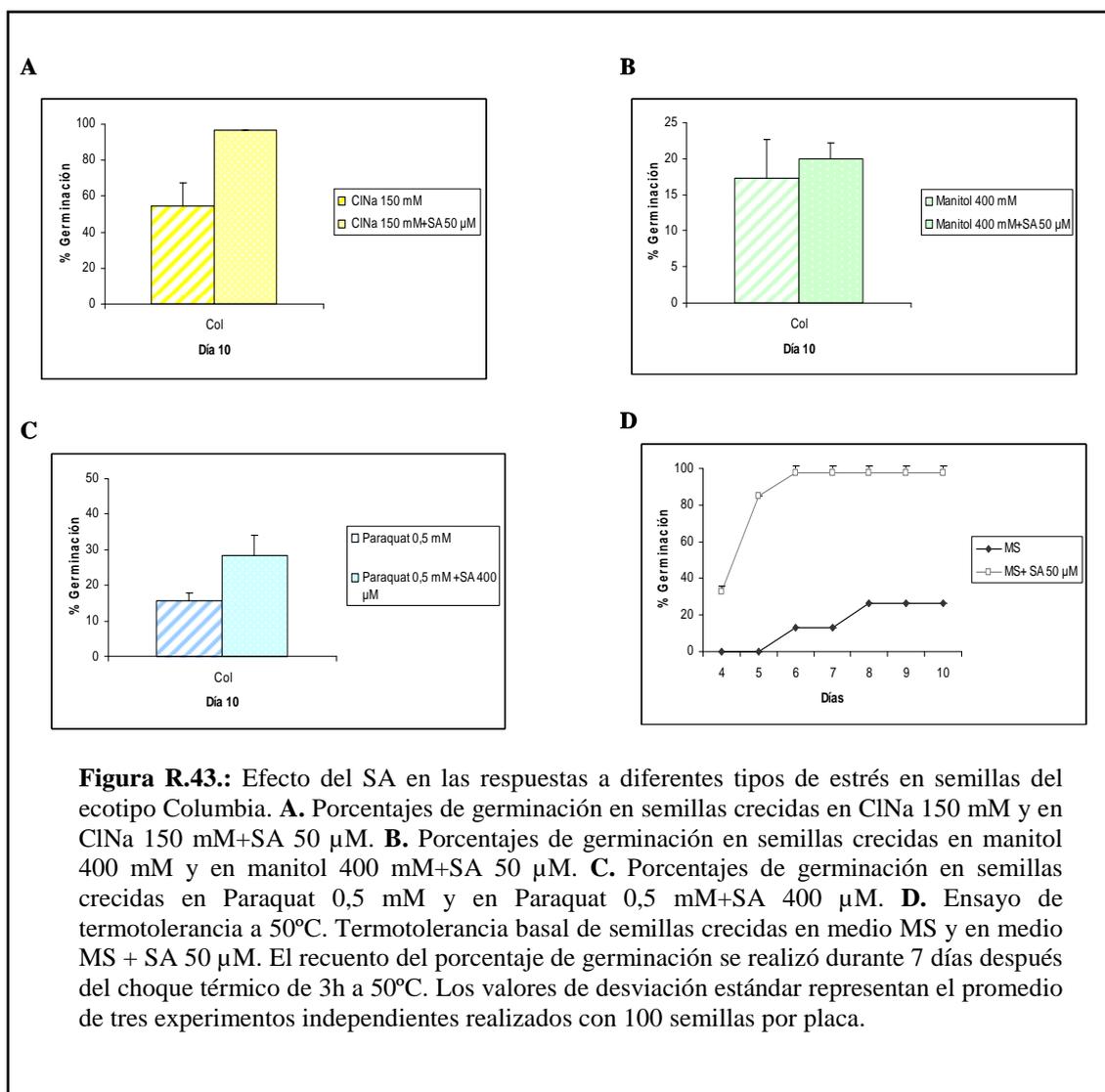
los diferentes tipos de estreses anteriormente estudiados. Está descrito que el SA exógeno a elevadas concentraciones provoca un retraso en la germinación, por lo que quisimos comprobar cual era la concentración de SA más adecuada. Para ello, el primer paso fue la optimización de la concentración de SA para las semillas del tipo silvestre Col-0, realizándose una serie de ensayos de germinación en presencia de distintas concentraciones de SA (50-500  $\mu$ M), y comprobando que la concentración óptima de SA, en la mayoría de los casos, era 50  $\mu$ M.

La adición de SA al medio de germinación nos ha permitido comprobar que esta hormona aumenta la capacidad germinativa de las semillas Col-0 (Figura R.43.A) cuando están sometidas a un estrés salino, alcanzando porcentajes de germinación del 96% al cabo de 10 días.

Respecto al estrés osmótico en presencia de manitol 400 mM, al cabo de 10 días las plantas de tipo silvestre (Col-0) presentaban un porcentaje de germinación del 17%. Tras la aplicación exógena de SA al medio de germinación (Figura R.43.B), no se observó un aumento significativo en la germinación de las semillas del tipo silvestre, lo que sugiere que la aplicación exógena de SA no mejora la capacidad germinativa de las semillas en condiciones de estrés osmótico.

Con respecto al estrés oxidativo, la sensibilidad al paraquat de las semillas del tipo silvestre (Col-0) se ve revertida, al menos parcialmente, por la adición de SA (Fig R.43.C), aunque en este caso la concentración de SA requerida para mejorar la respuesta germinativa era de 400 mM.

Del mismo modo, en las semillas sometidas a estrés térmico, la aplicación exógena de SA provoca un claro aumento en el porcentaje de germinación de las semillas del tipo silvestre (Col-0), llegando a alcanzar valores del 100% de germinación tras el primer choque de temperatura (termotolerancia basal) (Figura R.43.D). Sin embargo, la aplicación exógena de esta hormona no parece tener ningún efecto en la termotolerancia adquirida.

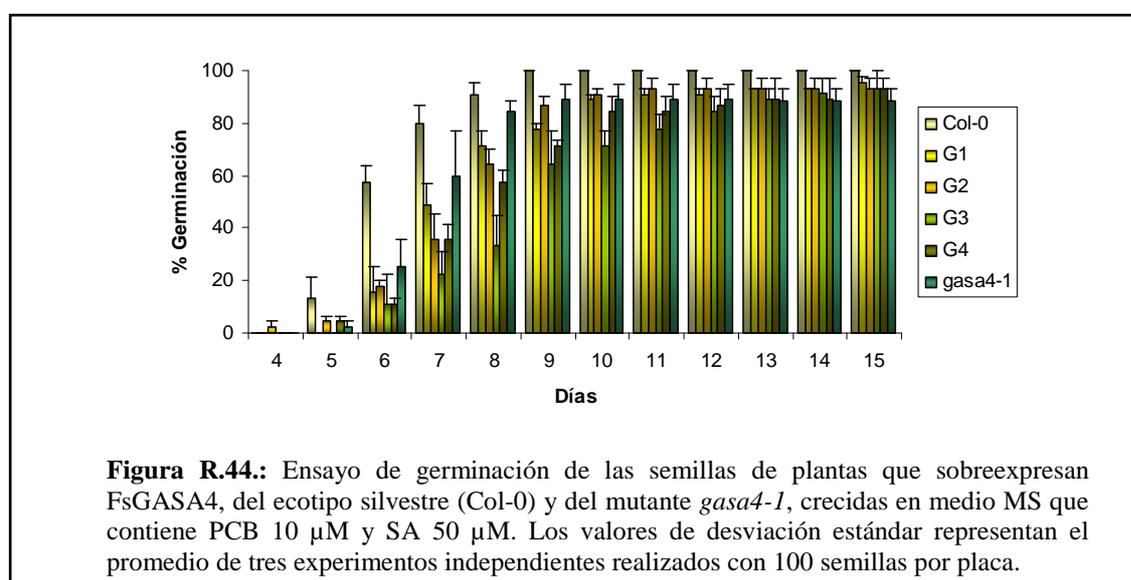


Finalmente, en la tabla R.VI se muestra la longitud del hipocotilo después de someter a las plántulas a diferentes choques de temperatura, tanto las crecidas en medio MS como las crecidas en un medio suplementado con SA 50 $\mu$ M, donde se comprueba cómo, efectivamente, la aplicación exógena de SA aumenta la longitud del hipocotilo.

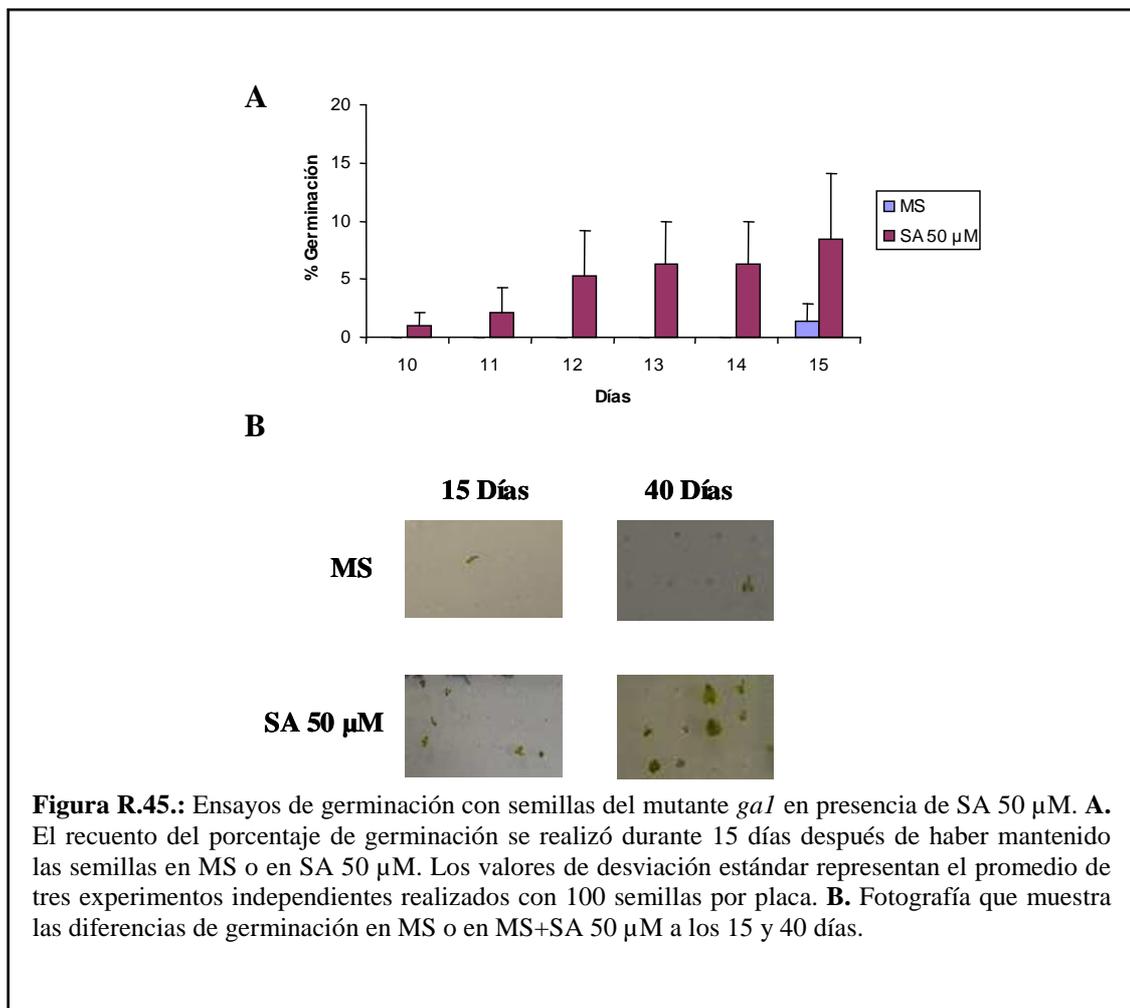
Líneas	Tratamiento					
	38°C		38-22-45°C		45°C	
	MS	SA 50 $\mu$ M	MS	SA 50 $\mu$ M	MS	SA 50 $\mu$ M
Col-0	0.022±0.031	0.677±0.041*	0.15±0.073	0.788±0.095*	0.022±0.031	0.855±0.041*

**Tabla R.VI.:** Efecto del SA en la elongación del hipocotilo de semillas del ecotipo Columbia sometidas a diferentes tratamientos térmicos. Las muestras que difieren significativamente de las medidas del ecotipo Col-0 en medio MS según el Test de Fischer (p-value < 0.05) se marcan con un asterisco.

Otro de los efectos fenotípicos observados tras la sobreexpresión de FsGASA4 descrito en el apartado R.3.8.1, consistía en la menor sensibilidad al PCB, así como la mayor dependencia de GAs. Este hecho podría deberse no sólo a la sobreexpresión de este gen, sino también al aumento de SA en estas semillas. Por ello quisimos comprobar si la adición al medio de SA (50  $\mu$ M) podía mejorar la resistencia al PCB de las semillas de tipo silvestre (Col-0), y también si aumentaba la insensibilidad de nuestras líneas transgénicas a dicha sustancia. Como se observa en la figura R.44, se produce un aumento en el porcentaje de germinación de todas las líneas en un medio suplementado con PCB 10  $\mu$ M + SA 50  $\mu$ M, ya que al cabo de diez días, las semillas del tipo silvestre (Col-0) alcanzan porcentajes del 100% (en el mismo período de tiempo y en presencia sólo de PCB 10  $\mu$ M el porcentaje era del 22%). Así mismo, también aumentan los porcentajes de germinación tanto de las líneas que sobreexpresan FsGASA4 (71-91%) así como las del mutante *gasa4-1* (88%). Por tanto, parece que el SA también confiere una insensibilidad al PCB, pudiendo estar interactuando con la ruta de las GAs.

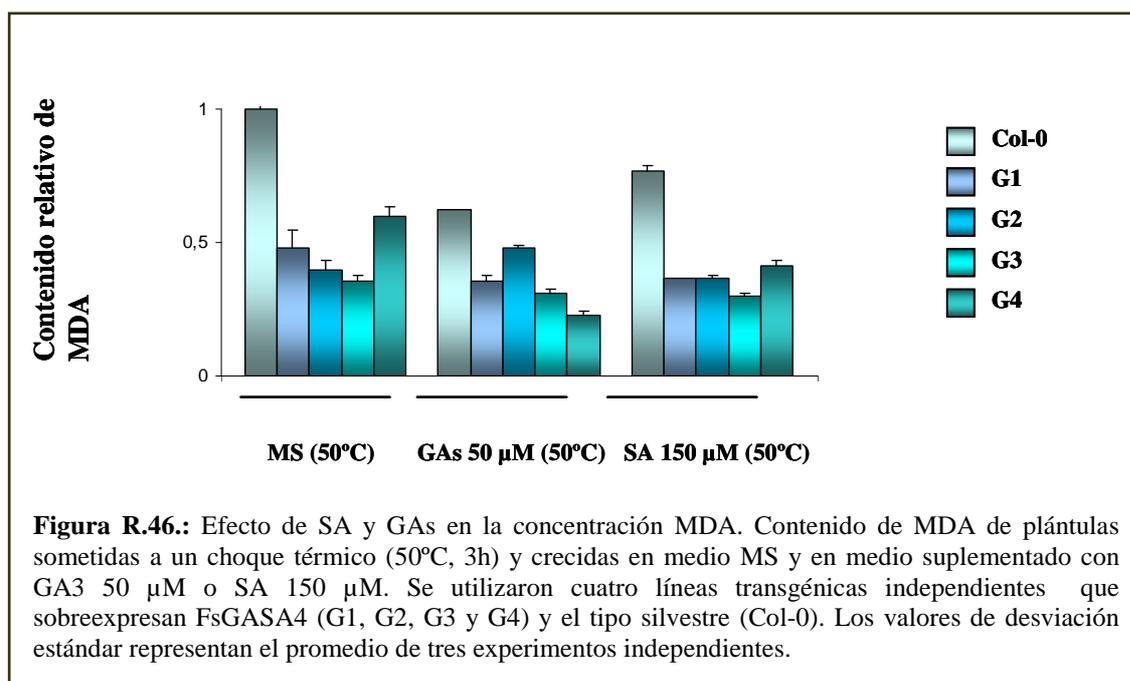


Para corroborar estas hipótesis analizamos las respuestas del mutante *gal* de *Arabidopsis*, deficiente en GAs, en presencia de SA, para ver si esta hormona pudiera tener un efecto positivo en el mecanismo de acción de las GAs. En la figura R.45 se observa que la adición de SA al medio de germinación aumenta la capacidad germinativa de las semillas *gal*, ya que 15 días después de la siembra, se alcanzan porcentajes de germinación del 9% en el medio suplementado con SA 50  $\mu$ M respecto al 1.4% que se alcanza en medio MS, llegando a alcanzar valores del 49% de germinación tras 40 días en el medio que contiene SA respecto a un 3% en medio sin SA.



### 5.10.- Concentración de malondialdehído (MDA) en las plantas transgénicas *35S:F<sub>s</sub>GASA4*.

El malondialdehído (MDA) es una sustancia reactiva del ácido tiobarbitúrico que puede utilizarse como una medida del daño oxidativo. Como se observa en la figura R.46, tras un choque térmico a 50°C durante 3 horas, las plantas de tipo silvestre crecidas en medio MS presentan un mayor contenido de MDA respecto a las plantas que sobreexpresan *F<sub>s</sub>GASA4*, adicionalmente este contenido disminuye en las plantas crecidas en un medio suplementado con GA<sub>3</sub> 50 μM o SA 150 μM. Por tanto, podemos decir que tanto la proteína *F<sub>s</sub>GASA4*, como las GAs y el SA parecen tener un efecto protector en las membranas cuando éstas son sometidas a temperaturas elevadas.



### 5.11.- Relación entre las GAs y la síntesis de SA.

A la vista de los resultados obtenidos, quisimos comprobar si las giberelinas podían desempeñar un papel importante en la síntesis de ácido salicílico, para lo cual determinamos los niveles de SA junto con los de ABA y JA, tanto en semillas del ecotipo Columbia imbibidas o no durante 24 h en GA<sub>3</sub> 100 µM, como en plántulas de 7 días crecidas en medio MS y en medio MS suplementado con GA<sub>3</sub> 100 µM, del mutante *gasa4-1* y del tipo silvestre (Col-0) (apartado 7.2.3.10 de Materiales y Técnicas).

De esta forma comprobamos que, en el caso de las semillas del ecotipo silvestre (Col-0) (Tabla R.VII), los niveles de ABA se ven aumentados tras el tratamiento con GA<sub>3</sub>, probablemente para mantener el balance entre estas dos hormonas, los niveles de JA disminuyen ligeramente, y los de SA aumentan notablemente, con lo que se verifica el efecto positivo que tienen las GAs sobre la síntesis de SA, así como el efecto negativo sobre la del JA, ya que éstas son dos rutas antagónicas. Estos datos son muy similares a los detectados en las semillas de las líneas transgénicas, cuyo contenido en SA es prácticamente el doble al detectado en las semillas del tipo silvestre.

En el caso de plántulas de 7 días, el efecto de la aplicación exógena de GA<sub>3</sub> en el medio provoca un aumento en los niveles de ABA y una disminución en los niveles de JA, así como un incremento en los niveles de SA tras el tratamiento con GA<sub>3</sub> respecto a los controles, y lo mismo sucede cuando las medidas se realizan en el mutante *gasa4-1*. Estos resultados ponen de manifiesto la clara relación existente entre GAs y SA.

Por último, resaltar que las diferencias en los niveles de SA, tanto en el ecotipo silvestre como en el mutante, con o sin aplicación exógena de GA<sub>3</sub>, son estadísticamente significativas según el Test de Fischer.

Semillas				
Col-0				
	Control	+GA <sub>3</sub>		
	ng/ g Peso Fresco	ng/ g Peso Fresco		
<b>ABA</b>	62,58±0,46	102,17±2,99		
<b>JA</b>	27,08±2,07	21,75±1,66		
<b>SA</b>	801,42±12,98	1559,25±10,2		
Plántulas				
7 días				
	Col-0		<i>gasa4-1</i>	
	MS	+GA <sub>3</sub>	MS	+GA <sub>3</sub>
	ng/ g Peso Fresco			
<b>ABA</b>	18,87±0,37	22,01±0,61	13,07±0,18	24,05±0,63
<b>JA</b>	25,56±0,46	6,09±0,6	11,27±0,19	9,85±0,51
<b>SA</b>	2595,27±41,07	2812,45±10,35	2041,59±35,29	2588,65±39,98

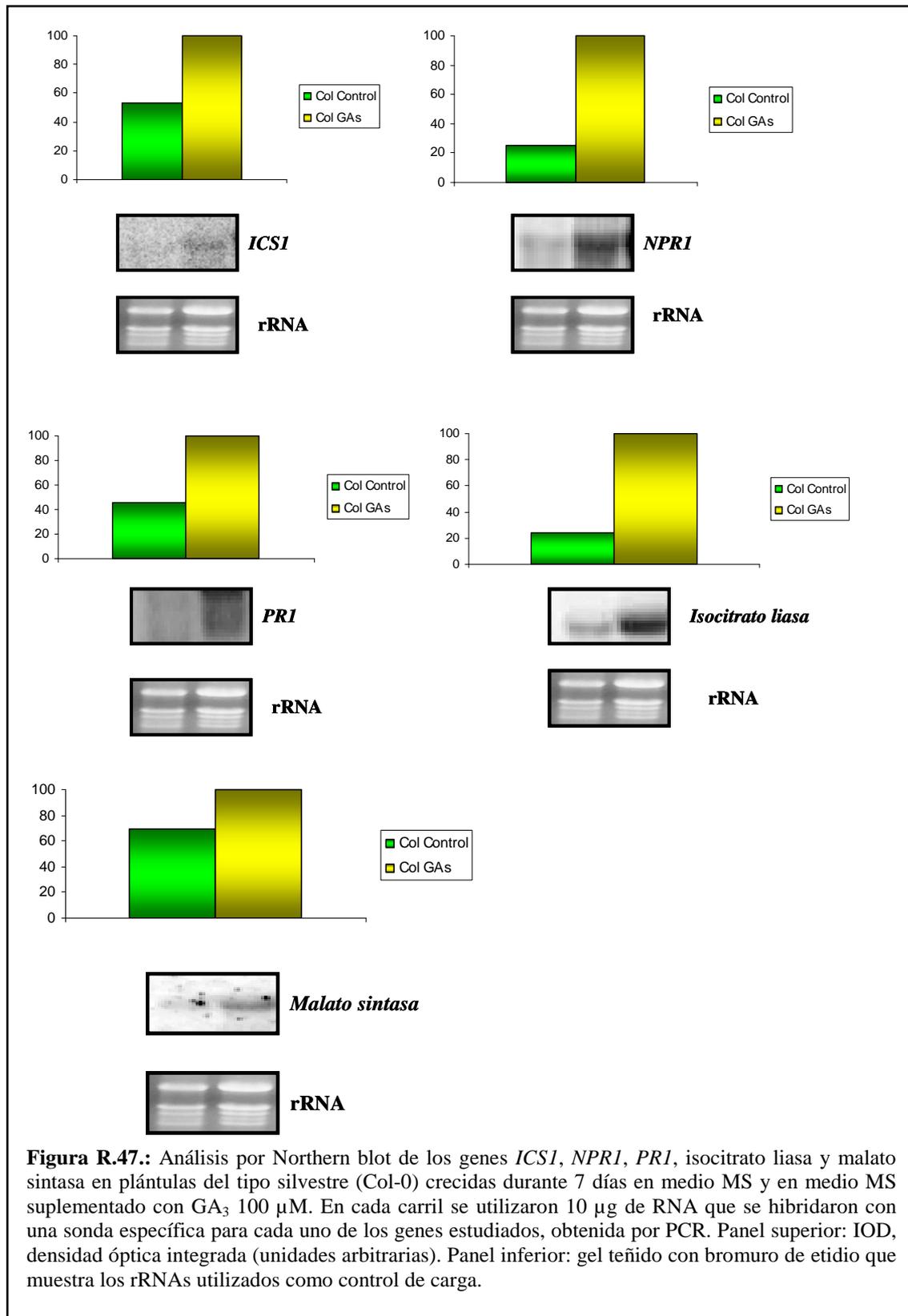
**Tabla R.VII.:** Medidas de ABA, JA y SA en semillas del tipo silvestre (Col-0), semillas tratadas con GA<sub>3</sub> 100 μM, y plántulas de 7 días crecidas en medio MS y en medio MS+GA<sub>3</sub> 100 μM. Se utilizaron el mutante *gasa4-1* y el tipo silvestre (Col-0). Los valores de desviación estándar representan el promedio de tres experimentos independientes.

### 5.12.- Análisis de la expresión de genes de respuesta a ácido salicílico (SA) en plantas del ecotipo Columbia.

Como hemos comprobado en el apartado anterior, los niveles de SA aumentan en semillas y plántulas del tipo silvestre tras un tratamiento con GA<sub>3</sub>. En los últimos años se han descrito numerosos genes cuya expresión se ve incrementada tras un tratamiento con SA (Rajjou et al., 2006). Para profundizar en este efecto a nivel molecular, analizamos la expresión de una serie de genes relacionados con el SA.

En este estudio hemos analizado los siguientes genes: *ICS1* (implicado en la ruta de biosíntesis del SA), *NPRI* y *PRI* (implicados en el mecanismo de acción del SA), *isocitrato liasa* y *malato sintasa* (enzimas claves del ciclo del glioxilato, siendo importantes en la síntesis de carbohidratos y en el almacenamiento de lípidos durante la germinación de la semilla y el desarrollo de la planta).

Como se puede observar en la figura R.47, tras un tratamiento con GA<sub>3</sub> 100 μM durante 7 días se produce un aumento en la expresión de los genes anteriormente mencionados respecto a plantas crecidas en medio MS durante el mismo periodo de tiempo. Estos resultados corroborarían los datos presentados anteriormente, según los cuales las GAs juegan un papel importante en la biosíntesis del SA, de tal manera que la aplicación exógena de GA<sub>3</sub> sería capaz de inducir ciertos genes descritos (Rajjou et al., 2006) que a su vez también son inducidos por SA.



### 5.13.- Identificación de proteínas que interaccionan con FsGASA4.

Para identificar genes cuyos productos interaccionan con FsGASA4, se llevó a cabo el rastreo en dos genotecas de expresión en levadura para ensayos de doble híbrido. La primera fue una genoteca de cDNA de hojas y raíces de *Arabidopsis thaliana* preparada en el vector plasmídico pACT, con los cDNAs insertados en el sitio *XhoI* (tras el dominio de activación). La segunda genoteca utilizada fue de cDNA de semillas de *Fagus sylvatica* tratadas con ABA 100  $\mu$ M, preparada en el vector plasmídico pMyr XR.

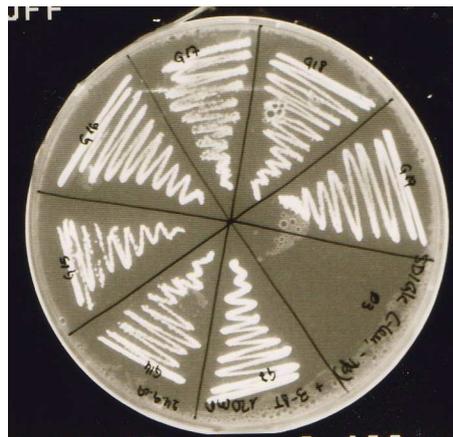
Para obtener los cebos, la secuencia codificante del cDNA de *FsGASA4* se amplificó por PCR con cebadores específicos, y se generaron construcciones híbridas mediante su fusión al dominio de unión a DNA de GAL4, en el plásmido pAS1 para la genoteca de *Arabidopsis*, y en el sitio *BamHI-NotI* del vector pSos para la genoteca de *Fagus*.

A continuación, se transformaron de manera independiente las cepas de levadura Y190 (para el ensayo de doble híbrido en *A. thaliana*) y *cdc25H* (para el ensayo de doble híbrido en *F. sylvatica*) con las construcciones BD-*FsGASA4* y pSos-*FsGASA4* respectivamente. Se comprobó que la construcción BD-*FsGASA4* no activaba la expresión del gen delator *HIS3*, de manera que las células transformadas con esta construcción no eran capaces de crecer en un medio sin histidina (SD/-Trp/-His), si bien fueron necesarias concentraciones de 5 mM del inhibidor 3-AT para controlar el fondo de crecimiento de la cepa Y190. Para la construcción pSos-*FsGASA4* se comprobó que ésta no interaccionaba con la señal de miristilación en ausencia de un patrón de interacción, ya que al cotransformarse la cepa *cdc25H* con pSos-*FsGASA4* y los vectores pMyr o pMyr Lamin C no se producía crecimiento de la cepa a 37°C.

Tras la transformación de *FsGASA4* en la cepa de levadura Y190, ésta se cotransformó con 100  $\mu$ g de DNA de la genoteca. La eficiencia de la transformación se calculó mediante una serie de diluciones que se plaquearon en medio selectivo para los dos plásmidos (SD/-Leu/-Trp). Finalmente, se realizó el ensayo  $\beta$ -galactosidasa a aproximadamente 180 clones para confirmar las interacciones. Los clones positivos se analizaron por PCR y fueron posteriormente secuenciados.

La cepa de levadura *cdc25H* se cotransformó con 40  $\mu$ g de cada plásmido (pSos-*FsGASA4* y pMyr SB). La eficiencia de la transformación se calculó plaqueando 500  $\mu$ l de la transformación en medio selectivo SD/Glucosa (-UL) e incubándola a temperatura ambiente (22-25°C). Del total de clones analizados sólo 164 fueron capaces de crecer en medio selectivo SD/Galactosa (-UL) y a 37°C y, por tanto, se consideraron clones positivos para ser analizados por PCR y posteriormente secuenciados (Fig. R.48).

En el escrutinio del doble híbrido de *Arabidopsis thaliana* (Tabla R.VIII) se encontraron diversos clones que no presentaban homologías con proteínas conocidas. Los encontrados en *Gossypium hirsutum* y *G. raimondii* provenían de una genoteca construída a partir de una amplia variedad de tejidos y órganos sometidos a una serie de condiciones como el estrés por sequía y la interacción con patógenos. Los clones relacionados con ESTs o hipotéticas proteínas de *Vitis vinifera* provienen de una genoteca construída a partir de cDNA de semillas durmientes. La genoteca en la que se encuentran las ESTs de *Beta vulgaris* se construyó a partir de tejidos sometidos a diferentes condiciones de estrés (ClNa, manitol y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), al igual que la genoteca de *Zea mays*, de la que aparecen ESTs y clones genómicos, y que fue construída a partir de tejidos sometidos a estrés salino, osmótico y térmico.



**Figura R.48.:** Ensayo en SD/Galactosa a 37°C de algunos clones inicialmente seleccionados.

En el escrutinio del doble híbrido de *Fagus sylvatica* (Tabla R.IX) , se aisló una proteína fosfatasa de tipo 2A (PP2A) de *A. thaliana*, que provoca un aumento en la sensibilidad al ABA (Luo et al. 2006), lo que podría explicar la mayor sensibilidad al ABA que presentan las semillas de las líneas transgénicas 35S:*FsGASA4*. Además, se encontraron diferentes clones que no presentaban homologías con proteínas conocidas, de las que cabe destacar la EST (BQ145604) de *Medicago trunculata*, que se encuentra en una genoteca de cDNA de semillas que iniciaban la germinación, la EST de *Lycoris longituba* (CN452296), cuya genoteca fue construída con cDNA de yemas florales, y la hipotética proteína de *Populus canadiensis* (CX181746), que se encuentra en una genoteca de cDNA de hojas inoculadas con el patógeno *Marssonnia*.

Doble híbrido en <i>Arabidopsis thaliana</i>		
Nº de clon	Homología	Nº acceso
1	Clon genómico de <i>Gossypium hirsutum</i>	DX530490
2	Clon genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i>	B09043
10	Clon genómico de <i>Gossypium hirsutum</i>	DX536928
11	Clon genómico de <i>Boechera stricta</i>	DU692487
12	Clon genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i>	B10830
16	Clon genómico de <i>Boechera stricta</i>	DU692577
17	EST de <i>Vitis vinifera</i>	EV229378
18	EST de <i>Beta vulgaris</i>	EG551171
19	EST de <i>Vitis vinifera</i>	EV229042
20	Clon genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i>	B20652
22	Clon genómico de <i>Boechera stricta</i>	DU692577
32	EST de <i>Zea mays</i>	EE016202
37	EST de <i>Zea mays</i>	EB405936
81	Clon genómico de <i>Oryza australiensis</i>	CW615088

82	Clon genómico de <i>Gossypium raimondii</i>	CO074651
101	Hipotética proteína de <i>Vitis vinifera</i>	AM443711
113	Clon genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i>	B21805
114	Clon genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i>	B21203
115	Clon genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i>	B20589
116	EST de <i>Vitis vinifera</i>	EV228126
119	EST de <i>Vitis vinifera</i>	EV229115
120	Clon genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i>	AQ249645
121	EST de <i>Vitis vinifera</i>	EV242456
122	Clon genómico de <i>Zea mays</i>	BZ787752
123	Clon genómico de <i>Zea mays</i>	CG396270
124	Clon genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i>	B19902
130	Clon genómico de <i>Oryza coarctata</i>	CZ723759
131	Clon genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i>	B21354
132	EST de <i>Zingiber officinale</i>	DY360147
133	EST de <i>Nicotiana tabacum</i>	BP133370
142	Clon genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i>	B20834
143	EST de <i>Heterocapsa triquetra</i>	DT383330
150	EST de <i>Triticum aestivum</i>	DR734301
151	EST de <i>Hordeum vulgare</i>	BE420548
163	Clon genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i>	B221817
164	Hipotética proteína de <i>Oryza sativa</i>	CT836712
166	EST de <i>Beta vulgaris</i>	EG550404
175	Clon genómico de <i>Sorghum bicolor</i>	EI975442
179	EST de <i>Citrus clementina</i>	DY295686

**Tabla R.VIII.:** Clones confirmados del rastreo de las genotecas de *A. thaliana*.

<b>Doble híbrido en <i>Fagus sylvatica</i></b>		
<b>Nº de clon</b>	<b>Homología</b>	<b>Nº acceso</b>
7	Clon genómico de <i>Gossypium hirsutum</i>	DX561343
23	EST de <i>Medicago trunculata</i>	BQ145604
28	EST de <i>Hordeum vulgare</i>	BF256704
30	EST de <i>Beta vulgaris</i>	EG551200
32	EST de <i>Hordeum vulgare</i>	BF256617
40	GSS de <i>Brassica oleracea</i>	BZ050716
41	EST de <i>Triticum aestivum</i>	BE415690

110	EST de <i>Lycoris longituba</i>	CN452296
120	PP2A de <i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g69960
130	Hipotética proteína de <i>Populus canadiensis</i>	CX181746

**Tabla R.IX.:** Clones confirmados del rastreo de las genotecas de *F. sylvatica*.

*Discusión*

## 1.- DORMICIÓN Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE HAYA BAJO DIFERENTES CONDICIONES HORMONALES.

La dormición de semillas puede definirse como la incapacidad de una semilla viable para germinar aunque las condiciones sean favorables para que este proceso tenga lugar (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Este fenómeno afecta a un gran número de especies vegetales, especialmente especies forestales, y suele ser debida a características intrínsecas de la propia semilla, como las propiedades de la cubierta seminal, la composición y movilización de sustancias de reserva, los niveles hormonales o varios de estos factores actuando conjuntamente (Bewley y Black, 1994).

En muchas semillas la dormición puede ser eliminada por un tratamiento a bajas temperaturas (estratificación), mediante iluminación o bien por la aplicación de distintos factores hormonales o agentes químicos (Krock et al., 2002; Bailly et al., 2004; Flematti et al., 2004; Kucera et al., 2005; Bethke et al., 2006), sin embargo, los efectos de estos tratamientos difieren en las distintas especies, por lo que no parece probable que un único mecanismo o proceso sea el responsable de esta compleja respuesta.

Se han propuesto distintas hipótesis que tratan de explicar la acción de estos tratamientos en la dormición de diferentes especies vegetales (Bewley y Black, 1994). Sin embargo, a pesar de los grandes avances producidos en los últimos años, la dormición es uno de los fenómenos menos conocidos de la biología de semillas (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006), debido a que no es un fenómeno sencillo, sino que es consecuencia de la interacción de numerosos factores. Según la teoría del balance hormonal, parece claro que el paso de dormición a germinación depende de un determinado equilibrio entre hormonas activadoras e inhibidoras del crecimiento (Karssen y Lacka, 1986). Tanto la dormición como la germinación son procesos que están correlacionados con cambios en la expresión de genes, actividad enzimática y acumulación de hormonas, lo que sugiere que están ocurriendo procesos biológicos como la transcripción y traducción en las semillas secas (Cadman et al., 2006; Feurtado y Kermode, 2007). Estos dos procesos están regulados por la interacción de diversas hormonas vegetales, y son muchos los estudios que muestran la implicación del etileno (Kepczynski y Kepczynska, 1997; Beaudoin et al., 2000), las giberelinas (Karssen et al., 1989) o los brasinoesteroides (Steber y McCourt, 2001) en la inducción de la germinación de semillas durmientes, mientras que parece claro que el ABA es el principal factor implicado en la inducción y mantenimiento de la dormición de semillas (Koornneef et al., 2002; Kermode, 2005; Finkelstein et al., 2008).

La dormición está regulada por múltiples factores, tanto genéticos como ambientales, que interaccionan entre sí, lo que dificulta la búsqueda del gen o los genes responsables de la dormición. Por esta razón, la búsqueda de QTLs (Quantitative Trait Locus) parece ser una estrategia adecuada para abordar este tipo de estudios. A través de estudios genéticos se han identificado numerosos genes que codifican proteínas que regulan la dormición (Bentsink et al., 2007), sin embargo algunos de los mutantes en estos genes presentan efectos pleiotrópicos.

Por otro lado, parece que el efecto de estas hormonas en la dormición de semillas depende, entre otros, de procesos de fosforilación y desfosforilación de proteínas a través de la activación e inhibición de proteína quinasas (PKs) y proteína fosfatasas (PPs).

Como punto de partida del trabajo que recoge esta memoria, se comprobaron los efectos de la estratificación o tratamiento a bajas temperaturas (4°C), que había sido descrita previamente como eficaz para la rotura de la dormición en distintas semillas, así como de la aplicación exógena de ácido abscísico (ABA) y ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), en el mantenimiento o eliminación de la dormición de semillas de haya.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la dormición de semillas de *Fagus sylvatica* puede ser eliminada por un tratamiento de imbibición en H<sub>2</sub>O a bajas temperaturas (estratificación) durante un período superior a 6 semanas (Tabla R.1), lo que coincide con los datos observados por Nicolás et al. (1996).

Las semillas de muchas especies requieren un tratamiento frío antes de que sean capaces de germinar. Aunque no están claros cuales son los mecanismos que se activan durante este período a bajas temperaturas, algunos estudios indican que durante la progresiva salida de la dormición provocada por este tratamiento, se produce un aumento en el metabolismo celular y una serie de cambios transcripcionales y traduccionales (Bewley y Black, 1994), al igual que una modificación en los patrones de expresión génica en semillas durmientes (Dyer, 1993). En los últimos años se ha demostrado que la estratificación modifica la expresión de genes específicos en semillas durmientes de *Juglans regia* L. (Einali y Sadeghipour, 2007), *Fagus sylvatica* (Nicolás et al. 1996; 1997; 1998; Lorenzo et al., 2000; Calvo et al., 2003; Mortensen et al., 2004) y otras, cuyos productos génicos podrían estar relacionados con el o los mecanismos responsables de la dormición.

En este trabajo también se ha comprobado que los efectos de las bajas temperaturas en la eliminación de la dormición, son revertidas por la aplicación exógena de ABA (Tabla R.1), como ya observaron Nicolás et al. (1996), lo que sugiere que este factor hormonal pueda estar implicado en los mecanismos responsables del mantenimiento de la dormición de estas semillas.

El ABA es un inhibidor de la germinación, induciendo la dormición durante la maduración del embrión (Finkelstein et al., 2002; Nambara y Marion-Poll, 2003; Kermode, 2005; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Feurtado y Kermode, 2007), relacionándose su acumulación en las semillas con el grado de dormición que presentan (Finkelstein et al., 2008). La dormición se encuentra controlada tanto por el embrión como por el endospermo, donde se sintetizará el ABA necesario para inducir la dormición (Finkelstein et al., 2008). Los niveles de ABA van a variar dependiendo del estado de la semilla, mientras que en semillas durmientes secas estos niveles son muy bajos debido a enzimas del catabolismo del ABA (Okamoto et al., 2006), en semillas durmientes imbibidas la dormición se mantiene por una nueva acumulación de ABA (Le Page-Degivry y Garello, 1992; Grappin et al., 2000; Ali-Rachedi et al., 2004).

Por otra parte, las giberelinas son hormonas vegetales consideradas como promotoras de numerosos procesos de desarrollo en vegetales. Eliminan la dormición y estimulan la germinación en un amplio rango de especies vegetales, ya que inducen enzimas hidrolíticas que participan en procesos degradativos, induciendo la movilización de las reservas acumuladas en la semilla y estimulando la expansión del embrión (Bewley y Black, 1994). Sin embargo, el papel de las giberelinas es controvertido,

ya que, aunque la acumulación de giberelinas está asociado con la salida de la dormición y/o germinación, el tratamiento con esta hormona no provoca la salida de la dormición en todas las especies, pudiendo necesitarse primero un descenso en los niveles de ABA antes de que se produzca un incremento en la sensibilidad y en los niveles de giberelinas (Jacobsen et al., 2002; Ali-Rachedi et al., 2004).

En semillas de haya, se ha demostrado previamente que la adición de ácido giberélico ( $GA_3$ ) afecta de forma importante a la dormición, acelerando los efectos del tratamiento frío y produciendo una eliminación de la dormición más rápida que la propia estratificación (Nicolás et al., 1996).

Los resultados que se presentan en la tabla R.1 confirman estos datos previos en el sentido de que el  $GA_3$  es capaz de acelerar la salida de la dormición de estas semillas, teniendo efectos contrarios a los obtenidos con ABA. Además, los efectos claramente inhibitorios del paclobutrazol (PCB), un inhibidor específico de la síntesis de GAs, y su capacidad para revertir los efectos de las bajas temperaturas en la eliminación de la dormición, apuntan hacia un papel de las GAs endógenas, sintetizadas en respuesta a la estratificación, en los mecanismos que controlan la eliminación de la dormición y la estimulación de la germinación, como ya se ha sugerido en estas y en otras semillas (Nicolás et al. 1997; Kucera, 2005).

## **2.- ANÁLISIS FUNCIONAL DE *FsPTPI* EN LA DORMICIÓN/GERMINACIÓN DE SEMILLAS. PAPEL COMO REGULADOR NEGATIVO EN LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DEL ABA.**

Las proteína tirosinas fosfatasas (PTPs), ejercen un papel importante en diferentes procesos de la vida de las plantas, como la proliferación celular, diferenciación, regulación de las cascadas de señalización mediadas por MAPKs o las respuestas a diferentes tipos de estrés (Wurgler-Murphy et al., 1997). Sin embargo, sólo se han identificado 25 genes para PTPs en el genoma de *Arabidopsis*, de los que la gran mayoría se corresponden con tirosina fosfatasas con actividad dual serina/treonina PP (DsPTP) (Kerk et al., 2008).

Numerosos estudios han puesto de manifiesto que la activación de MAPKs sería el primer paso en las respuestas de las plantas a diversos estímulos, tanto ambientales como hormonales (Tena et al., 2001). Si la fosforilación en restos de tirosina es un requisito imprescindible para su activación, parece lógico pensar que su inactivación dependa de la desfosforilación de estos aminoácidos (Luan, 2003). Este mecanismo de activación/inactivación es fundamental para el correcto funcionamiento de las células. Un funcionamiento constante de estas cascadas de MAPK podría tener consecuencias muy negativas para un organismo, como se ha demostrado en la tumorigénesis de células animales, donde una cascada de MAPK está permanentemente activada (Mansour et al., 1994). Por lo tanto su inactivación es un proceso crítico, poco conocido en plantas, aunque existen evidencias *in vitro*, que han puesto de manifiesto que las MAPK serían una diana adecuada tanto para tirosina PPs como para serina/treonina PPs (Gupta et al., 1998; Meskiene et al., 1998; Huang et al., 2000).

Para abordar el estudio de las PTPs en semillas de haya, se realizó una aproximación por RT-PCR utilizando mRNA de semillas tratadas con ABA, empleando oligonucleótidos degenerados

correspondientes a dominios conservados en este tipo de proteínas, y se obtuvo un fragmento de 550 pb que se utilizó como sonda en una búsqueda diferencial, en una genoteca de cDNA construída a partir de mRNA de semillas de haya, para posteriormente obtener el clon completo, de unas 992 pb, mediante RACE. La proteína deducida a partir de su secuencia consta de 330 aminoácidos.

La comparación de las secuencias tanto de nucleótidos como de aminoácidos, con las bases de datos disponibles (GENEMBL y SWISSPROT) puso de manifiesto la existencia de una elevada similitud (aproximadamente del 70%) con proteínas tirosina fosfatasas descritas en otras especies vegetales (Figura R.2), por lo que se denominó FsPTP1. Esta fosfatasa pertenece al grupo de las PTPs clase I citoplasmáticas, también llamadas solubles o no receptoras (Figura R.5).

Las PTPs de clase I, además de poseer un dominio catalítico altamente conservado, con características estructurales comunes y específicas de estas proteínas, contienen regiones no catalíticas o dominios importantes para la regulación de la actividad enzimática o en la unión de ligandos específicos (Alonso et al., 2004). FsPTP1 posee el sitio activo dentro del dominio catalítico, que se encuentra en la posición 252-262; el residuo de Cys esencial en este dominio se encuentra en la posición 254, y es fundamental para que se produzca el ataque nucleofílico sobre los residuos fosfatos y así formar un tiofosfato intermedio (Xu et al., 1998). En este dominio también se encuentra el motivo WPD (Trp-Pro-Asp) (posición 221-223), que forma un lazo en una conformación única que no se da en otras PTPs; este motivo junto con el sitio activo son imprescindibles para la actividad catalítica tanto de PTPs como de DsPTPs. (Xu et al., 1998). Otro motivo esencial del sitio activo es el denominado KNRY (posición 79-82) (Jia et al., 1995; Andersen et al., 2001), responsable de las interacciones con el anillo aromático de la fosfotirosina en el sustrato (Taberner et al., 2008). Finalmente, existe una región enriquecida en aminoácidos cargados que sólo se encuentra presente en las PTPs específicas de tirosina, y contribuye al acceso específico de fosfotirosina en el sitio activo (Wu et al., 1998).

En el árbol filogenético construído para FsPTP1 (Figura R.5) podemos diferenciar dos grupos. En el primero de ellos, donde se localiza nuestra proteína, se encuentran agrupadas todas las PTP de clase I o posibles PTPs de diferentes especies vegetales. El otro grupo, formado por fosfatasas descritas en *Oryzias latipes* (Q76K57) y *Paralichthys olivaceus* (Q0PJ56), se corresponde con PTPs tipo epsilon (PTP $\epsilon$ ), que son de tipo receptor, muy estudiadas en humanos ya que se encuentran muy relacionadas con procesos cancerígenos. Se generan a partir de un gen (*PTPRE*) que posee dos promotores diferentes dando lugar a cuatro productos proteicos, de los cuales, los mayoritarios son las isoformas de tipo receptor (RPTP $\epsilon$ ) y de tipo no receptor (cyt-PTP $\epsilon$ ). Las diferentes isoformas rara vez se expresan en el mismo tipo de célula, debido a que virtualmente no pueden coincidir los patrones de expresión de sus respectivos promotores. Las cuatro isoformas sólo se diferencian en el extremo N-terminal, lo que da lugar a patrones de localización subcelular únicos para cada una de ellas, así como a sus diferentes funciones biológicas (Granot-Attas y Elson, 2008).

En los últimos años se han identificado varios genes que codifican proteínas tirosina fosfatasas en diferentes especies vegetales y se ha demostrado que las PTPs de clase I participan en la transmisión de señales mediada por ABA (Ghelis et al., 2008). Adicionalmente, en los pocos casos en los que se ha realizado algún estudio, principalmente mediante el análisis en el nivel de expresión de los transcritos correspondientes al gen *AtPTP1* de *Arabidopsis*, se ha puesto de manifiesto que su patrón de expresión

sólo se modifica por la exposición a diferentes tipos de estrés abiótico; mientras que la exposición a elevadas concentraciones de sales lo regula positivamente, su expresión se regula negativamente por la exposición a temperaturas muy bajas (Xu et al., 1998). Esta disminución en los niveles de expresión no se ha observado en otros organismos, lo que sugiere un papel de esta proteína tirosina fosfatasa en respuestas al frío en *Arabidopsis*.

A partir de estos datos, en esta memoria nos hemos dedicado a estudiar la implicación de una PTP de haya en el mecanismo de acción del ABA durante la dormición y germinación de semillas, así como su participación en las respuestas a diferentes tipos de estrés abiótico.

El resultado del análisis del DNA genómico de *Fagus sylvatica*, realizado con el clon FsPTP1, mediante Southern blot, nos indica que aparece como un gen de copia única (Figura R.6), y probablemente no existan más genes de esta clase de PTP en el genoma de haya, al igual que ocurre en el caso de *Arabidopsis thaliana*, donde sólo hay descrito un gen (*AtPTP1*) (Kerk et al., 2008).

Tras la caracterización e identificación de esta proteína tirosina fosfatasa de semillas de *F. sylvatica*, el siguiente paso fue analizar la expresión del transcrito en semillas durmientes y en los tratamientos que mantienen o eliminan la dormición. El análisis por RT-PCR semicuantitativa para determinar los niveles de expresión del clon FsPTP1 (Figura R.7), muestra que tanto en semillas durmientes como en el tratamiento de estratificación a 4°C, estos niveles son bajos. La adición de GA<sub>3</sub>, que provoca una rápida salida de la dormición, no produce ningún efecto en la expresión de este gen, mientras que el tratamiento con paclobutrazol (PCB), inhibidor de la biosíntesis de las GAs y que mantiene a las semillas en dormición, provoca un incremento en los niveles de expresión superiores a los detectados en el control con H<sub>2</sub>O y en semillas durmientes lo que sugiere que las GAs endógenas están inhibiendo la expresión de este gen. Por otra parte, el tratamiento con ABA provoca una clara inducción en la expresión de este gen. Estos resultados indican que la expresión de *FsPTP1* estaría regulada por ABA y posiblemente relacionada con la dormición de semillas de haya.

Para profundizar en el estudio de esta proteína tirosina fosfatasa y realizar un análisis funcional más completo, decidimos sobreexpresar la región codificante de *FsPTP1* en *A. thaliana* (ecotipos Col-0 y Cvi) (Figura R.9).

La elección del ecotipo Cvi se debió a las características que presenta, ya que el grado de dormición de este ecotipo es mucho más profundo que el del ecotipo Columbia, y se le considera un excelente modelo para el estudio de la dormición en semillas de *Arabidopsis*. Se ha comprobado que la dormición del ecotipo Cvi se rompe en condiciones de almacenamiento seco a temperatura ambiente (20°C) y con un 40% de humedad relativa, aunque el método más eficaz es la estratificación fría a 4°C, (Laibach, 1956; Bewley y Black, 1994), produciéndose, en ambos casos, un ligero descenso en los niveles de ABA (Ali-Rachedi et al., 2004); por otra parte, la aplicación de GAs activas (GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub> y GA<sub>4+7</sub>) sólo produce una estimulación tardía en la germinación de las semillas de este ecotipo (Ali-Rachedi et al., 2004), lo que sugiere que en Cvi, las giberelinas no son esenciales para la salida de la dormición..

Hasta la fecha, son muy pocos los análisis funcionales de este tipo de fosfatasas en planta y su relación con la ruta de señalización del ABA y la germinación. De hecho, sólo se ha realizado un estudio

con el mutante endógeno de *Arabidopsis*, *ptp1* (At1g71860) y se ha sobreexpresado una DsPTP1 relacionada con el mecanismo de acción del ABA (Quettier et al., 2006; Henmi et al., 2007; Ghelis et al., 2008). En esta memoria se recoge por primera vez un análisis funcional de una PTP, se correlaciona con la dormición/germinación de semillas y adicionalmente, este análisis se realiza en el ecotipo Cvi, que como ya se ha comentado varias veces en esta memoria, es el que presenta una dormición más profunda en *Arabidopsis*, por lo que los resultados obtenidos se pueden correlacionar claramente con este proceso fisiológico.

Tras la obtención de las plantas transgénicas homocigotas (T3), éstas se caracterizaron molecularmente por PCR (para comprobar la correcta inserción de *FsPTP1* en el genoma de las plantas *35S:F<sub>s</sub>PTP1* (Figura R.10), observándose la banda correspondiente sólo en las líneas transgénicas. Tras analizar la expresión del transgén por Northern blot (Figura R.11) se observó un mayor nivel de expresión en las diferentes líneas transgénicas, no siendo detectable en los correspondientes tipos silvestres, lo que confirma que las líneas que seleccionamos para el estudio eran portadores del gen de haya.

Otra aproximación para el estudio de la función de este gen fue la obtención de mutantes de pérdida de función con una inserción de T-DNA en el exón 1 del gen At1g71860 (apartado 3.1 Resultados) y que se denominaron *ptp1*. Tras la obtención de las líneas homocigotas se demostró, por análisis de PCR (Figura R.8), que los diferentes mutantes *ptp1* son nulos para el gen *PTP1*, ya que la expresión del mensajero queda totalmente suprimida, como era de esperar por la zona en la que se inserta el T-DNA, es decir, en uno de los exones iniciales.

En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio, se demostró que la inhibición de la defosforilación en restos de tirosina tras la adición de PAO (óxido de fenilarsina, inhibidor de las tirosina fosfatasas) provocaba un incremento en la sensibilidad al ABA (Reyes et al., 2006c). Este resultado sugería que las proteínas tirosina fosfatasas, actuarían como reguladores negativos de la ruta de señalización del ABA, por lo que nuestra hipótesis de partida era que *FsPTP1* actuaría como un regulador negativo de esta ruta, y por tanto, su expresión constitutiva en *Arabidopsis* disminuiría la respuesta al ABA, provocando una reducción en la dormición de las semillas.

Las semillas procedentes de las plantas transgénicas portadoras de la construcción *35S:PTP1* de ambos ecotipos (Col-0 y Cvi) presentaban una dormición muy reducida (Figura R.12), ya que eran capaces de alcanzar porcentajes de germinación del 100% sin necesidad de ser sometidas a tratamientos de estratificación, lo contrario que ocurre con sus correspondientes tipos silvestres. En el caso del ecotipo Cvi se ha comprobado que el tratamiento de estratificación es capaz de romper la dormición (Ali-Rachedi et al., 2004), pero aún así, el porcentaje de germinación es muy reducido, lo que nos sugiere un importante papel para *FsPTP1* en la regulación de la dormición de semillas o en los procesos que determinan el paso de dormición a germinación. En el caso de los mutantes con una inserción de T-DNA, el grado de dormición que presentaban era mayor que el de las líneas transgénicas, lo que corrobora el papel de nuestra proteína en los procesos relacionados con la dormición y germinación de semillas.

La germinación de las semillas del ecotipo silvestre Col-0 disminuye a medida que aumentan las concentraciones de ABA en el medio. Los porcentajes de germinación alcanzan el 90% para una

concentración de ABA 1  $\mu\text{M}$ , disminuyendo drásticamente para concentraciones de ABA 2 y 3  $\mu\text{M}$ . En el caso del mutante *ptp1-1*, éste sólo es capaz de germinar cuando la concentración de ABA es de 1  $\mu\text{M}$ , siendo incapaz de germinar a concentraciones más elevadas. Por el contrario, las semillas que sobreexpresan el gen *FsPTP1*, presentan porcentajes de germinación superiores a los observados en el ecotipo Columbia, siendo más evidentes las diferencias a medida que aumenta la concentración de ABA en el medio (Figura R.13.A), lo que indica una disminución en la sensibilidad al ABA. En el caso del ecotipo Cvi, las diferencias entre los porcentajes de germinación de semillas del tipo silvestre y las líneas que sobreexpresan *FsPTP1* son mucho más claras, ya que la germinación de las semillas del tipo silvestre es muy baja para las tres concentraciones de ABA utilizadas (Figura R.13.B), no llegando a superar porcentajes del 35%; mientras que las semillas que sobreexpresan el transgén germinan prácticamente en su totalidad para concentraciones de ABA 3  $\mu\text{M}$ , desarrollando cotiledones verdes y perfectamente desarrollados. La inhibición parcial de la germinación en las semillas de *Arabidopsis* por la adición de ABA exógeno puede ser debida a que se reprimen varias enzimas implicadas en el metabolismo energético, indispensable en semillas imbibidas no durmientes para que tenga lugar la germinación y el desarrollo de la plántula. Entre las enzimas cuyos niveles disminuyen por la aplicación exógena de ABA se encuentran peptidasas, proteasas o hidrolasas como  $\beta$ -glucosidasas o  $\beta$ -galactosidasas (Edwards et al., 1985; Konno y Tsumuki, 1993; Li et al., 2001; Chibani et al., 2006).

Todos estos datos, menor grado de dormición y menor sensibilidad al ABA en las diferentes líneas transgénicas que en los correspondientes tipos silvestres, nos indican que *FsPTP1* actúa como un regulador negativo de la ruta de señalización del ABA. Otras tirosina fosfatasa, aunque en este caso duales, también participan en la regulación del desarrollo de la planta. Por ejemplo, en *A. thaliana* se ha descrito una *DsPTP* denominada *PHS1* que actuaría como regulador negativo de la ruta de señalización del ABA durante la germinación (Quettier et al., 2006), mientras que otra fosfatasa de este tipo, *IBR5* parece regular positivamente algunas de las respuestas mediadas por ABA, si bien parece que esta fosfatasa estaría más relacionada con la señalización de las auxinas (Monroe-Augustus et al., 2003).

La función fisiológica de la proteína *FsPTP1* en los procesos que regulan el comienzo de la germinación se ha comprobado mediante ensayos de germinación en presencia de PCB (inhibidor de la biosíntesis de GAs) (Figura R.14). Las GAs y el ABA tienen efectos antagónicos en la germinación de semillas, por tanto, los mutantes insensibles o deficientes en ABA necesitan menos GAs durante la germinación (Léon-Kloosterziel et al., 1996). En las semillas *35S:PTP1* el requerimiento de GAs es menor que en los tipos silvestres Col-0 y Cvi, lo que nos sugiere que la expresión constitutiva de *FsPTP1* regula positivamente la germinación de semillas a través de un bloqueo en la ruta de señalización del ABA. Estos resultados pueden relacionarse con los obtenidos para otras proteínas fosfatasa (*FsPP2C1* y *HAB1*), cuya sobreexpresión provoca una disminución en el requerimiento de GAs en semillas (González-García et al., 2003; Sáez et al., 2004), además de actuar como reguladores negativos de la señalización de ABA.

Una de las principales funciones del ABA en la planta es dar una respuesta adecuada a las situaciones de estrés ambiental. Cuando una semilla se encuentra en condiciones de estrés hídrico, el ABA impide su germinación (González-Guzmán et al., 2002), como se comprueba en los mutantes

deficientes o insensibles al ABA, que no presentan esta inhibición de la germinación (Werner y Finkelstein, 1995; Léon-Kloosterzel et al., 1996; López-Molina et al., 2001; González-Guzmán et al., 2002). Las diferentes líneas que sobreexpresan *FsPTP1* son capaces de germinar y desarrollar plántulas en medios suplementados con diferentes concentraciones de manitol (300 y 400 mM) (Figura R.15.B), así como en presencia de concentraciones inhibitorias de sal (NaCl 350 mM) (Figura R.15.A), sin embargo, la germinación disminuye drásticamente en el mutante *ptp1-1*, y en menor medida en los ecotipos silvestres. Estos resultados indican que la resistencia inducida por *FsPTP1* no sólo se limita al estrés hídrico, y sugieren una insensibilidad general al estrés osmótico. Además, están de acuerdo con los resultados observados por Xu et al. (1998), donde la expresión de *AtPTP1* se regula positivamente por la exposición a elevados niveles de sales, estando implicado este gen en las respuestas de las plantas frente a diferentes tipos de estrés medioambiental.

Otra de las respuestas mediadas por ABA es la regulación del cierre estomático. En condiciones de carencia de agua, el ABA promueve el cierre estomático reduciendo la pérdida de agua por transpiración, evitando así la desecación de la planta. Para comprobar si *FsPTP1* tiene alguna implicación en la transpiración regulada por ABA, analizamos la pérdida de peso fresco en hojas de roseta cortadas de plantas *35S:F<sub>s</sub>PTP1*, observando una respuesta similar a las de los ecotipos silvestres utilizados, salvo en la línea V3, que presenta un porcentaje menor de pérdida de agua que el tipo silvestre Cvi, hecho que podría deberse al sitio de inserción del transgén (Figura R.16). Este dato nos indica que esta fosfatasa no parece intervenir en la regulación por ABA del cierre estomático y es similar al observado en otras de las tirosina fosfatasas caracterizadas en plantas, en las que tampoco se ha observado ningún papel relevante en el control del mecanismo de apertura y cierre estomático (Monroe-Augustus et al., 2003; Quettier et al., 2006).

El hecho de que tanto *FsPTP1* como *AtPTP1* se encuentren reguladas por estreses abióticos, puede implicar que actúen regulando alguna ruta de MAPKs en plantas, diana adecuada para la acción de estas fosfatasas. En animales, levaduras y plantas, existen diversas MAPKs que se activan bajo diferentes condiciones de estrés, y se inactivan por PTPs (Anderson et al., 1990; Guan, 1994; Rosette y Karin, 1996; Elion, 2000; 2001; Whitmarsh et al., 2001), mediante un bucle de retroalimentación negativa (Sun et al., 1993; Brondello et al., 1997; Jacoby et al., 1997; Wurgler-Murphy et al., 1997), pudiendo, *FsPTP1* actuar de una manera similar a la vista de los resultados presentados en esta memoria.

Las plantas adultas que sobreexpresan *FsPTP1*, presentan unas características fenotípicas muy concretas, que son la prueba más destacable del efecto de esta sobreexpresión en los tejidos vegetativos. Las plantas *35S:F<sub>s</sub>PTP1* presentan tallos y silicuas mucho más finos que el ecotipo Columbia, no existiendo diferencias fenotípicas entre el mutante *ptp1-1* y el tipo silvestre. Las plantas *35S:F<sub>s</sub>PTP1*, en comparación con el ecotipo Cabo verde, presentan mayor número de hojas en la roseta y de mayor tamaño; asimismo las líneas V1 y V2 presentan una mayor longitud del tallo, mientras que no se aprecian diferencias entre la línea V3 y el tipo silvestre (figura R.17.A). Por otra parte, las líneas *35S:F<sub>s</sub>PTP1* de Cvi, cuando son sometidas a diferentes tratamientos de ABA, presentan una acumulación de antocianinas en cotiledones y epicotilo, así como un desarrollo anómalo de la raíz similar al de los mutantes *ctr1* de

triple respuesta a etileno, mientras que el tipo silvestre presenta un desarrollo vegetativo normal (Figura R.17.B).

Las antocianinas son metabolitos secundarios importantes para la fisiología de la planta. Su biosíntesis está regulada por una compleja interacción entre estímulos internos y externos como temperatura, luz, carbohidratos, estrés hídrico y hormonas vegetales (Loreti et al., 2008). Estos estímulos pueden tener efectos positivos o negativos en la acumulación de las antocianinas; mientras que la luz, estrés por bajas temperaturas, adición de azúcares, ácido jasmónico y etileno provocan un incremento en la acumulación de antocianinas (Hara et al., 2003; Cominelli et al., 2008; Lea et al., 2007; Loreti et al., 2008), otras hormonas tienen efectos diversos, tanto positivos como negativos, en su acumulación, como es el caso de las GAs, citoquininas, auxinas y ABA, dependiendo estas diferencias de la especie y órgano utilizado en los estudios (Loreti et al., 2008). En el caso del ABA, se ha observado que es capaz tanto de inducir (Mori et al., 2005) como de inhibir (Han et al., 1996) la acumulación de antocianinas en la misma especie. La acumulación de antocianinas observada en las plantas que sobreexpresan *FsPPT1* transformadas en el ecotipo *Cvi* puede deberse a la acción del ABA, en este caso, como inhibidor de la acumulación de antocianinas, lo que explicaría que en el ecotipo silvestre no se observaran debido al elevado contenido en ABA endógeno que presenta. Una segunda explicación sobre esta acumulación de antocianinas podría ser debida al efecto del etileno, ya que como se ha comentado anteriormente, el fenotipo de las líneas transgénicas obtenidas utilizando como fondo el ecotipo *Cvi*, es muy similar al descrito para los mutantes *ctr1* de respuesta constitutiva al etileno, lo que nos permitiría especular sobre la existencia de interacciones entre el ABA y el etileno mediadas por esta fosfatasa.

Para comprobar si la insensibilidad al ABA observada en los análisis fenotípicos de nuestras líneas transgénicas, conlleva cambios en la expresión de genes específicos, analizamos la expresión del gen de respuesta a ABA *RAB18*, que presenta una fuerte inducción por esta hormona. Esta proteína de respuesta a ABA pertenece al grupo 2 de las proteínas LEA, también llamadas deshidrinas, se encuentra únicamente en plantas tratadas con ABA y se acumula en semillas secas de *Arabidopsis* (Nylander et al., 2001; Ramanjulu y Bartels, 2002; Irar et al., 2006). La acumulación de transcritos del gen *RAB18* se induce por ABA en semillas maduras (Parcy et al., 1994), en tejidos vegetativos (Lang y Palva, 1992) y en células en suspensión (Jeannette et al., 1999), además de por desecación, frío o elevadas concentraciones salinas. En las plantas *35S:F<sub>s</sub>PPT1* (Figura R.18) se observó una fuerte reducción de la inducción de este gen de respuesta a ABA en comparación con los dos ecotipos silvestres (*Col-0* y *Cvi*). Este mismo resultado se ha observado con la proteína *PHS1* de *A. thaliana*, una *DsPPT* que actúa como regulador negativo de la ruta de señalización del ABA, y cuyo mutante *phs1-3*, presenta un fuerte incremento en los niveles de expresión del gen *RAB18* tras ser sometido a un tratamiento con ABA (Quettier et al., 2006). Estos resultados demuestran que la sobreexpresión de *FsPPT1* también ejerce una regulación negativa sobre la expresión de los genes inducidos por ABA.

Para comprender mejor las diferentes rutas de señalización mediadas por MAPKs en plantas, son necesarios análisis genómicos, proteómicos y ensayos de función *in vivo* de los genes involucrados (Lewis et al., 2000). En los últimos años se han aislado y caracterizado multitud de genes de MAPKs, lo que sugiere la gran complejidad de esta cascada de señalización en plantas (Wang et al., 2007), y se ha avanzado en el conocimiento sobre la función de varios de los componentes que forman parte de esta ruta

de señalización mediante la utilización de mutantes de ganancia o pérdida de función. Dada la importancia que tienen estas cascadas de señalización en las respuestas a diferentes tipos de estímulos, uno podría pensar que el proceso de inactivación de estas MAPKs debería estar tan finamente regulado como su activación (Tena et al., 2001). Sin embargo, este proceso es muy poco conocido en plantas, aunque existen evidencias, *in vitro*, que han puesto de manifiesto que las MAPKs serían una diana adecuada tanto para tirosina como serina/treonina proteína fosfatasas (Gupta et al., 1998; Meskiene et al., 1998; Huang et al., 2000).

Una de estas cascadas de MAPKs está implicada en la ruta de transducción de señales del ABA (Lu et al., 2002) y se ha demostrado la implicación tanto de PTPs como DsPTPs en su regulación (Fordham-Skelton et al., 2002; Monroe-Augustus et al., 2003; Quettier et al., 2006; Ghelis et al., 2008). Adicionalmente, un estudio realizado en nuestro laboratorio puso de manifiesto, *in vivo*, que la defosforilación en restos de tirosina era fundamental en el control del crecimiento postgerminativo mediado por ABA (Reyes et al., 2006c). En este estudio se demostró que un inhibidor de las proteínas tirosina fosfatasas (PAO, óxido de fenilarsina) provocaba un retraso en la germinación de las semillas debido a un incremento en la sensibilidad al ABA, efecto que estaba acompañado de un incremento en la expresión del gen de respuesta a ABA *RAB18*, lo que indicaba que la sensibilidad que presentaban las semillas de *Arabidopsis* al ABA era debido a la inhibición de PTPs durante la germinación, y que este tipo de enzimas actuarían como reguladores negativos en la cascada de señalización de las MAPKs, dato que se ha confirmado con los resultados presentados en esta memoria. No obstante, a pesar de que el papel que desempeñan las PTPs en la señalización del ABA está bien establecido, los mecanismos que controlan estas rutas son aún desconocidos.

Finalmente, como resumen de los resultados obtenidos a partir del análisis funcional de la proteína tirosina fosfatasa FsPTP1 de haya, podemos concluir que esta proteína actúa como un regulador negativo en la ruta de transducción de la señal del ABA durante la transición de dormición a germinación de semillas, así como en las respuestas a estrés abiótico.

### **3.- EL ANÁLISIS FUNCIONAL DE *FsGASA4* SUGIERE UNA INTERACCIÓN ENTRE EL MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS GAs Y LA SÍNTESIS DE SA.**

Las plantas, para responder a los estímulos ambientales y endógenos, deben integrar las señales que reciben a través de una compleja red de rutas de transducción que darán lugar a una respuesta correcta y conllevarán el desarrollo de la planta. En los últimos años se ha avanzado en el conocimiento de las cascadas de señalización debido a la identificación de diversos componentes implicados en estas rutas de transducción de señales, a través del uso tanto de mutantes de *Arabidopsis* afectados en la biosíntesis o señalización hormonal como de plantas transgénicas. Estos avances nos muestran la compleja interrelación entre las diferentes rutas de transducción de señales hormonales, actuando tanto a nivel de biosíntesis como de acción hormonal (Weiss y Ori, 2007). Hay muchos ejemplos de estas interacciones, aunque no existían evidencias de interrelación entre giberelinas y ácido salicílico, hasta un estudio muy reciente en el que se indicaba que los niveles de SA eran prácticamente el doble en plántulas

del cuádruple mutante DELLA infectadas con un patógeno biotrofo respecto a su correspondiente ecotipo silvestre, indicando que las proteínas DELLA eran capaces de reprimir la biosíntesis de SA y modular las respuestas defensivas de las plantas controlando el balance SA/JA (Navarro et al., 2008).

En esta memoria, presentamos evidencias de que una respuesta constitutiva a giberelinas, así como la sobreexpresión del gen *FsGASA4* de haya en *Arabidopsis*, van a regular las respuestas de las plantas en situación de estrés abiótico mediante el control de la síntesis de ácido salicílico.

Los miembros de la familia génica GASA (Gibberellic Acid Stimulated in Arabidopsis) forman parte de un grupo de genes específicos de plantas, se encuentran en un amplio rango de especies vegetales, entre las que se incluyen tomate, arroz, petunia, gerbera o *Arabidopsis*, y se cree que pueden participar en las respuestas frente a patógenos y en varios aspectos del desarrollo vegetal (Roxrud et al., 2007). El primer miembro de esta familia que se identificó, caracterizó y se relacionó con GAs fue el gen *GAST1* de tomate (Shi et al., 1992). En *Petunia hybrida* se han identificado cuatro genes homólogos de GASA (*GIP1*, *GIP2*, *GIP4* y *GIP5*), que parecen intervenir en procesos de desarrollo, ya que promueven la elongación del tallo y la transición a la floración (Ben-Nissan y Weiss, 1996; Ben-Nissan et al., 2004). En *Gerbera hybrida*, el gen homólogo *GEG* se expresa en corolas y carpelos, coincidiendo con el cese de la expansión celular longitudinal, lo que sugiere que puede ser un inhibidor de la elongación celular (Kotilainen et al., 1999). En *Arabidopsis*, la familia génica GASA está formada por 14 miembros, donde los genes *GASA1-GASA4* fueron los que se identificaron primero debido a su similitud con el gen *GAST1* de tomate (Herzog et al., 1995). Se ha comprobado que el gen *GASA1* se expresa en primordios florales y en silicuas inmaduras, los genes *GASA2* y *GASA3* en silicuas y en semillas secas y el gen *GASA4* en todas las regiones meristemáticas (brotes, primordios florales, raíces primarias y laterales) y estimula el tamaño y peso de las semillas (Aubert et al., 1998; Roxrud et al., 2007). Mediante análisis de los promotores de los genes *GASA1*, 3, 4, 8, 10 y 14, parece que estos se activan en el tejido radical y vascular, meristemas, flores y semillas, aunque con un patrón espacial y temporal diferente. Sin embargo, los genes *GASA5*, 6, 7, 9, 11, 12 y 13 no tienen aún una función asignada (Aubert et al., 1998; Berrocal-Lobo et al., 2002).

Todos estos datos obtenidos en diferentes estudios, indican que varios miembros de la familia génica GASA ejercen una función estructural y reguladora en la planta (Roxrud et al., 2007).

El clon de cDNA *FsGASA4*, objeto de estudio de esta memoria, se aisló y caracterizó mediante una búsqueda diferencial en una genoteca de cDNA construida a partir de mRNA de semillas de haya. La proteína deducida a partir de su secuencia consta de 107 aminoácidos y presenta una elevada similitud con otros miembros de la familia GASA descritos en plantas, concretamente con un gen GASA de tipo 4 de *Arabidopsis*.

Lo único que se conocía acerca de este tipo de proteínas en el momento en el que comenzó el trabajo que se recoge en esta memoria, era la presencia en todas ellas de una serie de características estructurales comunes: una región hidrofóbica de 21-27 aminoácidos en el extremo N-terminal, una región intermedia muy divergente tanto en la composición de aminoácidos (ya que puede ser hidrofóbica o hidrofílica) como en la longitud de la misma, que varía entre 3-190 aminoácidos, y un dominio C-terminal de 60 aminoácidos muy conservado que contiene 12 residuos de Cys (Herzog et al., 1995), además de conservar varios residuos de Pro y Gly (Roxrud et al., 2007).

En el caso concreto del clon que nos ocupa, tras el análisis de su composición a partir de la secuencia nucleotídica y por el estudio del perfil de hidrofobicidad según el algoritmo de Kyte y Doolittle, se pone de manifiesto su carácter eminentemente hidrofóbico, principalmente en la región N-terminal, donde además se encuentra una región que codifica una posible secuencia señal que haría que esta proteína, probablemente, se excretase al espacio extracelular. Un estudio mediante la base de datos PROSITE reveló la presencia de un dominio rico en Cys, muy conservado entre los miembros de esta familia, lo que indica un mecanismo de acción parecido. La distribución de los residuos de Cys sugiere la formación de una estructura proteica globular específica, por la formación de 6 puentes disulfuro entre estos residuos. Además del dominio rico en Cys, se encontró un sitio de N-glucosilación, tres dianas de fosforilación, un sitio de N-miristilación y una diana dependiente de AMPc. Estas características, junto con la variación en el dominio intermedio, podría dar lugar a diferencias en la función de las diferentes proteínas GASA en el medio extracelular (Roxrud et al., 2007).

En los promotores de algunos miembros de la familia GASA de *A. thaliana* se han encontrado elementos de respuesta a GAs (GARE), una caja de pirimidina y elementos TATCCAY. Además, contienen múltiples elementos para dirigir la expresión específica tanto en semillas como en raíces.

El resultado del análisis del DNA genómico de *Fagus sylvatica*, realizado con este clon, mediante Southern blot, nos indica que aparece como un gen de copia única (Figura R.24), aunque no se descarta que en el genoma de haya existan otros genes que codifiquen otros miembros de esta familia, como se ha observado en el genoma de *Arabidopsis* o de *Petunia hybrida* (Ben-Nissan y Weiss, 1996; Ben-Nissan et al., 2004; Roxrud et al., 2007).

La expresión del gen *FsGASA4* está fuertemente inducida en semillas de haya estratificadas a 4°C en H<sub>2</sub>O, y sobre todo en semillas tratadas con GA<sub>3</sub>, tratamientos que provocan la salida de la dormición de las semillas de haya permitiendo su germinación (Nicolás et al., 1996), mientras que los niveles de expresión en semillas tratadas con ABA, tratamiento que mantiene las semillas en dormición, son inferiores a los observados en el control en H<sub>2</sub>O, siendo prácticamente indetectables en semillas durmientes (Figura R.25). Este patrón de expresión en el que los niveles de *FsGASA4* disminuyen cuando la dormición de la semilla es profunda y aumentan a medida que la dormición va desapareciendo, parecen indicar una posible relación de este gen con el proceso de salida de la dormición de las semillas de haya. Estos datos coinciden con los observados en el gen *GEG* de *Gerbera hybrida*, ya que los niveles de sus transcritos aumentan tras la aplicación de GAs (Ben-Nissan et al., 2004). Sin embargo, en *A. thaliana*, a pesar de que la expresión del gen *GASA4* se induce al final del proceso de germinación, se ha comprobado que la abundancia del mRNA correspondiente no se ve afectada tras la aplicación de GAs, indicando que este gen no necesitaría de esta hormona para expresarse; no obstante, se ha observado que este gen estaría regulado muy activamente por GAs en células en división, proceso que coincide con el inicio de la germinación, ya que se van a producir una serie de cambios que acabarán con la transformación del embrión en plántula. Lo mismo ocurre con el aumento de expresión de los transcritos correspondientes a *FsGASA4* durante la transición de dormición a germinación, ya que la rehidratación de la semilla provoca una activación de la maquinaria metabólica de la semilla, encaminada a la transformación del embrión en una plántula adulta.

Para saber más acerca del posible papel del gen *GASA4* y su implicación en la ruta de señalización de las GAs, decidimos realizar un estudio funcional de este gen de haya mediante su sobreexpresión en *A. thaliana* ecotipo Col-0 (Figura R.28), debido a la imposibilidad, al menos por el momento, de realizar estos estudios de sobreexpresión directamente en haya. Tras la obtención de plantas transgénicas homocigotas (T3), éstas se caracterizaron molecularmente por PCR (para comprobar la correcta inserción de la construcción) (Figura R.29), observándose la banda correspondiente no sólo en las líneas transgénicas, sino también en el ecotipo silvestre Col-0, lo que hace pensar que se trata del gen endógeno *GASA4* de *A. thaliana*, ya que los niveles de homología entre ambas son muy elevados. Sin embargo, tras el análisis por Southern blot (Figura R.30) se comprobó, mediante el uso de una sonda específica del gen que además contenía el gen de resistencia a Kan, que en el genoma de las plantas transgénicas aparecía una única inserción de este transgén, mientras que no se detectaba en el ecotipo silvestre. Mediante Northern blot (Figura R.31) se detectaron elevados niveles de expresión de dicho transgén en las diferentes líneas transgénicas, no siendo detectable en el tipo silvestre, lo que confirma que las líneas seleccionadas para el estudio eran portadores del gen *FsGASA4* de haya.

Otra aproximación para el estudio de la función de este gen fue la utilización de mutantes de pérdida de función con una inserción de T-DNA en el exón 1 del gen At5g15230 (apartado 5.1 Resultados) y que se denominaron *gasa4-1*. Tras la obtención de las líneas homocigotas, se demostró por análisis de PCR (Figura R.26) que los diferentes mutantes *gasa4* son nulos, ya que la expresión del mensajero queda totalmente suprimida, como era de esperar por la zona en la que se inserta el T-DNA, es decir, en uno de los exones iniciales.

A pesar de la poca información, que se tiene sobre esta gran familia génica (GASA) a la que pertenece *FsGASA4*, principalmente en semillas, los datos que teníamos acerca de la expresión de este gen en semillas de haya (inducida por GAs), nos hacía pensar que podía estar relacionado con el control de la transición de dormición a germinación. Sin embargo, las semillas procedentes de las plantas transgénicas portadoras de la construcción *35S:GASA4*, al igual que el mutante de pérdida de función, presentan un grado de dormición similar al tipo silvestre tras los diferentes tratamientos de estratificación (Fig. R.34). El hecho de que no se aprecien diferencias en el mutante *gasa4-1* respecto a las líneas transgénicas ni al ecotipo silvestre, puede ser debido al solapamiento de función de otros miembros de la familia GASA de *Arabidopsis*, ya que muchos de ellos presentan funciones redundantes, o bien a que realmente este gen no tiene ninguna función en el proceso de salida de la dormición.

Es bien conocido que las GAs son necesarias para la germinación de semillas, y que el paclobutrazol (PCB), al ser un inhibidor de la síntesis de GAs, ejerce un efecto negativo en este proceso. Esto nos valió como punto de partida para determinar si tanto las semillas de las líneas que sobreexpresan el gen *FsGASA4*, como los mutantes con una inserción de T-DNA (*gasa4-1*), tras ser sometidas a un tratamiento con PCB presentaban un comportamiento diferente al del tipo silvestre. En el caso de los mutantes *gasa4* se observó que el PCB disminuía la germinación respecto al ecotipo silvestre (Col-0) (Figura R.27), lo que parece indicarnos que la mutación en este gen confiere una mayor sensibilidad al PCB, y que podríamos relacionarlo con la regulación de este gen por parte de las GAs durante la germinación. Por su parte, las líneas transgénicas *35S:GASA4* presentan una mayor resistencia al PCB (Figura R.32), además de tener menor dependencia de GAs para el crecimiento que el tipo silvestre

(Figura R.33), ya que tras 60 días en un medio suplementado con PCB son capaces de sobrevivir, llegando a formar flores y desarrollar silicuas. Estos datos están apoyados por un estudio realizado con los denominados mutantes *goe* (*GASA* over-expressed), obtenidos por la fusión de los genes marcadores *luciferasa* (*LUC*) y  $\beta$ -*glucuronidasa* (*GUS*) que se encuentran bajo el control del promotor *GASAI* de respuesta a GAs. (Raventos et al., 2000). Estos mutantes presentan fenotipos similares a los de nuestras líneas transgénicas, ya que tienen una mayor resistencia al PCB y son capaces de sobrevivir tras un largo período de tiempo sometidos a este tratamiento, ya que presentan un menor requerimiento de GAs. Estos datos indican que los genes de la familia *GASA*, no sólo están inducidos por GAs, sino que también estarían implicados en el mecanismo de acción de las mismas.

Ya que los genes *GASA* presentan una fuerte inducción por GAs, resulta lógico pensar que el ABA debe ejercer un efecto antagónico en su expresión, pudiendo llegar a reprimirla. Las semillas procedentes de las plantas transgénicas que sobreexpresan *FsGASA4* presentan unos porcentajes de germinación muy inferiores a los observados en el ecotipo silvestre (*Col-0*) cuando las semillas se siembran en concentraciones de ABA 1  $\mu$ M (Figura R.35), lo que indica que estas semillas presentan una mayor sensibilidad al ABA.

En los últimos años se han identificado y caracterizado numerosos genes tipo *GASA* en diferentes especies vegetales, y aunque se les han asignado diferentes funciones, como su implicación en el desarrollo vegetal, incluyendo la respuesta a estreses abióticos, aún no está claro su mecanismo de acción. En el trabajo presentado en esta memoria se muestran evidencias de que la sobreexpresión del gen *FsGASA4* en plantas de *Arabidopsis* confiere resistencia a distintos tipos de estrés abiótico durante la germinación de las semillas.

Tanto en el caso de estrés salino (NaCl 150 mM) (Figura R.36.A) como de estrés osmótico (manitol 400 mM) (Figura R.37.A), las líneas transgénicas *35S:F<sub>s</sub>GASA4* presentan porcentajes de germinación cercanos al 100%, en comparación con el tipo silvestre y con el mutante *gasa4-1* que sólo alcanzan valores del 50%; el hecho de que el mutante tenga unos valores similares al ecotipo silvestre puede explicarse por la redundancia de función con otros miembros de esta familia génica.

Existen evidencias de que la expresión constitutiva del gen *AtGASA4* en *A. thaliana* confiere tolerancia al estrés térmico (Ko et al., 2007). En nuestro caso, las semillas que sobreexpresan el transgén *FsGASA4* presentan un mayor grado de termotolerancia basal (Figura R.38.A) que las del tipo silvestre, sin embargo, no se aprecian diferencias en lo referente a la termotolerancia adquirida (figura R.39.A). Por tanto, parece que el gen *GASA4* sólo es capaz de promover la termotolerancia basal, no siendo necesario para la termotolerancia adquirida. En una segunda aproximación para el estudio de la termotolerancia de estas semillas, medimos la longitud del hipocotilo durante el crecimiento postgerminativo tras diferentes choques de temperatura (Tabla R.IV). Las semillas de las líneas transgénicas presentan un mayor crecimiento del hipocotilo que el tipo silvestre en todos los tratamientos, si bien parece que se produce un mayor crecimiento del hipocotilo en el segundo tratamiento, donde se pone de manifiesto la termotolerancia adquirida. Este dato puede resultar contradictorio con el anterior, ya que se ha comentado que el gen *FsGASA4* sólo actuaría en la termotolerancia basal, sin embargo, hay que tener en cuenta que las temperaturas a las que se sometieron las semillas son inferiores a las de la aproximación anterior, por tanto, se puede decir que a temperaturas

iguales o superiores a 50°C, el gen *FsGASA4* sólo promueve la termotolerancia basal, mientras que a temperaturas inferiores es capaz de promover también la termotolerancia adquirida así como la elongación del hipocotilo.

Existen evidencias de que la proteína *GIP2*, miembro de la familia *GASA* de *Petunia hybrida*, presenta actividad antioxidante mediante la disminución en los niveles de  $H_2O_2$  en los tejidos vegetales sometidos a diferentes tipos de estrés, capaces de producir especies reactivas de oxígeno (ROS) (Wigoda et al., 2006). Por ello, nos propusimos ver el efecto que provocaba el paraquat en nuestras semillas. El paraquat es un herbicida no selectivo de amplio espectro que pertenece a la familia de los biperidilos, y actúa en el cloroplasto uniéndose a la membrana tilacoidal y a la membrana del cloroplasto mediante interacciones hidrofóbicas. Es capaz de aceptar los electrones producidos por la fotosíntesis y donárselos al oxígeno, generándose especies reactivas de oxígeno como  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ , que provocarán diversos daños en la planta (Chen y Dickman, 2004). El paraquat a una concentración de 0,5 mM provoca un bloqueo en la germinación de las semillas del ecotipo Columbia, ya que éstas no superan el 20% de germinación al cabo de 10 días, mientras que las semillas de las líneas transgénicas *35S:F<sub>s</sub>GASA4* alcanzan porcentajes entre el 70-90% tras el mismo período de tiempo (Figura R.40.A). Por lo tanto, parece que el gen *F<sub>s</sub>GASA4* puede modular la tolerancia al estrés oxidativo. Este efecto podría deberse a los residuos de Cys que se encuentran en el extremo C-terminal y que es común para todas las proteínas *GASA*, ya que parece que están implicados en diferentes procesos mediados por ROS, pudiendo a la vez ser importantes en la captura de estas especies reactivas de oxígeno (Segura et al., 1999; Berrocal-Lobo et al., 2002; Wigoda et al., 2006).

Como ya se ha mencionado, el gen *F<sub>s</sub>GASA4* está fuertemente inducido por GAs, sin embargo, no existe mucha información acerca del papel de las GAs en los estreses abióticos. La aplicación exógena de  $GA_3$  es capaz de mejorar la respuesta de las semillas del tipo silvestre, así como revertir los efectos inhibitorios de los diferentes tipos de estrés mencionados anteriormente. La adición de  $GA_3$  50  $\mu$ M a un medio con NaCl 100 mM (Figura R.36.B) o manitol 350 mM (Figura R.37.B), provoca un incremento en el porcentaje de germinación, así como un adelanto en el comienzo de ésta en las semillas del tipo silvestre, en el mutante *gasa4-1* y en las semillas de las líneas transgénicas. El efecto de la aplicación exógena de  $GA_3$  en la termotolerancia resulta en un incremento en la longitud del hipocotilo en todos los tratamientos y para todas las líneas (Tabla R.IV), así como en el porcentaje de germinación de las semillas del tipo silvestre, tanto en la termotolerancia basal (Figura R.38.B) como en la adquirida (Figura R.39.B). Por tanto, parece evidente el efecto positivo que ejercen las GAs en las semillas frente al estrés térmico. Por último, la aplicación exógena de  $GA_3$  también es capaz de revertir el efecto inhibitorio en la germinación provocado por el paraquat, (Figura R.40.B), lo que indica que esta hormona también tiene un efecto positivo frente al estrés oxidativo.

Estos datos son consistentes con la observación de que niveles reducidos de GAs, como ocurre en semillas imbibidas en PCB, provocan una acumulación de las proteínas DELLA (King et al., 2001; Silverstone et al., 2001) y por tanto, una inhibición del crecimiento, mientras que las GAs inducen su desaparición permitiendo el crecimiento de la planta. Así por ejemplo, de una manera similar, las semillas de grama azul tratadas con trinexapac-etil, un inhibidor de la síntesis de GAs, presentan menor tolerancia al estrés térmico que las semillas sin tratar (Heckman et al., 2002), lo que indica un papel de

las GAs en la termotolerancia. Adicionalmente, se ha sugerido que los estreses abióticos inhiben el crecimiento, lo que significa que se produce una disminución en los niveles de GAs bioactivas, provocando la acumulación de proteínas DELLA (Magome et al., 2004).

Uno de los procesos en los que intervienen las GAs es la elongación celular. Durante los últimos años se han identificado y caracterizado numerosos genes de tipo *GASA* con diferentes funciones, como un posible papel en la regulación de la división celular o en procesos de elongación celular. Probablemente, la función biológica venga determinada por la expresión espacial y temporal durante el desarrollo de la planta, así como por la variabilidad en la secuencia del extremo N-terminal. Se ha observado que el gen *AtGASA4* se expresa en hojas de roseta (Roxrud et al., 2007); por su parte, la sobreexpresión del gen *FsGASA4* hace que las células epidérmicas de hojas de roseta y caulinares sean más anchas que las del tipo silvestre (Fig. R.41), debido probablemente, a una gran acumulación de esta proteína, lo que sugiere que *FsGASA4*, debido a su activación por GAs, promueve la elongación celular en hojas. Datos similares, se obtuvieron mediante la sobreexpresión del gen *GIP2* de *Petunia hybrida*, ya que ésta promovía la elongación celular tanto en el tallo como en la corola (Wigoda et al., 2006). La participación de este gen en la elongación celular podría relacionarse con los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) presentes, que inhiben la expansión celular (Rodríguez et al., 2002), mientras que unos niveles adecuados de  $H_2O_2$  promueven la elongación celular (Foreman et al., 2003). Con estos datos, podemos especular que en las líneas transgénicas que sobreexpresan *FsGASA4* disminuiría la cantidad de  $H_2O_2$  hasta niveles propicios para que se produjera la elongación celular, y por tanto, el gen *FsGASA4* podría estar afectando indirectamente al crecimiento, protegiendo al tejido de los estreses ambientales, lo mismo que ocurre con el gen *GIP2* (Wigoda et al., 2006).

Adicionalmente, la expresión del gen *AtGASA4* es elevada en células guarda, aunque se inhibe en presencia de ABA (Leonhardt et al., 2004), hormona responsable del cierre estomático en condiciones ambientales desfavorables, mediante un incremento en los niveles de  $H_2O_2$  (Pei et al., 2000; Zhang et al., 2001). La sobreexpresión de *FsGASA4* reduce el número de estomas pero aumenta la apertura de estos respecto a los del tipo silvestre (Fig. R.41), probablemente porque disminuya los niveles de  $H_2O_2$  citosólico en las células guarda, al igual que ocurre con la sobreexpresión del gen *GIP2* (Wigoda et al., 2006).

A la vista de las respuestas frente a diferentes tipos de estrés abiótico en estadíos tempranos del desarrollo, de las líneas que sobreexpresan el gen *FsGASA4*, se analizaron los niveles de tres hormonas (ABA, SA y JA) implicadas en las respuestas de las plantas a estrés, tanto en semillas, como en plántulas de 7 días del ecotipo Col-0, del mutante *gasa4-1* y de las líneas que sobreexpresan el transgén crecidas en medio MS. El dato más relevante fue el elevado nivel de SA detectado en las semillas transgénicas, casi tres veces más que los niveles detectados en las semillas del tipo silvestre y del mutante *gasa4-1*. Respecto a los niveles de las otras hormonas, el ABA era ligeramente superior en las semillas transgénicas, probablemente para contrarrestar los niveles de GAs, mientras que el JA presentaba niveles menores en las semillas transgénicas que en el resto, lo cual resulta lógico ya que las rutas del SA y del JA son antagónicas. Por otro lado, en plántulas, la diferencia observada en los niveles de SA es menor que en el caso anterior, pero sigue siendo estadísticamente significativa en relación al tipo silvestre y al mutante (Tabla R.V).

Estos datos sugieren que la mayor resistencia que presentan las semillas que sobreexpresan el transgén *FsGASA4* a los diferentes tipos de estrés abiótico analizados, puede ser debida al incremento que presentan en los niveles de SA, y que este gen podría estar modulando la biosíntesis de SA. Existen evidencias de que el SA no sólo desempeña un papel muy importante en las respuestas frente al estrés biótico, sino también frente a diferentes tipos de estrés abiótico (Horváth et al., 2007).

Cuando las plantas están sometidas a algún tipo de estrés abiótico, se va a producir un incremento en los niveles de expresión de genes relacionados tanto con la biosíntesis como con el mecanismo de acción del SA, y así se produce una respuesta frente a ellos. Las semillas que sobreexpresan *FsGASA4* presentan elevados niveles de SA, como indican las medidas hormonales, por lo que cabría esperar que los niveles de transcritos de ciertos genes relacionados con esta hormona y con ciertos tipos de estrés, fueran más elevados en estas semillas que en el tipo silvestre Col-0. En las plantas *35S:FsGASA4* los niveles de expresión de los genes *ICS1* (implicado en la ruta de biosíntesis del SA), *NPRI* (mecanismo de acción del SA), *PRI* (mecanismo de acción del SA), *isocitrato liasa* (clave en el ciclo del glioxilato) (Rajjou et al., 2006), y *Hsp101* (implicado en termotolerancia) aumentan respecto a los observados en el ecotipo silvestre (Figura R.42). Estos resultados están de acuerdo con los observados por Clarke et al. (2004), donde la expresión de *PRI* aumentaba a medida que se aumentaba la concentración de SA en el tratamiento al que eran sometidas las plantas. De manera similar, estudios recientes han demostrado que los transcritos de genes relacionados con la patogénesis y dependientes de SA presentan una fuerte inducción en el cuádruple mutante *DELLA* (Navarro et al., 2008). Adicionalmente, mediante la utilización de técnicas de proteómica (Rajjou et al., 2006), se ha comprobado que la acumulación de la proteína isocitrato liasa era mayor en semillas germinadas en presencia de SA. Quizás el dato más controvertido puede ser la expresión del gen *Hsp101*, ya que se ha observado que el SA no induce su expresión (Clarke et al., 2004); sin embargo otros autores apuntan, tras el análisis de mutantes *NahG* (deficientes en SA), que la inducción de las proteínas de choque térmico *Hsp101* es independiente de la ruta de señalización del SA (Larkindale et al., 2005), pudiendo deberse en este caso a las GAs. Por tanto, parece que la sobreexpresión de *FsGASA4* es capaz de regular estos procesos en los que participan tanto las GAs como el SA.

A la vista de los resultados presentados en esta memoria, parece claro que los elevados niveles de SA en las semillas *35S:FsGASA4* podrían ser los responsables de la mejor respuesta de estas semillas a diferentes condiciones de estrés abiótico, por lo que quisimos comprobar si la aplicación exógena de SA era capaz de revertir el efecto inhibitorio en la germinación de los diferentes tipos de estrés analizados. Para ello optimizamos la concentración de SA utilizada, ya que esta hormona provoca un retraso en la germinación si se aplica a elevadas concentraciones (Guan y Scandalios, 1995). En nuestro caso, la concentración óptima de SA fue de 50  $\mu$ M para la mayoría de los casos. La aplicación exógena de esta hormona era capaz de revertir, al menos en parte, el efecto inhibitorio de los estreses salino, oxidativo y térmico en la germinación de las semillas.

Respecto al estrés salino (Figura R.43.A), las semillas del ecotipo Col-0 germinaron casi en un 100% después de 10 días de tratamiento. Este dato está de acuerdo con estudios de proteómica realizados en *Arabidopsis*, donde se observó que la aplicación exógena de SA era capaz de mejorar la germinación de las semillas bajo condiciones de estrés salino (Rajjou et al., 2006); además se ha comprobado que los

genes *PR*, cuya expresión se induce por distintos tipos de estrés, contribuyen a la regulación de la germinación en condiciones de estrés salino (Seo et al., 2008).

Por otro lado, la aplicación exógena de SA no parece que mejore la resistencia al estrés osmótico en semillas (Figura R.43.B). Esto puede ser debido a que la aplicación de SA en el medio no sea el método más adecuado, ya que, según se ha comprobado, es más eficiente la imbibición previa de las semillas en una solución de SA antes de someterlas al estrés (Hamada, 1998; Senaratna et al., 2000; Al-Hakimi y Hamada, 2001).

Respecto al estrés oxidativo, se ha propuesto que el SA es un compuesto efectivo frente al daño oxidativo, ya que disminuye la cantidad de peróxidos lipídicos al aumentar la capacidad antioxidativa de la planta (Strobel y Kuc, 1995; Ananieva et al., 2002, 2004). Estos resultados se han corroborado utilizando plantas transgénicas *NahG* de arroz, que son incapaces de acumular SA, y presentan una elevada hipersensibilidad al paraquat (Yang et al., 2004; Kusumi et al., 2006). En nuestro caso, observamos que la aplicación exógena de SA revierte, al menos parcialmente, la sensibilidad de las semillas del tipo silvestre al paraquat (Figura R.43.C), y parece que este efecto se incrementa a medida que aumenta la concentración de SA. Por tanto, teniendo en cuenta estos datos, parece claro que el SA tiene capacidad antioxidante, y la mayor resistencia que presentan las semillas de las líneas *35S:FsGASA4* puede ser debida a que los niveles endógenos de esta hormona son muy elevados.

En diversos estudios se ha comprobado que el SA participa en la adquisición de la termotolerancia en diferentes especies vegetales como mostaza (Dat et al., 1998), guisante (Pan et al., 2006) y *Arabidopsis* (Larkindale y Knight, 2002); sin embargo, este efecto es dependiente de la concentración de SA, ya que elevadas concentraciones del mismo producen el efecto contrario. El papel que ejerce el SA en la termotolerancia basal está bastante claro, ya que todos los estudios apoyan dicha teoría, sin embargo, existe más controversia en el papel que desempeña en la termotolerancia adquirida. Utilizando plantas transgénicas *NahG* incapaces de acumular SA, algunos autores han demostrado, que el papel de dicha hormona sólo se restringe a la termotolerancia basal (Clarke et al., 2004); pero otros, utilizando los mismos mutantes, relacionan al SA también con la termotolerancia adquirida (Larkindale et al., 2005). En la figura R.43.D., se observa que tras el tratamiento de las semillas del tipo silvestre Col-0 con una concentración de SA 50  $\mu$ M, se produce una mejor respuesta de éstas frente a un tratamiento de choque térmico, pero sólo en lo referente a la termotolerancia basal, ya que la aplicación exógena de SA no parece tener ningún efecto en la termotolerancia adquirida, estando de acuerdo con los datos presentados por Clarke et al. (2004). Sin embargo, en la tabla R.VI, se muestra cómo tras diferentes tratamientos de temperatura (para estudiar termotolerancia basal y adquirida) la longitud del hipocotilo del ecotipo Col-0 aumenta en todos los casos. Este dato parece contradictorio con lo expuesto anteriormente, sin embargo, se sabe que la amplitud del daño térmico varía con las condiciones de luz (Niyogi et al., 1999), y en ensayos de crecimiento del hipocotilo en mutantes *NahG* tras un tratamiento de termotolerancia adquirida en oscuridad, la longitud de estos disminuye del mismo modo que en condiciones de luz (Larkindale et al., 2005), por lo que se podría decir que, en oscuridad, la aplicación exógena de SA si tiene un efecto en la adquisición de termotolerancia adquirida.

El estrés térmico producido por elevadas temperaturas conlleva un aumento en la fluidez de la membrana, mientras que el estrés provocado por las bajas temperaturas produce una profunda rigidez de

la misma (Sangwan et al., 2002). El estrés térmico, en algunos casos, provoca la peroxidación de los lípidos de la membrana, y como medida de la peroxidación lipídica se utiliza el MDA (Malondialdehído), ya que la concentración de este compuesto es un indicador de la resistencia de la planta en respuesta al estrés térmico. Como se observa en la figura R.46, tras un tratamiento de 3h a 50°C el contenido relativo de MDA es mayor en las plántulas del tipo silvestre Col-0 que en las líneas transgénicas, por lo que se corroboran los datos anteriores de que la sobreexpresión del gen *FsGASA4* provoca estabilidad en las membranas celulares, lo que hace que sean más termotolerantes. Cuando se añade SA exógeno, se observa como disminuyen los niveles de MDA, principalmente en el tipo silvestre, por lo que parece claro que el SA también proporciona estabilidad a la membrana, ya que provoca una disminución en los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y en la actividad catalasa. El efecto del SA en la disminución del daño oxidativo no sólo se ha observado en plantas de *Arabidopsis*, sino también en mostaza (Dat et al., 1998), uva de playa (Wen et al., 2008) y guisante (Liu et al., 2006; Pan et al., 2006). Por otra parte, la aplicación exógena de GA<sub>3</sub> también provoca una disminución en los niveles de MDA, lo que sugiere que las giberelinas tienen un efecto similar al del SA en la protección frente al daño oxidativo. Estos datos, junto con los anteriormente mostrados, nos confirman que estas dos hormonas son importantes en las respuestas de las plantas frente a diferentes tipos de estrés abiótico.

A la vista de todos los resultados presentados, quisimos confirmar si las GAs son capaces de inducir la biosíntesis de SA. Para ello se midieron los niveles de SA en semillas del ecotipo Columbia imbibidas durante 24 h en presencia o ausencia de GA<sub>3</sub> 100 µM, y en plántulas de 7 días del mutante *gasa4-1* y del tipo silvestre (Col-0) crecidas en medio MS y en medio MS suplementado con GA<sub>3</sub> 100 µM. En el caso de las semillas del ecotipo silvestre (Col-0) (Tabla R.VII), los niveles de SA son aproximadamente el doble en las tratadas con GA<sub>3</sub> que en semillas control, con lo que se verifica el efecto positivo que tienen las GAs sobre la síntesis de SA. Estos datos son muy similares a los detectados en las semillas de las líneas transgénicas, cuyo contenido en SA prácticamente se duplica tras el tratamiento con GA<sub>3</sub>. En el caso de plántulas de 7 días, de nuevo se observan mayores niveles de SA en plántulas tratadas con GA<sub>3</sub> respecto a los correspondientes controles, si bien, como ocurría en las plántulas *35S:F<sub>s</sub>GASA4*, las diferencias, aunque estadísticamente significativas, son inferiores a las observadas en semillas. En cualquier caso, nuevamente se pone de manifiesto la clara relación existente entre GAs y SA.

Para profundizar en la relación entre GAs y SA a nivel molecular, se analizó la expresión de algunos genes relacionados con el SA en plántulas de *Arabidopsis thaliana*, como *ICSI* (implicado en la ruta de biosíntesis del SA), *NPRI* y *PRI* (implicados en el mecanismo de acción del SA), *isocitrato liasa* y *malato sintasa* (enzimas claves del ciclo del glioxilato, importantes en la síntesis de carbohidratos y en el metabolismo de lípidos durante la germinación de la semilla y el desarrollo de la planta), tras un tratamiento durante 7 días con GA<sub>3</sub> 100 µM, observándose un aumento en la expresión de los genes anteriormente mencionados respecto a las plantas control (Figura R.47). Estos resultados corroborarían los datos presentados en esta memoria, según los cuales las GAs juegan un papel importante en la biosíntesis y en el mecanismo de acción del SA, de tal manera que la aplicación exógena de GA<sub>3</sub> no sólo sería capaz de inducir genes tanto de la síntesis como del mecanismo de acción del SA, sino que también

sería capaz de inducir la expresión otra serie de genes ya descritos, que también están regulados por esta hormona (Rajjou et al., 2006).

Estudios recientes han demostrado que los niveles de SA son prácticamente el doble en plántulas del cuádruple mutante DELLA infectadas con el hemibiotrofo *Pseudomonas syringae* pv *tomato* cepa DC3000, que en el correspondiente tipo silvestre (Navarro et al., 2008); como consecuencia, estos mutantes son más resistentes a los patógenos biotrofos, mientras que presentan una mayor sensibilidad frente a patógenos necrotrofos, concluyendo que las proteínas DELLA reprimen la biosíntesis y señalización del SA, así como las respuestas inmunitarias de la planta, modulando el balance entre ácido salicílico y ácido jasmónico. Adicionalmente, estos mutantes DELLA son menos sensibles al estrés salino en los primeros estadios del crecimiento postgerminativo, aunque en fases más avanzadas del crecimiento, la estabilización de las proteínas DELLA aumenta la supervivencia de las plantas (Achard et al., 2006).

Con los datos presentados en esta memoria, podemos decir que las giberelinas, a través de la represión que producen sobre las proteínas DELLA, así como mediante el control en el balance SA/JA debido al incremento en SA, son capaces de controlar las respuestas de las plantas frente a los estreses abióticos en los primeros estadios del crecimiento postgerminativo, pudiendo ser el gen *GASA4* el punto de unión entre ambas rutas hormonales. Estas complejas interacciones son, en muchos casos, recíprocas (Weiss y Ori, 2007), por lo que quisimos comprobar si el SA podía tener un papel importante en algunos procesos fisiológicos relacionados con las GAs. Para ello, analizamos las respuestas del mutante *gal* de *Arabidopsis* (deficiente en GAs) en presencia de SA, y observamos que la aplicación exógena de SA es parcialmente capaz de recuperar el fenotipo del mutante, del mismo modo que ocurre cuando se le añade GA<sub>3</sub> (Figura R.45), lo que sugiere que algunos de los efectos que tienen las GAs en la germinación pueden estar mediados por el SA.

Por último, otro de los objetivos era realizar un ensayo de doble híbrido en levadura para analizar las posibles interacciones proteína-proteína de FsGASA4 con sus posibles sustratos celulares. Dentro de los positivos encontrados aparecieron gran cantidad de ESTs y proteínas de diversos organismos, cuya principal característica era que se habían obtenido a partir de genotecas de diferentes tejidos y órganos sometidos tanto a condiciones de estrés abiótico como biótico, o bien que estaban relacionadas con la germinación de semillas (Tabla R.VIII). Estos resultados apoyan la hipótesis del papel de la proteína FsGASA4 en la resistencia a diferentes tipos de estrés abiótico, y que pueda estar interaccionando con proteína(s) que, de un modo directo o indirecto, estén relacionadas con la biosíntesis o mecanismo de acción del SA.

Finalmente, cabe destacar que todos los datos presentados en esta memoria, apoyan que una respuesta constitutiva a GAs así como la sobreexpresión del gen *FsGASA4*, pueden tener un papel muy importante en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes tipos de estrés abiótico, en los primeros momentos del desarrollo postgerminativo, mediante un incremento en los niveles de SA. En otras palabras, las proteínas DELLA y/o la ausencia de GAs impiden el crecimiento mediante la inhibición de la síntesis de SA. De hecho, se ha demostrado que el estrés salino impide la germinación de las semillas mediante la represión de la síntesis de GAs (Magome et al., 2004), a través de la inhibición

de la enzima GA3 oxidasa (Kim et al., 2008), y de acuerdo con nuestros datos, reprimiendo la síntesis de SA, lo cual provocaría la incapacidad de las semillas para germinar en condiciones de estrés abiótico.

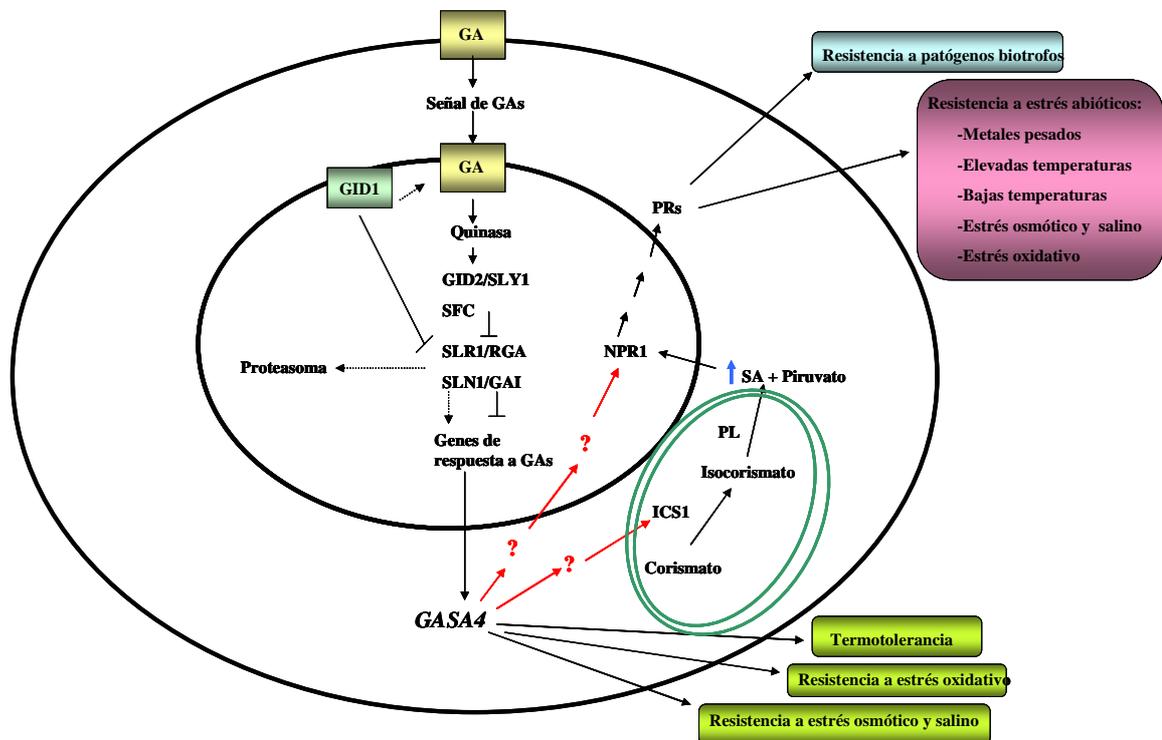


Figura D.1.: Hipotético esquema general de la función de GASA4.

*Conclusiones*

El objetivo principal del trabajo que recoge esta memoria ha sido profundizar en la participación de una proteína tirosina fosfatasa (FsPTP1) y una proteína GASA (FsGASA4) de haya, inducidas por ABA y GAs respectivamente, en las rutas de señalización de estas hormonas. Tras los estudios realizados con estas proteínas podemos llegar a las siguientes conclusiones:

1.- Los niveles de transcritos del gen *FsPTP1* en las semillas de haya están regulados por ABA, lo que sugiere su participación en los procesos que controlan la dormición y germinación de semillas. Su sobreexpresión en dos ecotipos de *Arabidopsis* (Col-0 y Cvi) provoca una reducción en la dormición de las semillas, menor sensibilidad al ABA, mayor tolerancia tanto al estrés osmótico como salino y menor requerimiento de giberelinas, provocando, adicionalmente, una fuerte reducción en la expresión del gen de respuesta a ABA *RAB18*, lo que indica que FsPTP1 actuaría como un regulador negativo de la ruta de transducción de señales del ácido abscísico.

2.- El gen *FsGASA4* está inducido por giberelinas y su expresión en semillas de haya se correlaciona con la salida de la dormición. Sin embargo, el análisis funcional de este gen en *Arabidopsis* pone de manifiesto que no tiene ninguna función en este proceso.

3.-La sobreexpresión del gen *FsGASA4* en *Arabidopsis* provoca una mayor resistencia al paclobutrazol, así como un menor requerimiento de giberelinas para el crecimiento de las líneas transgénicas. Adicionalmente, estas plantas son más tolerantes a diferentes situaciones de estrés abiótico durante las primeras fases del crecimiento postgerminativo.

4.-Las semillas y plántulas de las diferentes líneas transgénicas que sobreexpresan el gen *FsGASA4* se caracterizan por presentar unos niveles endógenos muy elevados de SA, lo cual, junto con el incremento en los niveles de expresión de genes relacionados tanto con la biosíntesis como con el mecanismo de acción de esta hormona, sugiere que la mayor tolerancia de las plantas transgénicas a las diferentes situaciones de estrés abiótico analizadas, puede ser debida a la acción del SA, ya que, además, esta hormona que aplicada exógenamente es capaz de revertir el efecto inhibitorio de estas situaciones desfavorables.

5.-La aplicación exógena de GA<sub>3</sub> es capaz de revertir el efecto inhibitorio de los diferentes tipos de estrés abiótico, y nuestros resultados sugieren que este efecto puede ser debido a que las GAs podrían modular la síntesis de SA. Adicionalmente, se ha comprobado que tanto las GAs como el SA tienen capacidad antioxidante, siendo capaces de reducir el daño oxidativo provocado por el estrés, lo que corrobora el importante papel de estas dos hormonas en las respuestas de las plantas a condiciones medioambientales desfavorables.

6.- Finalmente, y a la vista de todos los resultados obtenidos, podemos concluir que las GAs a través de la represión que producen sobre las proteínas DELLA, así como mediante la modulación de los niveles de SA, son capaces de controlar las respuestas de las plantas frente a diferentes situaciones de

estrés abiótico en los primeros estadios del crecimiento postgerminativo, pudiendo ser la proteína GASA4 el punto de unión entre ambas rutas hormonales. Además, GASA4 podría interactuar con proteína(s) que, de un modo directo o indirecto, están relacionadas con la biosíntesis o el mecanismo de acción del SA. Adicionalmente, la interacción entre estas dos hormonas es recíproca, ya que el SA es capaz de revertir el fenotipo del mutante *gal*, deficiente en GAs, al menos parcialmente, lo que sugiere que algunos de los efectos que tienen las GAs en la germinación pueden estar mediados por el SA.

## *Bibliografía*

- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2003) *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* **15**: 63-78
- Achard P, Cheng H, De Grauwe L, Decat J, Schoutteten H, Moritz T, Van der Straeten D, Peng JR, Harberd NP** (2006) Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* **311**: 91-94
- Achard P, Liao LL, Jiang CF, Desnos T, Bartlett J, Fu XD, Harberd NP** (2007) DELLAs contribute to plant photomorphogenesis. *Plant Physiol* **143**: 1163-1172
- Achard P, Vriezen WH, Van Der Straeten D, Harberd NP** (2003) Ethylene regulates *Arabidopsis* development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *Plant Cell* **15**: 2816-2825
- Ache P, Becker D, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MRG, Hedrich R** (2000) GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K<sup>+</sup>-selective, K<sup>+</sup>-sensing ion channel. *FEBS Lett* **486**: 93-98
- Agarwal S, Sairam RK, Srivastava GC, Tyagi A, Meena RC** (2005) Role of ABA, salicylic acid, calcium and hydrogen peroxide on antioxidant enzymes induction in wheat seedlings. *Plant Sci* **169**: 559-570
- Allen GJ, Murata Y, Chu SP, Nafisi M, Schroeder JI** (2002) Hypersensitivity of abscisic acid-induced cytosolic calcium increases in the *Arabidopsis* farnesyltransferase mutant *eral-2*. *Plant Cell* **14**: 1649-1662
- Ali-Rachedi S, Bouinot D, Wagner MH, 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**: 479-488
- Alonso A, Rojas A, Godzik A, Mustelin T** (2004) The dual-specific protein tyrosine phosphatase family. *Protein Phosphatases* **5**: 333-358
- Alonso-Blanco C, Bentsink L, Hanhart CJ, Vries HBE, Koornneef M** (2003) Analysis of natural allelic variation at seed dormancy loci of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **164**: 711-729
- Ananieva EA, Alexieva VS, Popova LP** (2002) Treatment with salicylic acid decreases the effects of paraquat on photosynthesis. *J Plant Physiol* **159**: 685-693
- Ananieva EA, Christov KN, Popova LP** (2004) Exogenous treatment with salicylic acid leads to increased antioxidant capacity in leaves of barley plants exposed to Paraquat. *J Plant Physiol* **161**: 319-328
- Anderberg RJ, Walker-Simmons MK** (1992) Isolation of a wheat cDNA clone for an abscisic acid-inducible transcript with homology to protein kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 10183-10187
- Andersen JN, Mortensen OH, Peters GH, Drake PG, Iversen LF, Olsen OH, Jansen PG, Andersen HS, Tonks NK, Moller NPH** (2001) Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol Cell Biol* **21**: 7117-7136

**Anderson JP, Badruzaufari E, Schenk PM, Manners JM, Desmond OJ, Ehlert C, Maclean DJ, Ebert PR, Kazan K** (2004) Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 3460-3479

**Anderson NG, Maller JL, Tonks NK, Sturgill TW** (1990) Requirement for integration of signals from 2 distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature* **343**: 651-653

**Ariizumi T, Steber CM** (2007) Seed germination of GA-insensitive *sleepy1* mutants does not require RGL2 protein disappearance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 791-804

**Aubert D, Chevillard M, Dorne AM, Arlaud G, Herzog M** (1998) Expression patterns of *GASA* genes in *Arabidopsis thaliana*: the *GASA4* gene is up-regulated by gibberellins in meristematic regions. *Plant Mol Biol* **36**: 871-883

**Bailly C, Leymarie J, Lehner A, Rousseau S, Come D, Corbineau F** (2004) Catalase activity and expression in developing sunflower seeds as related to drying. *J Exp Bot* **55**: 475-483

**Bandurska H, Stroinski A** (2005) The effect of salicylic acid on barley response to water deficit. *Acta Physiol Plant* **27**: 379-386

**Barizza E, Lo Schiavo F, Terzi M, Filippini F** (1999) Evidence suggesting protein tyrosine phosphorylation in plants depends on the developmental conditions. *FEBS Lett* **447**: 191-194

**Baskin CC, Baskin JM** (1998) *Seeds: Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press.

**Baskin JM, Baskin CC** (2004) A classification system for seed dormancy. *Seed Sci Res* **14**: 1-16

**Beaudoin N, Serizet C, Gosti F, Giraudat J** (2000) Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell* **12**: 1103-1115

**Ben-Nissan G, Lee JY, Borohov A, Weiss D** (2004) GIP, a *Petunia hybrida* GA-induced cysteine-rich protein: a possible role in shoot elongation and transition to flowering. *Plant J* **37**: 229-238

**Ben-Nissan G, Weiss D** (1996) The petunia homologue of tomato *GAST1*: transcript accumulation coincides with gibberellin-induced corolla cell elongation. *Plant Mol Biol* **32**: 1067-1074

**Bentsink L, Jowett J, Hanhart CJ, Koornneef M** (2007) Genetic aspects of seed dormancy. In KJ Bradford, H Nonogaki, eds, *Seed Development, Dormancy and Germination*. Blackwell, Oxford, pp 113-132

**Berrie AMM, Robertson J** (1976) Abscisic acid as an endogenous component in lettuce fruits, *Lactuca sativa* L. Cv Grand Rapids. does it control thermodormancy?. *Planta* **131**: 211-215

**Berrocal-Lobo M, Segura A, Moreno M, López G, García-Olmedo F, Molina A** (2002) Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. *Plant Physiol* **128**: 951-961

- Bethke PC, Libourel LGL, Reinohl V, Jones RL** (2006) Sodium nitroprusside, cyanide, nitrite, and nitrate break *Arabidopsis* seed dormancy in a nitric oxide-dependent manner. *Planta* **223**: 805-812
- Bevan M** (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res* **12**: 8711-8721
- Bewley JD** (1980) Secondary dormancy (skotodormancy) in seeds of lettuce (*Lactuca sativa* Cv Grand-Rapids) and its release by light, gibberellic acid and benzyladenine. *Physiol Plant* **49**: 277-280
- Bewley JD** (1997) Seed germination and dormancy. *Plant Cell* **9**: 1055-1066
- Bewley JD, Black M** (1994) Dormancy and the control of germination. In JD Bewley, M Black, eds, *Seeds. Physiology of Development and Germination*. Plenum Press, New York, pp 199-272
- Birnboim HC, Doly J** (1979) Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523
- Blakeslee J, Zhou H W, Heath JT, Delong A** (2007) Subcellular localization of regulatory A subunits of *Arabidopsis* protein phosphatase 2A. *Plant Biol* **2007**: 198
- Bork P, Brown NP, Hegyi H, Schultz J** (1996) The protein phosphatase 2C (PP2C) superfamily: detection of bacterial homologues. *Prot Sci* **5**: 1421-1425
- Borsani O, Valpuesta V, Botella MA** (2001) Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol* **126**: 1024-1030
- Brady SM, McCourt P** (2003) Hormone cross-talk in seed dormancy. *J Plant Growth Reg* **22**: 25-31
- Brondello JM, Brunet A, Pouyssegur J, McKenzie FR** (1997) The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44 MAPK cascade. *J Biol Chem* **272**: 1368-1376
- Busk PK, Pages M** (1997) Protein binding to the abscisic acid-responsive element is independent of VIVIPAROUS1 in vivo. *Plant Cell* **9**: 2261-2270
- 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**: 805-822
- Cai HW, Morishima H** (2000) Genomic regions affecting seed shattering and seed dormancy in rice. *Theor Appl Genet* **100**: 840-846
- Calvo AP, Jiménez JA, Nicolás C, Nicolás G, Rodríguez D** (2003) Isolation and characterization of genes related to the breaking of beechnut dormancy and putatively involved in ethylene signal perception and transduction. In G Nicolas, KJ Bradford, D Come, HW Pritchard, eds, *The Biology of Seeds. Recent Research Advances*. CABI Publishing, pp 141-150

- Campalans A, Messeguer R, Goday A, Pagés M** (1999) Plant responses to drought, from ABA signal transduction events to the action of the induced proteins. *Plant Physiol Biochem* **37**: 327-340
- Cao DN, Cheng H, Wu W, Soo HM, Peng JR** (2006) Gibberellin mobilizes distinct DELLA-dependent transcriptomes to regulate seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **142**: 509-525
- Cao DN, Hussain A, Cheng H, Peng JR** (2005) Loss of function of four DELLA genes leads to light- and gibberellin-independent seed germination in *Arabidopsis*. *Planta* **223**: 105-113
- Cao H, Bowling SA, Gordon AS, Dong XN** (1994) Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell* **6**: 1583-1592
- Carrari F, Pérez-Flores L, Lijavetzky D, Enciso S, Sánchez R, Benech-Arnold R, Iusem N** (2001) Cloning and expression of a sorghum gene with homology to maize *vp1*. Its potential involvement in pre-harvest sprouting resistance. *Plant Mol Biol* **45**: 631-640
- Chae MJ, Lee JS, Nam MH, Cho K, Hong JY, Yi SA, Suh SC, Yoon IS** (2007) A rice dehydration-inducible SNF1-related protein kinase 2 phosphorylates an abscisic acid responsive element-binding factor and associates with ABA signaling. *Plant Mol Biol* **63**: 151-169
- Chen CB, Dickman MB** (2004) Dominant active Rac and dominant negative Rac revert the dominant active Ras phenotype in *Colletotrichum trifolii* by distinct signalling pathways. *Mol Microbiol* **51**: 1493-1507
- Chibani K, Ali-Rachedi S, Job C, Job D, Jullien M, Grappin P** (2006) Proteomic analysis of seed dormancy in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **142**: 1493-1510
- 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
- Choi HI, Park HJ, Park JH, Kim S, Im MY, Seo HH, Kim YW, Hwang I, Kim SY** (2005) *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase AtCPK32 interacts with ABF4, a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, and modulates its activity. *Plant Physiol* **139**: 1750-1761
- Christmann A, Moes D, Himmelbach A, Yang Y, Tang Y, Grill E** (2006) Integration of abscisic acid signalling into plant responses. *Plant Biol* **8**: 314-325
- Clarke SM, Mur LAJ, Wood JE, Scott IM** (2004) Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **38**: 432-447
- Clerkx EJM, El-Lithy ME, Vierling E, Ruys GJ, Blankestijin-De Vries H, Groot SPC, Vreugdenhil D, Koornneef M** (2004) Analysis of natural allelic variation of *Arabidopsis* seed germination and seed longevity traits between the accessions Landsberg erecta and Shakedown, using a new recombinant inbred line population. *Plant Physiol* **135**: 432-443

- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735-743
- Clouse S** (2001) Brassinosteroids. *Curr Biol* **11**: R904-R904
- Cohen JD, Bandurski RS** (1982) Chemistry and physiology of the bound auxins. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **33**: 403-430
- Colucci G, Apone F, Alyeshmerni N, Chalmers D, Chrispeels MJ** (2002) GCR1, the putative *Arabidopsis* G protein-coupled receptor gene is cell cycle-regulated, and its overexpression abolishes seed dormancy and shortens time to flowering. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 4736-4741
- Come D, Thevenot C** (1982) Environmental control of embryo dormancy and germination. In AA Khan, ed, *The Physiology and Biochemistry of Seed Development, Dormancy and Germination*. Elsevier Biochemical Press, New York, pp 271-290
- Cominelli E, Gusmaroli G, Allegra D, Galbiati M, Wade HK, Jenkins GI, Tonelli C** (2008) Expression analysis of anthocyanin regulatory genes in response to different light qualities in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol* **165**: 886-894
- Cone JW, Spruit CJP** (1983) Imbibition conditions and seed dormancy of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* **59**: 416-420
- 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
- Czóvek P, Kiraly I, Paldi E, Molnar I, Gaspar L** (2006) Comparative analysis of stress tolerance in *Aegilops* accessions and *Triticum* wheat varieties to detect different drought tolerance strategies. *Acta Agron Hung* **54**: 49-60
- Dat JF, López-Delgado H, Foyer CH, Scott IM** (1998) Parallel changes in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiol* **116**: 1351-1357
- Dean JV, Mohammed LA, Fitzpatrick T** (2005) The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. *Planta* **221**: 287-296
- Debeaujon I, Leon-Kloosterziel KM, Koornneef M** (2000) Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **122**: 403-413
- Deblaere R, Bytebier B, Degreve H, Deboeck F, Schell J, Vanmontagu M, Leemans J** (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res* **13**: 4777-4788
- DeLong A** (2006) Switching the flip: protein phosphatase roles in signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 470-477

**Denu JM, Lohse D, Yuvaniyama J, Saper MA, Dixon JE** (1996) Structure and function of protein tyrosine phosphatases. *FASEB J* **10**: A968

**Denu JM, Tanner KG** (1998) Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: Evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* **37**: 5633-5642

**Derkx MPM, Karssen CM** (1993) Effects of light and temperature on seed dormancy and gibberellin-stimulated germination in *Arabidopsis thaliana*. Studies with gibberellin-deficient and gibberellin insensitive mutants. *Physiol Plant* **89**: 360-368

**Dill A, Jung HS, Sun TP** (2001) The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 14162-14167

**Dill A, Sun TP** (2001) Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **159**: 777-785

**Ding CK, Wang CY, Gross KC, Smith DL** (2002) Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. *Planta* **214**: 895-901

**Divecha N, Irvine RF** (1995) Phospholipid signaling. *Cell* **80**: 269-278

**Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW** (1988) High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**: 6127-6145

**Drazic G, Mihailovic N** (2005) Modification of cadmium toxicity in soybean seedlings by salicylic acid. *Plant Sci* **168**: 511-517

**Dreher K, Callis J** (2007) Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. *Ann Bot* **99**: 787-822

**Durand M, Thevenot C, Come D** (1975) Role of cotyledons in germination and dormancy breaking of apple embryonic axis, after treatment with abscisic acid. *Physiol Veg* **13**: 603-610

**Durfee T, Becherer K, Chen PL, Yeh SH, Yang YZ, Kilburn AE, Lee WH, Elledge SJ** (1993) The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type-1 catalytic subunit. *Genes Dev* **7**: 555-569

**Durgbanshi A, Arbona V, Pozo O, Miersch O, Sancho JV, Gómez-Cadenas A** (2005) Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* **53**: 8437-8442

**Dyer WE** (1993) Dormancy associated embryonic messenger-RNAs and proteins in imbibing *Avena fatua* caryopses. *Physiol Plant* **88**: 201-211

**Edwards M, Dea ICM, Bulpin PV, Reid JSG** (1985) Xyloglucan (amyloid) mobilization in the cotyledons of *Tropaeolum majus* L seeds following germination. *Planta* **163**: 133-140

- Einali AR, Sadeghipour HR** (2007) Alleviation of dormancy in walnut kernels by moist chilling is independent from storage protein mobilization. *Tree Physiol* **27**: 519-525
- Elion EA** (2000) Pheromone response, mating and cell biology. *Curr Opin Microbiol* **3**: 573-581
- Elion EA** (2001) The Ste5p scaffold. *J Cell Sci* **114**: 3967-3978
- El-Tayeb MA** (2005) Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. *Plant Growth Reg* **45**: 215-224
- El-Tayeb MA, El-Enany AE, Ahmed NL** (2006) Salicylic acid-induced adaptive response to copper stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Growth Reg* **50**: 191-199
- Esser JE, Liao YJ, Schroeder JI** (1997) Characterization of ion channel modulator effects on ABA- and malate-induced stomatal movements: strong regulation by kinase and phosphatase inhibitors, and relative insensitivity to mastoparans. *J Exp Bot* **48**: 539-550
- 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**: 630-639
- Feurtado JA, Kermode AR** (2007) A merger of paths: abscisic acid and hormonal cross-talk in the control of seed dormancy maintenance and alleviation. In KJ Bradford, H Nonogaki, eds, *Seed Development, Dormancy and Germination*. Blackwell, Oxford, pp 176-223
- Feys BJ, Parker JE** (2000) Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends Genet* **16**: 449-455
- 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
- Finkelstein RR, Gampala SSL, Rock CD** (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* **14**: S15-S45
- Finkelstein RR, Reeves W, Ariizumi T, Steber C** (2008) Molecular aspects of seed dormancy. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 387-415
- Fleet CM, Sun TP** (2005) A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 77-85
- Flematti GR, Ghisalberti EL, Dixon KW, Trengove RD** (2004) A compound from smoke that promotes seed germination. *Science* **305**: 977-977
- Foley ME** (2001) Seed dormancy: an update on terminology, physiological genetics, and quantitative trait loci regulating germinability. *Weed Sci* **49**: 305-317

**Fordham-Skelton AP, Chilley P, Lumbreras V, Reignoux S, Fenton TR, Dahm CC, Pages M, Gatehouse JA** (2002) A novel higher plant protein tyrosine phosphatase interacts with SNF1-related protein kinases via a KIS (kinase interaction sequence) domain. *Plant J* **29**: 705-715

**Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JDG, Davies JM, Dolan L** (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* **422**: 442-446

**Forouhar F, Yang Y, Kumar D, Chen Y, Fridman E, Park SW, Chiang Y, Acton TB, Montelione GT, Pichersky E, Klessig DF, Tong L** (2005) Structural and biochemical studies identify tobacco SABP2 as a methyl salicylate esterase and implicate it in plant innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 1773-1778

**Fu XD, Harberd NP** (2003) Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature* **421**: 740-743

**Fujii H, Verslues PE, Zhu JK** (2007) Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 485-494

**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**: 1988-1993

**Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryals J** (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* **261**: 754-756

**Gampala SSL, Hagenbeek D, Rock CD** (2001) Functional interactions of lanthanum and phospholipase D with the abscisic acid signaling effectors VP1 and ABI1-1 in rice protoplasts. *J Biol Chem* **276**: 9855-9860

**García-Garrido JM, Fanio J, Delseny M, Martínez-Izquierdo JA** (1996) The ABRE-like or coupling-like ACGCGTGG element of the rice *Lpr2* promoter is necessary for ABA response. Workshop on Abscisic Acid Signal Transduction. Instituto Juan March de Estudios e Investigaciones, Madrid

**Ghassemian M, Nambara E, Cutler S, Kawaide H, Kamiya Y, McCourt P** (2000) Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**: 1117-1126

**Ghelis T, Bolbach G, Clodic G, Habricot Y, Miginiac E, Sotta B, Jeannette E** (2008) Protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases are involved in abscisic acid-dependent processes in *Arabidopsis* seeds and suspension cells. *Plant Physiol* **148**: 1668-1680

**Gietz D, Stjean A, Woods RA, Schiestl RH** (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* **20**: 1425-1425

**Gilroy S, Read ND, Trewavas AJ** (1990) Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol trisphosphate initiates stomatal closure. *Nature* **346**: 769-771

**Giraudat J, Hauge BM, Valon C, Smalle J, Parcy F, Goodman HM** (1992) Isolation of the *Arabidopsis* *ABI3* gene by positional cloning. *Plant Cell* **4**: 1251-1261

- Goldberg RB, Depaiva G, Yadegari R** (1994) Plant embryogenesis. Zygote to seed. *Science* **266**: 605-614
- Gómez-Cadenas A, Verhey SD, Holappa LD, Shen QX, Ho THD, Walker-Simmons MK** (1999) An abscisic acid-induced protein kinase, PKABA1, mediates abscisic acid-suppressed gene expression in barley aleurone layers. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 1767-1772
- Gómez-Cadenas A, Zentella R, Walker-Simmons MK, Ho THD** (2001) Gibberellin/abscisic acid antagonism in barley aleurone cells. Site of action of the protein kinase PKABA1 in relation to gibberellin signaling molecules. *Plant Cell* **13**: 667-679
- Gómez-Cadenas A, Pozo OJ, García-Agustín P, Sancho JV** (2002) Direct analysis of abscisic acid in crude plant extracts by liquid chromatography-electrospray. *Phytochem Anal* **13**: 228-234
- Gong DM, Zhang CQ, Chen XY, Gong ZZ, Zhu JK** (2002) Constitutive activation and transgenic evaluation of the function of an Arabidopsis PKS protein kinase. *J Biol Chem* **277**: 42088-42096
- González-García MP** (2003) Proteín-fosfatasa implicadas en la señalización de giberelinas y ácido abscísico y relacionadas con la dormición/germinación de semillas de haya. Análisis funcional en Arabidopsis. PhD thesis. Universidad de Salamanca,
- 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, Belles JM, Barrero JM, Piqueras P, Ponce MR, Micol JL, Serrano R, Rodríguez PL** (2002) The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. *Plant Cell* **14**: 1833-1846
- Gosti F, Beaudoin N, Serizet C, Webb AAR, Vartanian N, Giraudat J** (1999) ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell* **11**: 1897-1909
- Grabov A, Leung J, Giraudat J, Blatt MR** (1997) Alteration of anion channel kinetics in wild-type and *abi1-1* transgenic *Nicotiana benthamiana* guard cells by abscisic acid. *Plant J* **12**: 203-213
- Granot-Attas S, Luxenburg C, Elson A** (2008) Positive regulation of osteoclast-mediated bone resorption and podosome organization by protein tyrosine phosphatase epsilon. *FEBS J* **275**: 449-449
- 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**: 279-285
- Griffiths J, Murase K, Rieu I, Zentella R, Zhang ZL, Powers SJ, Gong F, Phillips AL, Hedden P, Sun TP, Thomas SG** (2006) Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 3399-3414
- Gu XY, Kianian SF, Foley ME** (2004) Multiple loci and epistases control genetic variation for seed dormancy in weedy rice (*Oryza sativa*). *Genetics* **166**: 1503-1516

**Guan KL** (1994) The mitogen activated protein kinase signal transduction pathway. From the cell surface to the nucleus. *Cell Signal* **6**: 581-589

**Guan LQ, Scandalios JG** (1995) Developmentally related responses of maize catalase genes to salicylic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 5930-5934

**Gubler F, Millar AA, Jacobsen JV** (2005) Dormancy release, ABA and pre-harvest sprouting. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 183-187

**Gubler F, Hughes T, Waterhouse P, Jacobsen J** (2008) Regulation of dormancy in barley by blue light and after-ripening: Effects on abscisic acid and gibberellin metabolism. *Plant Physiol* **147**: 886-896

**Gunes A, Inal A, Alpaslan M, Eraslan F, Bagci EG, Cicek N** (2007) Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *J Plant Physiol* **164**: 728-736

**Guo YL, Roux SJ** (1996) Partial purification and characterization of a type 1 protein phosphatase in purified nuclei of pea plumules. *Biochem J* **319**: 985-991

**Gupta R, Huang YF, Kieber J, Luan S** (1998) Identification of a dual-specificity protein phosphatase that inactivates a MAP kinase from *Arabidopsis*. *Plant J* **16**: 581-589

**Gutiérrez L, Van Wuytswinkel O, Castelain M, Bellini C** (2007) Combined networks regulating seed maturation. *Trends Plant Sci* **12**: 294-300

**Halim VA, Vess A, Scheel D, Rosahl S** (2006) The role of salicylic acid and jasmonic acid in pathogen defence. *Plant Biol* **8**: 307-313

**Hamada AM, Al-Hakimi AMA** (2001) Salicylic acid versus salinity-drought-induced stress on wheat seedlings. *Rostl Vyroba* **47**: 444-450

**Han DH** (1996) Effects of ABA and ethephon treatments on coloration and fruit quality in Kyoho grape. *J Kor Soc Hort Sci* **57**: 416-420

**Hanahan D** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580

**Hara M, Oki K, Hoshino K, Kuboi T** (2003) Enhancement of anthocyanin biosynthesis by sugar in radish (*Raphanus sativus*) hypocotyl. *Plant Sci* **164**: 259-265

**Hayat S, Fariduddin Q, Ali B, Ahmad A** (2005) Effect of salicylic acid on growth and enzyme activities of wheat seedlings. *Acta Agron Hung* **53**: 433-437

**Heckman NL, Horst GL, Gaussoin RE, Tavener BT** (2002) Trinexapac-ethyl influence on cell membrane thermostability of Kentucky bluegrass leaf tissue. *Sci Hort* **92**: 183-186

**Henmi K, Iwabuchi M, Ogawa K** (2007) AtPTP1, a protein tyrosine phosphatase, is involved in the ABA signaling pathway of the seed germination. *Plant Cell Physiol* **48**: S43-S43

- Herzog M, Dorne AM, Grellet F** (1995) *GASA*, a gibberellin-regulated gene family from *Arabidopsis thaliana* related to the tomato *GAST1* gene. *Plant Mol Biol* **27**: 743-752
- Hey SJ, Bacon A, Burnett E, Neill SJ** (1997) Abscisic acid signal transduction in epidermal cells of *Pisum sativum* L *Argenteum*: Both dehydrin mRNA accumulation and stomatal responses require protein phosphorylation and dephosphorylation. *Planta* **202**: 85-92
- Hilhorst HWM** (1990a) Dose response analysis of factors involved in germination and secondary dormancy of seeds of *Sisymbrium officinale*. 1. Phytochrome. *Plant Physiol* **94**: 1090-1095
- Hilhorst HWM** (1990b) Dose response analysis of factors involved in germination and secondary dormancy of seeds of *Sisymbrium officinale*. 2. Nitrate. *Plant Physiol* **94**: 1096-1102
- Hilhorst HWM** (1995) A critical update on seed dormancy. 1. Primary dormancy. *Seed Sci Res* **5**: 61-73
- Hilhorst HWM, Karssen CM** (1992) Seed dormancy and germination. The role of abscisic acid and gibberellins and the importance of hormone mutants. *Plant Growth Reg* **11**: 225-238
- Himmelbach A, Hoffmann T, Leube M, Hohener B, Grill E** (2002) Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in *Arabidopsis*. *EMBO J* **21**: 3029-3038
- Hirayama T, Shinozaki K** (2007) Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends Plant Sci* **12**: 343-351
- Holappa LD, Walker-Simmons MK** (1995) The wheat abscisic acid-responsive protein-kinase messenger-RNA, PKABA1, is up-regulated by dehydration, cold temperature, and osmotic stress. *Plant Physiol* **108**: 1203-1210
- Holappa LD, Walker-Simmons MK** (1997) The wheat protein kinase gene, TaPK3, of the PKABA1 subfamily is differentially regulated in greening wheat seedlings. *Plant Mol Biol* **33**: 935-941
- Holdsworth MJ, Bentsink L, Soppe WJJ** (2008) Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytol* **179**: 33-54
- Hong SW, Vierling E** (2000) Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 4392-4397
- Horvath B, Heidstra R, Lados M, Moerman M, Spaink HP, Prome JC, Vankammen A, Bisseling T** (1993) Lipooligosaccharides of *Rhizobium* induce infection-related early nodulin gene expression in pea root hairs. *Plant J* **4**: 727-733
- Horvath E, Janda T, Szalai G, Paldi E** (2002) In vitro salicylic acid inhibition of catalase activity in maize: differences between the isozymes and a possible role in the induction of chilling tolerance. *Plant Sci* **163**: 1129-1135

**Horvath E, Szalai G, Janda T** (2007) Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *J Plant Growth Regul* **26**: 290-300

**Huang HJ, Lin YM, Huang DD, Takahashi T, Sugiyama M** (2003) Protein tyrosine phosphorylation during phytohormone-stimulated cell proliferation in *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant Cell Physiol* **44**: 770-775

**Huang YF, Li H, Gupta R, Morris PC, Luan S, Kieber JJ** (2000) ATMPK4, an *Arabidopsis* homolog of mitogen-activated protein kinase, is activated in vitro by AtMEK1 through threonine phosphorylation. *Plant Physiol* **122**: 1301-1310

**Hunter T** (1998) Anti-phosphatases take the stage. *Nat Genet* **18**: 303-305

**Huse M, Kuriyan J** (2002) The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* **109**: 275-282

**Ikedo A, Ueguchi-Tanaka M, Sonoda Y, Kitano H, Koshioka M, Futsuhara Y, Matsuoka M, Yamaguchi J** (2001) Slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the SLR1 gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT. *Plant Cell* **13**: 999-1010

**Inoue H, Nojima H, Okayama H** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28

**Irar S, Oliveira E, Pages M, Goday A** (2006) Towards the identification of late-embryonic-abundant phosphoproteome in *Arabidopsis* by 2-DE and MS. *Proteomics* **6**: S175-S185

**Itoh H, Sasaki A, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama K, Kobayashi M, Hasegawa Y, Minami E, Ashikari M, Matsuoka M** (2005) Dissection of the phosphorylation of rice DELLA protein, SLENDER RICE1. *Plant Cell Physiol* **46**: 1392-1399

**Jacobsen JV, Pearce DW, Poole AT, Pharis RP, Mander LN** (2002) Abscisic acid, phaseic acid and gibberellin contents associated with dormancy and germination in barley. *Physiol Plant* **115**: 428-441

**Jacoby T, Flanagan H, Faykin A, Seto AG, Mattison C, Ota I** (1997) Two protein-tyrosine phosphatases inactivate the osmotic stress response pathway in yeast by targeting the mitogen-activated protein kinase, Hog1. *J Biol Chem* **272**: 17749-17755

**Janda T, Szalai G, Antunovics Z, Horvath E, Paldi E** (2000) Effect of benzoic acid and aspirin on chilling tolerance and photosynthesis in young maize plants. *Maydica* **45**: 29-33

**Janda T, Szalai G, Tari I, Paldi E** (1999) Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta* **208**: 175-180

**Janssens V, Goris J** (2001) Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases. *Biochem J* **353**: 417-439

**Jeannette E, Rona JP, Bardat F, Cornel D, Sotta B, Miginiac E** (1999) Induction of *RAB18* gene expression and activation of K<sup>+</sup> outward rectifying channels depend on an extracellular perception of ABA in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Plant J* **18**: 13-22

- Jia ZC, Barford D, Flint AJ, Tonks NK** (1995) Structural basis for phosphotyrosine peptide recognition by protein tyrosine phosphatase 1B. *Science* **268**: 1754-1758
- Jiménez JA, Rodríguez D, Lorenzo O, Nicolás G, Nicolás C** (2006) Characterization of a protein kinase (FsPK4) with an acidic domain, regulated by abscisic acid and specifically located in *Fagus sylvatica* L. seeds. *J Plant Physiol* **163**: 761-769
- Johnson LN, O'Reilly M** (1996) Control by phosphorylation. *Curr Opin Struct Biol* **6**: 762-769
- Johnson RR, Wagner RL, Verhey SD, Walker-Simmons MK** (2002) The abscisic acid-responsive kinase PKABA1 interacts with a seed-specific abscisic acid response element-binding factor, TaABF, and phosphorylates TaABF peptide sequences. *Plant Physiol* **130**: 837-846
- Jones HD, Peters NCB, Holdsworth MJ** (1997) Genotype and environment interact to central dormancy and differential expression of the VIVIPAROUS 1 homologue in embryos of *Avena fatua*. *Plant J* **12**: 911-920
- Kagaya Y, Toyoshima R, Okuda R, Usui H, Yamamoto A, Hattori T** (2005) LEAFY COTYLEDON1 controls seed storage protein genes through its regulation of FUSCA3 and ABSCISIC ACID INSENSITIVE3. *Plant Cell Physiol* **46**: 399-406
- Kameyama K, Kishi Y, Yoshimura M, Kanzawa N, Sameshima M, Tsuchiya T** (2000) Tyrosine phosphorylation in plant bending. Puckering in a ticklish plant is controlled by dephosphorylation of its actin. *Nature* **407**: 37-37
- Kang HM, Saltveit ME** (2002) Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling leaves and roots are differentially affected by salicylic acid. *Physiol Plant* **115**: 571-576
- Karssen CM** (1968) Light promoted germination of seeds of *Chenopodium album* L. 2. Effects of (Rs) abscisic acid. *Acta Bot Neerl* **17**: 293-298
- Karssen CM** (1982) Indirect effect of abscisic acid on the induction of secondary dormancy in lettuce seeds. *Physiol Plant* **54**: 258-266
- Karssen CM, Lacka E** (1986) A revision of the hormone balance theory of seed dormancy: studies on gibberellin and/or abscisic acid deficient mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Substances*. Springer, Heidelberg, pp 315-323
- Karssen CM, Zagorski S, Kepczynski J, Groot SPC** (1989) Key role for endogenous gibberellins in the control of seed germination. *Ann Bot* **63**: 71-80
- Katagiri T, Ishiyama K, Kato T, Tabata S, Kobayashi M, Shinozaki K** (2005) An important role of phosphatidic acid in ABA signaling during germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **43**: 107-117
- Kepczynski J, Kepczynska E** (1997) Ethylene in seed dormancy and germination. *Physiol Plant* **101**: 720-726

**Kerk D, Templeton G, Moorhead GBG** (2008) Evolutionary radiation pattern of novel protein phosphatases revealed by analysis of protein data from the completely sequenced genomes of humans, green algae, and higher plants. *Plant Physiol* **146**: 351-367

**Kermode AR** (1990) Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Crit Rev Plant Sci* **9**: 155-195

**Kermode AR** (2005) Role of abscisic acid in seed dormancy. *J Plant Growth Reg* **24**: 319-344

**Kim SG, Lee AK, Yoon HK, Park CM** (2008) A membrane-bound NAC transcription factor NTL8 regulates gibberellic acid-mediated salt signaling in *Arabidopsis* seed germination. *Plant J* **55**: 77-88

**King KE, Moritz T, Harberd NP** (2001) Gibberellins are not required for normal stem growth in *Arabidopsis thaliana* in the absence of GAI and RGA. *Genetics* **159**: 767-776

**Klein TM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC** (1987) High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* **327**: 70-73

**Klessig DF, Kumar D, Navarre DA, Zhou JM, Shah J, Durner J, Zhant SQ, Wendehenne D, Kachroo P, Trifa Y, Silva H, Pontier D, Lam E, Noad R** (2000) Salicylic acid- and nitric oxide-mediated signal transduction in plant disease resistance. *Biology of Plant-Microbe Interactions*, Vol 2 13-18.

**Knetsch MLW, Wang M, Snaar-Jagalska BE, Heimovaara-Dijkstra S** (1996) Abscisic acid induces mitogen-activated protein kinase activation in barley aleurone protoplasts. *Plant Cell* **8**: 1061-1067

**Ko CB, Woo YM, Lee DJ, Lee MC, Kim CS** (2007) Enhanced tolerance to heat stress in transgenic plants expressing the *GASA4* gene. *Plant Physiol Biochem* **45**: 722-728

**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**: 939-949

**Kogel KH, Langen G** (2005) Induced disease resistance and gene expression in cereals. *Cell Microbiol* **7**: 1555-1564

**Kohler B, Blatt MR** (2002) Protein phosphorylation activates the guard cell  $Ca^{2+}$  channel and is a prerequisite for gating by abscisic acid. *Plant J* **32**: 185-194

**Konno H, Tsumuki H** (1993) Purification of a  $\beta$ -galactosidase from rice shoots and its involvement in hydrolysis of the natural substrate in cell walls. *Physiol Plant* **89**: 40-47

**Koo YJ, Kim MA, Kim EH, Song JT, Jung C, Moon JK, Kim JH, Seo HS, Song SI, Kim JK, Lee JS, Cheong JJ, Do Choi Y** (2007) Overexpression of salicylic acid carboxyl methyltransferase reduces salicylic acid-mediated pathogen resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **64**: 1-15

**Koornneef M, Bentsink L, Hilhorst H** (2002) Seed dormancy and germination. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 33-36

- Koornneef M, Hanhart CJ, Hilhorst HWM, Karssen CM** (1989) In vivo inhibition of seed development and reserve protein accumulation in recombinants of abscisic acid biosynthesis and responsiveness mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **90**: 463-469
- Koornneef M, Karssen CM** (1994) Seed dormancy and germination. In CR Somerville, EM Meyerowitz, eds, *Arabidopsis*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, pp 313-334
- Kotilainen M, Helariutta Y, Mehto M, Pollanen E, Albert VA, Elomaa P, Teeri TH** (1999) *GEG* participates in the regulation of cell and organ shape during corolla and carpel development in *Gerbera hybrida*. *Plant Cell* **11**: 1093-1104
- Krantev A, Yordanova R, Janda T, Szalai G, Popova L** (2008) Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. *J Plant Physiol* **165**: 920-931
- Krishna P** (2003) Brassinosteroid-mediated stress responses. *J Plant Growth Reg* **22**: 289-297
- Kristl J, Veber M, Krajncic B, Oresnik K, Slekovec M** (2005) Determination of jasmonic acid in *Lemna minor* (L.) by liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Bioanal Chem* **383**: 886-893
- 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
- Kroj T, Savino G, Valon C, Giraudat J, Parcy F** (2003) Regulation of storage protein gene expression in *Arabidopsis*. *Development* **130**: 6065-6073
- Kucera B, Cohn MA, Leubner-Metzger G** (2005) Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Sci Res* **15**: 281-307
- Kudla J, Xu Q, Harter K, Gruissem W, Luan S** (1999) Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 4718-4723
- Kuhn JM, Schroeder JI** (2003) Impacts of altered RNA metabolism on abscisic acid signaling. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 463-469
- Kumar D, Klessig DF** (2003) High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 16101-16106
- Kunkel BN, Brooks DM** (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 325-331
- Kuo AL, Cappelluti S, CervantesCervantes M, Rodríguez M, Bush DS** (1996) Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, blocks calcium changes, gene expression, and cell death induced by gibberellin in wheat aleurone cells. *Plant Cell* **8**: 259-269
- Kushiro T, Okamoto M, Nakabayashi K, Yamagishi K, Kitamura S, Asami T, Hirai N, Koshihara T, Kamiya Y, Nambara E** (2004) The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *EMBO J* **23**: 1647-1656

**Kusumi K, Yaeno T, Kojo K, Hirayama M, Hirokawa D, Yara A, Iba K** (2006) The role of salicylic acid in the glutathione-mediated protection against photooxidative stress in rice. *Physiol Plant* **128**: 651-661

**Kwak JM, Moon JH, Murata Y, Kuchitsu K, Leonhardt N, DeLong A, Schroeder JI** (2002) Disruption of a guard cell-expressed protein phosphatase 2A regulatory subunit, RCN1, confers abscisic acid insensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**: 2849-2861

**Laby RJ, Kincaid MS, Kim DG, 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 assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

**Laibach F** (1956) Über die brechung der samenruhe bei *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. *Naturwissenschaften* **43**: 164-164

**Lang V, Palva ET** (1992) The expression of a RAB-related gene, *RAB18*, is induced by abscisic acid during the cold acclimation process of *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. *Plant Mol Biol* **20**: 951-962

**Larkindale J, Hall JD, Knight MR, Vierling E** (2005) Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiol* **138**: 882-897

**Larkindale J, Knight MR** (2002) Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiol* **128**: 682-695

**Lea US, Slimestad R, Smedvig P, Lillo C** (2007) Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway. *Planta* **225**: 1245-1253

**Lee SH, Lee MH, Chung WI, Liu JR** (1998) WAPK, a Ser/Thr protein kinase gene of *Nicotiana tabacum*, is uniquely regulated by wounding, abscisic acid and methyl jasmonate. *Mol Gen Genet* **259**: 516-522

**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**: 309-319

**Leonhardt N, Kwak JM, Robert N, Waner D, Leonhardt G, Schroeder JI** (2004) Microarray expression analyses of *Arabidopsis* guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. *Plant Cell* **16**: 596-615

**Leon-Kloosterziel KM, Van de Bunt GA, Zeevaart JAD, Koornneef M** (1996) *Arabidopsis* mutants with a reduced seed dormancy. *Plant Physiol* **110**: 233-240

**Le Page-Degivry MT** (1973a) Study of embryo dormancy of *Taxus baccata* L by embryo culture. *Biol Plant* **15**: 264-269

- Le Page-Degivry MT** (1973b) Embryo dormancy in *Taxus baccata*. Influence of composition of liquid medium on induction of germination. *Physiol Plant* **29**: 204-207
- Le Page-Degivry MT, Garello G** (1992) In situ abscisic acid synthesis. A requirement for induction of embryo dormancy in *Helianthus annuus*. *Plant Physiol* **98**: 1386-1390
- Le Page-Degivry MT, Garello G, Barthe P** (1997) Changes in abscisic acid biosynthesis and catabolism during dormancy breaking in *Fagus sylvatica* embryo. *J Plant Growth Reg* **16**: 57-61
- Leubner-Metzger G** (2001) Brassinosteroids and gibberellins promote tobacco seed germination by distinct pathways. *Planta* **213**: 758-763
- Leung J, Giraudat J** (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 199-222
- Lewis TS, Hunt JB, Aveline LD, Jonscher KR, Louie DF, Yeh JM, Nahreini TS, Resing KA, Ahn NG** (2000) Identification of novel MAP kinase pathway signaling targets by functional proteomics and mass spectrometry. *Mol Cell* **6**: 1343-1354
- Li C, Ni P, Francki M, Hunter A, Zhang Y, Schibeci D, Li H, Tarr A, Wang J, Cakir M, Yu J, Bellgard M, Lance R, Appels R** (2004) Genes controlling seed dormancy and pre-harvest sprouting in a rice-wheat-barley comparison. *Funct Integr Genomic* **4**: 84-93
- Lin PC, Hwang SG, Endo A, Okamoto M, Koshiba T, Cheng WH** (2007) Ectopic expression of ABSCISIC ACID 2/GLUCOSE INSENSITIVE 1 in *Arabidopsis* promotes seed dormancy and stress tolerance. *Plant Physiol* **143**: 745-758
- Liscovitch M, Czarny M, Fiucci G, Tang XQ** (2000) Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochem J* **345**: 401-415
- Liu HT, Liu YY, Pan QH, Yang HR, Zhan JC, Huang WD** (2006) Novel interrelationship between salicylic acid, abscisic acid, and PIP2-specific phospholipase C in heat acclimation-induced thermotolerance in pea leaves. *J Exp Bot* **57**: 3337-3347
- Liu XG, Yue YL, Li B, Nie YL, Li W, Wu WH, Ma LG** (2007) A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science* **315**: 1712-1716
- López-Molina L, Mongrand S, Chua NH** (2001) A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 4782-4787
- Lorenzo O, Nicolás C, Nicolás G, Rodríguez D** (2003) Characterization of a dual plant protein kinase (FsPK1) up-regulated by abscisic acid and calcium and specifically expressed in dormant seeds of *Fagus sylvatica* L. *Seed Sci Res* **13**: 261-271
- Lorenzo O, Rodríguez D, Nicolás C, Nicolás G** (2000) Characterization and expression of two protein kinase genes and an EIN3-like gene, which are regulated by ABA and GA<sub>3</sub> in dormant *Fagus sylvatica* seeds.

In M Black, KJ Bradford, J Vázquez-Ramos, eds, Seed Biology: Advances and Applications CABI Publishing, Oxon, UK, pp 329-340.

**Loreti E, Povero G, Novi G, Solfanelli C, Alpi A, Perata P** (2008) Gibberellins, jasmonate and abscisic acid modulate the sucrose-induced expression of anthocyanin biosynthetic genes in *Arabidopsis*. *New Phytol* **179**: 1004-1016

**Lotan T, Ohto M, Yee KM, West MAL, Lo R, Kwong RW, Yamagishi K, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ** (1998) *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* **93**: 1195-1205

**Lu C, Han MH, Guevara-Garcia A, Fedoroff NV** (2002) Mitogen-activated protein kinase signaling in postgermination arrest of development by abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 15812-15817

**Luan S** (2003) Protein phosphatases in plants. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 63-92

**Luerssen K, Kirik V, Herrmann P, Misera S** (1998) FUSCA3 encodes a protein with a conserved VP1. *Plant J* **15**: 755-764

**Luo JH, Shen GX, Yan JQ, He CX, Zhang H** (2006) AtCHIP functions as an E3 ubiquitin ligase of protein phosphatase 2A subunits and alters plant response to abscisic acid treatment. *Plant J* **46**: 649-657

**MacRobbie EAC** (2002) Evidence for a role for protein tyrosine phosphatase in the control of ion release from the guard cell vacuole in stomatal closure. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 11963-11968

**Magome H, Yamaguchi S, Hanada A, Kamiya Y, Oda K** (2004) dwarf and delayed-flowering 1, a novel *Arabidopsis* mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor. *Plant J* **37**: 720-729

**Malamy J, Carr JP, Klessig DF, Raskin I** (1990) Salicylic acid. A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* **250**: 1002-1004

**Mansour SJ, Matten WT, Hermann AS, Candia JM, Rong S, Fukasawa K, Vandewoude GF, Ahn NG** (1994) Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* **265**: 966-970

**McCourt P, Creelman R** (2008) The ABA receptors. We report you decide. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 474-478

**Meinhard M, Rodríguez PL, Grill E** (2002) The sensitivity of AB12 to hydrogen peroxide links the abscisic acid-response regulator to redox signalling. *Planta* **214**: 775-782

**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 USA* **95**: 1938-1943

- Metraux JP, Signer H, Ryals J, Ward E, Wyssbenz M, Gaudin J, Raschdorf K, Schmid E, Blum W, Inverardi B** (1990) Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in Cucumber. *Science* **250**: 1004-1006
- Metwally A, Finkerneier I, Georgi M, Dietz KJ** (2003) Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiol* **132**: 272-281
- Meyer K, Leube MP, Grill E** (1994) A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **264**: 1452-1455
- Miao YC, Lv D, Wang PC, Wang XC, Chen J, Miao C, Song CP** (2006) An *Arabidopsis* glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses. *Plant Cell* **18**: 2749-2766
- Miedema H, Assmann SM** (1996) A membrane-delimited effect of internal pH on the K<sup>+</sup> outward rectifier of *Vicia faba* guard cells. *J Membr Biol* **154**: 227-237
- Millar AA, Jacobsen JV, 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**: 942-954
- Mishra A, Choudhuri MA** (1997) Ameliorating effects of salicylic acid on lead and mercury induced inhibition of germination and early seedling growth of two rice cultivars. *Seed Sci Technol* **25**: 263-270
- Mitchum MG, Yamaguchi S, Hanada A, Kuwahara A, Yoshioka Y, Kato T, Tabata S, Kamiya Y, Sun TP** (2006) Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in *Arabidopsis* development. *Plant J* **45**: 804-818
- Monroe-Augustus M, Zolman BK, Bartel B** (2003) IBR5, a dual-specificity phosphatase-like protein modulating auxin and abscisic acid responsiveness in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**: 2979-2991
- Mori K, Saito H, Goto-Yamamoto N, Kitayama M, Kobayashi S, Sugaya S, Gemma H, Hashizume K** (2005) Effects of abscisic acid treatment and night temperatures on anthocyanin composition in Pinot noir grapes. *Vitis* **44**: 161-165
- Mortensen LC, Rodríguez D, Nicolás G, Eriksen EN, Nicolás C** (2004) Decline in a seed-specific abscisic acid-responsive glycinerich protein (GRPF1) mRNA may reflect the release of seed dormancy in *Fagus sylvatica* during moist prechilling. *Seed Sci Res* **14**: 27-34
- Munnik T** (2001) Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends Plant Sci* **6**: 227-233
- Mur LAJ, Kenton P, Atzorn R, Miersch O, Wasternack C** (2006) The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol* **140**: 249-262
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-497

**Murphy AM, Holcombe LJ, Carr JP** (2000) Characteristics of salicylic acid-induced delay in disease caused by a necrotrophic fungal pathogen in tobacco. *Physiol Mol Plant Pathol* **57**: 47-54

**Nambara E, Marion-Poll A** (2003) ABA action and interactions in seeds. *Trends Plant Sci* **8**: 213-217

**Nakamura S, Komatsuda T, Miura H** (2007) Mapping diploid wheat homologues of *Arabidopsis* seed ABA signaling genes and QTLs for seed dormancy. *Theor Appl Genet* **114**: 1129-1139

**Nakamura S, Toyama T** (2001) Isolation of a VP1 homologue from wheat and analysis of its expression in embryos of dormant and non-dormant cultivars. *J Exp Bot* **52**: 875-876

**Navarro L, Bari R, Achard P, Lison P, Nemri A, Harberd NP, Jones JDG** (2008) DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr Biol* **18**: 650-655

**Nemeth M, Janda T, Horvath E, Paldi E, Szalai G** (2002) Exogenous salicylic acid increases polyamine content but may decrease drought tolerance in maize. *Plant Sci* **162**: 569-574

**Nicolás C, Nicolás G, Rodríguez D** (1996) Antagonistic effects of abscisic acid and gibberellic acid on the breaking of dormancy of *Fagus sylvatica* seeds. *Physiol Plant* **96**: 244-250

**Nicolás C, Nicolás G, Rodríguez D** (1998) Transcripts of a gene, encoding a small GTP-binding protein from *Fagus sylvatica*, are induced by ABA and accumulated in the embryonic axis of dormant seeds. *Plant Mol Biol* **36**: 487-491

**Nicolás C, Rodríguez D, Poulsen F, Eriksen EN, Nicolás G** (1997) The expression of an abscisic acid-responsive glycine-rich protein coincides with the level of seed dormancy in *Fagus sylvatica*. *Plant Cell Physiol* **38**: 1303-1310

**Nishimura N, Kitahata N, Seki M, Narusaka Y, Narusaka M, Kuromori T, Asami T, Shinozaki K, Hirayama T** (2005) Analysis of *ABA Hypersensitive Germination2* revealed the pivotal functions of PARN in stress response in *Arabidopsis*. *Plant J* **44**: 972-984

**Niyogi KK** (1999) Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 333-359

**Nobuta K, Okrent RA, Stoutemyer M, Rodibaugh N, Kempema L, Wildermuth MC, Innes RW** (2007) The GH3 acyl adenylase family member PBS3 regulates salicylic acid-dependent defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **144**: 1144-1156

**Norman C, Howell KA, Millar AH, Whelan JM, Day DA** (2004) Salicylic acid is an uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport. *Plant Physiol* **134**: 492-501

**Oh E, Yamaguchi S, Hu JH, Yusuke J, Jung B, Paik I, Lee HS, Sun TP, 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**: 1192-1208

- Ohta M, Guo Y, Halfter U, Zhu JK** (2003) A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C ABI2. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 11771-11776
- 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<sup>-</sup>-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **141**: 97-107
- Pal M, Szalai G, Horvath E, Janda T, Paldi E** (2002) Effect of salicylic acid during heavy metal stress. *Acta Biologica Szegediensis* **46**: 119-120
- Pan QH, Zhan JC, Liu HT, Zhang JH, Chen JY, Wen PF, Huang WD** (2006) Salicylic acid synthesized by benzoic acid 2-hydroxylase participates in the development of thermotolerance in pea plants. *Plant Sci* **171**: 226-233
- Pandey S, Chen JG, Jones AM, Assmann SM** (2006) G-protein complex mutants are hypersensitive to abscisic acid regulation of germination and postgermination development. *Plant Physiol* **141**: 243-256
- Parcy F, Valon C, Raynal M, Gaubiercomella P, Delseny M, Giraudat J** (1994) Regulation of gene expression programs during *Arabidopsis* seed development. Roles of the ABI3 locus and of endogenous abscisic acid. *Plant Cell* **6**: 1567-1582
- Park YS, Hong SW, Oh SA, Kwak JM, Lee HH, Nam HG** (1993) 2 putative protein-kinases from *Arabidopsis thaliana* contain highly acidic domains. *Plant Mol Biol* **22**: 615-624
- Parker RE** (1989) Utilización de la chi-cuadrado. Estadística para biólogos. Omega, Barcelona
- Pawson T** (1995) Protein modules and signaling networks. *Nature* **373**: 573-580
- Peck SC** (2003) Early phosphorylation events in biotic stress. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 334-338
- Peeters AJM, Blankestijn-de Vries H, Hanhart CJ, Leon-Kloosterziel KM, Zeevaart JAD, Koornneef M** (2002) Characterization of mutants with reduced seed dormancy at two novel *rdo* loci and a further characterization of *rdo1* and *rdo2* in *Arabidopsis*. *Physiol Plant* **115**: 604-612
- Pei ZM, Kuchitsu K, Ward JM, Schwarz M, Schroeder JI** (1997) Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in *Arabidopsis* wild-type and *abi1* and *abi2* mutants. *Plant Cell* **9**: 409-423
- Pei ZM, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B, Allen GJ, Grill E, Schroeder JI** (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406**: 731-734
- Penfield S, Gilday AD, Halliday KJ, Graham IA** (2006) DELLA-mediated cotyledon expansion breaks coat-imposed seed dormancy. *Curr Biol* **16**: 2366-2370
- Peng JR, Richards DE, Moritz T, Caño-Delgado A, Harberd NP** (1999) Extragenic suppressors of the *Arabidopsis gai* mutation alter the dose-response relationship of diverse gibberellin responses. *Plant Physiol* **119**: 1199-1207

- 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**: 2729-2745
- Prada D, Ullrich SE, Molina-Cano JL, Cistue L, Clancy JA, Romagosa I** (2004) Genetic control of dormancy in a Triumph/Morex cross in barley. *Theor Appl Genet* **109**: 62-70
- Pysh LD, Wysocka-Diller JW, Camilleri C, Bouchez D, Benfey PN** (1999) The GRAS gene family in *Arabidopsis*: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant J* **18**: 111-119
- Quettier AL, Bertrand C, Habricot Y, Miginiac E, Agnes C, Jeannette E, Maldiney R** (2006) The *phs1-3* mutation in a putative dual-specificity protein tyrosine phosphatase gene provokes hypersensitive responses to abscisic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **47**: 711-719
- Rajjou L, Belghazi M, Huguet R, Robin C, Moreau A, Job C, Job D** (2006) Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on *Arabidopsis* seed germination and establishment of early defense mechanisms. *Plant Physiol* **141**: 910-923
- Ramanjulu S, Bartels D** (2002) Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell Environ* **25**: 141-151
- Raskin I** (1992) Role of salicylic acid in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **43**: 439-463
- Raskin I, Ehmann A, Melander WR, Meeuse BJD** (1987) Salicylic acid. A natural inducer of heat production in *Arum lilies*. *Science* **237**: 1601-1602
- Raventos D, Meier C, Mattsson O, Jensen AB, Mundy J** (2000) Fusion genetic analysis of gibberellin signaling mutants. *Plant J* **22**: 427-438
- Rayapureddi JP, Kattamuri C, Chan FH, Hegde RS** (2005) Characterization of a plant, tyrosine-specific phosphatase of the aspartyl class. *Biochemistry* **44**: 751-758
- Raz V, Bergervoet JHW, Koornneef M** (2001) Sequential steps for developmental arrest in *Arabidopsis* seeds. *Development* **128**: 243-252
- Razem FA, El-Kereamy A, Abrams SR, Hill RD** (2006) The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature* **439**: 290-294
- Ren CW, Kermode AR** (1999) Analyses to determine the role of the megagametophyte and other seed tissues in dormancy maintenance of yellow cedar (*Chamaecyparis nootkatensis*) seeds: morphological, cellular and physiological changes following moist chilling and during germination. *J Exp Bot* **50**: 1403-1419
- Reyes D, Rodríguez D, González-García MP, Lorenzo O, Nicolás G, García-Martínez JL, Nicolás C** (2006a) Overexpression of a protein phosphatase 2C from beech seeds in *Arabidopsis* shows phenotypes related to abscisic acid responses and gibberellin biosynthesis. *Plant Physiol* **141**: 1414-1424

- Reyes D, Rodríguez D, Lorenzo O, Nicolás G, Cañas R, Cantón FR, Cánovas FM, Nicolás C** (2006b) Immunolocalization of FSPK1 correlates this abscisic acid-induced protein kinase with germination arrest in *Fagus sylvatica* L. seeds. *J Exp Bot* **57**: 923-929
- Reyes D, Rodríguez D, Nicolás G, Nicolás C** (2006c) Evidence of a role for tyrosine dephosphorylation in the control of postgermination arrest of development by abscisic acid in *Arabidopsis thaliana* L. *Planta* **223**: 381-385
- Rhoads DM, McIntosh L** (1992) Salicylic acid regulation of respiration in higher plants. Alternative oxidase expression. *Plant Cell* **4**: 1131-1139
- Ritchie S, Gilroy S** (2000) Abscisic acid stimulation of phospholipase D in the barley aleurone is G-protein-mediated and localized to the plasma membrane. *Plant Physiol* **124**: 693-702
- Robert-Seilaniantz A, Navarro L, Bari R, Jones JD** (2007) Pathological hormone imbalances. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 372-379
- Robinette D, Matthysse AG** (1990) Inhibition by *Agrobacterium tumefaciens* and *Pseudomonas savastanoi* of development of the hypersensitive response elicited by *Pseudomonas syringae* Pv *Phaseolicola*. *J Bacteriol* **172**: 5742-5749
- Rock CD** (2000) Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytol* **148**: 357-396
- Rock CD, Quatrano RS** (1995) The role of hormones during seed development. In PJ Davies, ed, *Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 671-697
- Rodríguez AA, Grunberg KA, Taleisnik EL** (2002) Reactive oxygen species in the elongation zone of maize leaves are necessary for leaf extension. *Plant Physiol* **129**: 1627-1632
- Rodriguez PL, Leube MP, Grill E** (1998) Molecular cloning in *Arabidopsis thaliana* of a new protein phosphatase 2C (PP2C) with homology to ABI1 and ABI2. *Plant Mol Biol* **38**: 879-883
- Rosette C, Karin M** (1996) Ultraviolet light and osmotic stress: Activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science* **274**: 1194-1197
- Roxrud I, Lid SE, Fletcher JC, Schmidt EDL, Opsahl-Sorteberg HG** (2007) GASA4, one of the 14-member *Arabidopsis* GASA family of small polypeptides, regulates flowering and seed development. *Plant Cell Physiol* **48**: 471-483
- Saito S, Hirai N, Matsumoto C, Ohigashi H, Ohta D, Sakata K, Mizutani M** (2004) *Arabidopsis* CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant Physiol* **134**: 1439-1449
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T** (1998) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour, New York

**Sangwan V, Orvar BL, Beyerly J, Hirt H, Dhindsa RS** (2002) Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *Plant J* **31**: 629-638

**Sawada H, Shim IS, Usui K** (2006) Induction of benzoic acid 2-hydroxylase and salicylic acid biosynthesis. Modulation by salt stress in rice seedlings. *Plant Sci* **171**: 263-270

**Schmidt C, Schelle I, Liao YJ, Schroeder JI** (1995) Strong regulation of slow anion channels and abscisic acid signaling in guard cells by phosphorylation and dephosphorylation events. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 9535-9539

**Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waner D** (2001) Guard cell signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 627-658

**Segura A, Moreno M, Madueño F, Molina A, García-Olmedo F** (1999) Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Mol Plant Microbe In* **12**: 16-23

**Senaratna T, Touchell D, Bunn E, Dixon K** (2000) Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Reg* **30**: 157-161

**Seo M, Hanada A, Kuwahara A, Endo A, Okamoto M, Yamauchi Y, North H, Marion-Poll A, Sun T, Koshiba T, Kamiya Y, Yamaguchi S, Nambara E** (2006) Regulation of hormone metabolism in *Arabidopsis* seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. *Plant J* **48**: 354-366

**Seo PJ, Lee AK, Xiang FN, Park CM** (2008) Molecular and functional profiling of *Arabidopsis* pathogenesis-related genes: Insights into their roles in salt response of seed germination. *Plant Cell Physiol* **49**: 334-344

**Shah J** (2003) The salicylic acid loop in plant defense. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 365-371

**Shakirova FM, Sakhabutdinova AR, Bezrukova MV, Fatkhutdinova RA, Fatkhutdinova DR** (2003) Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Sci* **164**: 317-322

**Shen QX, Zhang PN, Ho THD** (1996) Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: Composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. *Plant Cell* **8**: 1107-1119

**Shen YY, Wang XF, Wu FQ, Du SY, Cao Z, Shang Y, Wang XL, Peng CC, Yu XC, Zhu SY, Fan RC, Xu YH, Zhang DP** (2006) The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* **443**: 823-826

**Shi LF, Gast RT, Gopalraj M, Olszewski NE** (1992) Characterization of a shoot specific, GA<sub>3</sub>-regulated and ABA-regulated gene from tomato. *Plant J* **2**: 153-159

**Shi Q, Bao Z, Zhu Z, Ying Q, Qian Q** (2006) Effects of different treatments of salicylic acid on heat tolerance, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzyme activity in seedlings of *Cucumis sativa* L. *Plant Growth Reg* **48**: 127-135

- Silverstone AL, Jung HS, Dill A, Kawaide H, Kamiya Y, Sun TP** (2001) Repressing a repressor: Gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 1555-1565
- Silverstone AL, Tseng TS, Swain SM, Dill A, Jeong SY, Olszewski NE, Sun TP** (2007) Functional analysis of SPINDLY in gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **143**: 987-1000
- Singh B, Usha K** (2003) Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. *Plant Growth Reg* **39**: 137-141
- Smith RD, Walker JC** (1996) Plant protein phosphatases. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 101-125
- Song WY, Zhang ZB, Shao HB, Guo XL, Cao HX, Zhao HB, Fu ZY, Hu XJ** (2008) Relationship between calcium decoding elements and plant abiotic-stress resistance. *Int J Biol Sci* **4**: 116-125
- Southern EM** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel-electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517
- Steber C** (2007) De-repression of seed germination by GA signaling. In KJ Bradford, H Nonogaki, eds, *Seed Development, Dormancy and Germination*. Blackwell, Oxford, pp 248-264
- Steber CM, McCourt P** (2001) A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **125**: 763-769
- Sticher L, MauchMani B, Metraux JP** (1997) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* **35**: 235-270
- Stone JM, Walker JC** (1995) Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiol* **108**: 451-457
- Stone SL, Kwong LW, Yee KM, Pelletier J, Lepiniec L, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ** (2001) LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 11806-11811
- Strawn MA, Marr SK, Inoue K, Inada N, Zubieta C, Wildermuth MC** (2007) *Arabidopsis* isochorismate synthase functional in pathogen-induced salicylate biosynthesis exhibits properties consistent with a role in diverse stress responses. *J Biol Chem* **282**: 5919-5933
- Strobel NE, Kuc A** (1995) Chemical and biological inducers of systemic resistance to pathogens protect cucumber and tobacco plants from damage caused by paraquat and cupric chloride. *Phytopathology* **85**: 1306-1310
- Sugiyama N, Nakagami H, Mochida K, Daudi A, Tomita M, Shirasu K, Ishihama Y** (2008) Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in *Arabidopsis*. *Mol Syst Biol* **4**:
- Sun H, Charles CH, Lau LF, Tonks NK** (1993) MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell* **75**: 487-493

- Sun TP, Gubler F** (2004) Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 197-223
- Swain SM, Tseng TS, Thornton TM, Gopalraj M, Olszewski NE** (2002) SPINDLY is a nuclear-localized repressor of gibberellin signal transduction expressed throughout the plant. *Plant Physiol* **129**: 605-615
- Taberner L, Aricescu AR, Jones EY, Szedlacsek SE** (2008) Protein tyrosine phosphatases: structure-function relationships. *FEBS J* **275**: 867-882
- Tena G, Asai T, Chiu WL, Sheen J** (2001) Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 392-400
- To A, Valon C, Savino G, Guillemot J, Devic M, Giraudat J, Parcy F** (2006) A network of local and redundant gene regulation governs *Arabidopsis* seed maturation. *Plant Cell* **18**: 1642-1651
- Tonks NK, Neel BG** (1996) From form to function: Signaling by protein tyrosine phosphatases. *Cell* **87**: 365-368
- Torti G, Manzocchi L, Salamini F** (1986) Free and bound indole-acetic acid is low in the endosperm of the maize mutant defective endosperm B18. *Theor Appl Genet* **72**: 602-605
- Truman W, Bennett MH, Kubigsteltig I, Turnbull C, Grant M** (2007) *Arabidopsis* systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 1075-1080
- Tyler L, Thomas SG, Hu JH, Dill A, Alonso JM, Ecker JR, Sun TP** (2004) DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **135**: 1008-1019
- Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, Kobayashi M, Chow TY, Hsing YIC, Kitano H, Yamaguchi I, Matsuoka M** (2005) GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* **437**: 693-698
- Ullah H, Chen JG, Young JC, Im KH, Sussman MR, Jones AM** (2001) Modulation of cell proliferation by heterotrimeric G protein in *Arabidopsis*. *Science* **292**: 2066-2069
- Upadhyaya A, Davis TD, Sankhla N** (1991) Heat shock tolerance and antioxidant activity in moth bean seedlings treated with tetracyclacin. *Plant Growth Reg* **10**: 215-222
- Van der Schaar W, Alonso-Blanco C, Leon-Kloosterziel KM, Jansen RC, Van Ooijen JW, Koornneef M** (1997) QTL analysis of seed dormancy in *Arabidopsis* using recombinant inbred lines and MQM mapping. *Heredity* **79**: 190-200
- Vernooij B, Uknes S, Ward E, Ryals J** (1994) Salicylic acid as a signal molecule in plant pathogen interactions. *Curr Opin Cell Biol* **6**: 275-279

- Vriezen WH, Achard P, Harberd NP, Van der Straeten D** (2004) Ethylene-mediated enhancement of apical hook formation in etiolated *Arabidopsis thaliana* seedlings is gibberellin dependent. *Plant J* **37**: 505-516
- Wahid A, Gelani S, Ashraf M, Foolad MR** (2007) Heat tolerance in plants: An overview. *Environ Exp Bot* **61**: 199-223
- Walker-Simmons MK** (1987) ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars. *Plant Physiol* **84**: 61-66
- Walker-Simmons MK** (1998) Protein kinases in seeds. *Seed Sci Res* **8**: 193-200
- Wang LJ, Chen SJ, Kong WF, Li SH, Archbold DD** (2006) Salicylic acid pretreatment alleviates chilling injury and affects the antioxidant system and heat shock proteins of peaches during cold storage. *Postharvest Biol Tec* **41**: 244-251
- Wang M, Heimovaara-Dijkstra S, Vanduijn B** (1995) Modulation of germination of embryos isolated from dormant and nondormant barley grains by manipulation of endogenous abscisic acid. *Planta* **195**: 586-592
- Wang M, Zhang Y, Wang J, Wu X, Guo X** (2007) A novel MAP kinase gene in cotton (*Gossypium hirsutum* L.), GhMAPK, is involved in response to diverse environmental stresses. *J Biochem Mol Biol* **40**: 325-332
- Wang XQ, Ullah H, Jones AM, Assmann SM** (2001) G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Science* **292**: 2070-2072
- Watts FZ, Moore AL** (1989) Nucleotide sequence of a full length cDNA clone encoding a polyubiquitin gene from *Pisum sativum*. *Nucleic Acids Res* **17**: 10100-10100
- Weiss D, Ori N** (2007) Mechanisms of cross talk between gibberellin and other hormones. *Plant Physiol* **144**: 1240-1246
- Welbaum GE, Tissaoui T, Bradford KJ** (1990) Water relations of seed development and germination in muskmelon (*Cucumis melo* L). 3. Sensitivity of germination to water potential and abscisic acid during development. *Plant Physiol* **92**: 1029-1037
- Wen PF, Chen JY, Wan SB, Kong WF, Zhang P, Wang W, Zhan JC, Pan QH, Huang WD** (2008) Salicylic acid activates phenylalanine ammonia-lyase in grape berry in response to high temperature stress. *Plant Growth Reg* **55**: 1-10
- Werner JE, Finkelstein RR** (1995) *Arabidopsis* mutants with reduced response to NaCl and osmotic stress. *Physiol Plant* **93**: 659-666
- Whitmarsh AJ, Kuan CY, Kennedy NJ, Kelkar N, Haydar TF, Mordes JP, Appel M, Rossini AA, Jones SN, Flavell RA, Rakic P, Davis RJ** (2001) Requirement of the JIP1 scaffold protein for stress-induced JNK activation. *Genes Dev* **15**: 2421-2432

**Wigoda N, Ben-Nissan G, Granot D, Schwartz A, Weiss D** (2006) The gibberellin-induced, cysteine-rich protein GIP2 from *Petunia hybrida* exhibits in planta antioxidant activity. *Plant J* **48**: 796-805

**Wildermuth MC** (2006) Variations on a theme: synthesis and modification of plant benzoic acids. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 288-296

**Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM** (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**: 562-565

**Willige BC, Ghosh S, Nill C, Zourelidou M, Dohmann EMN, Maier A, Schwechheimer C** (2007) The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 1209-1220

**Wu J, Liu J, Thompson I, Oliver CJ, Shenolikar S, Brautigam DL** (1998) A conserved domain for glycogen binding in protein phosphatase-1 targeting subunits. *FEBS Lett* **439**: 185-191

**Wu Y, Kuzma J, Marechal E, Graeff R, Lee HC, Foster R, Chua NH** (1997) Abscisic acid signaling through cyclic ADP-Ribose in plants. *Science* **278**: 2126-2130

**Wurgler-Murphy SM, Maeda T, Witten EA, Saito H** (1997) Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG1 mitogen-activated protein kinase by the PTP2 and PTP3 protein tyrosine phosphatases. *Mol Cell Biol* **17**: 1289-1297

**Xiong LM, Gong ZZ, Rock CD, Subramanian S, Guo Y, Xu WY, Galbraith D, Zhu JK** (2001a) Modulation of abscisic acid signal transduction and biosynthesis by an Sm-like protein in *Arabidopsis*. *Dev Cell* **1**: 771-781

**Xiong LM, Lee BH, Ishitani M, Lee H, Zhang CQ, Zhu JK** (2001b) FIERY1 encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **15**: 1971-1984

**Xu NF, Bewley JD** (1991) Sensitivity to abscisic acid and osmoticum changes during embryogenesis of alfalfa (*Medicago sativa*). *J Exp Bot* **42**: 821-826

**Xu Q, Fu HH, Gupta R, Luan S** (1998) Molecular characterization of a tyrosine-specific protein phosphatase encoded by a stress-responsive gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 849-857

**Yamauchi Y, Ogawa M, Kuwahara A, Hanada A, Kamiya Y, Yamaguchi S** (2004) Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell* **16**: 367-378

**Yang Y, Sulpice R, Himmelbach A, Meinhard M, Christmann A, Grill E** (2006) Fibrillin expression is regulated by abscisic acid response regulators and is involved in abscisic acid-mediated photoprotection. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 6061-6066

**Yang YN, Qi M, Mei CS** (2004) Endogenous salicylic acid protects rice plants from oxidative damage caused by aging as well as biotic and abiotic stress. *Plant J* **40**: 909-919

**Yang ZM, Wang J, Wang SH, Xu LL** (2003) Salicylic acid induced aluminum tolerance by modulation of citrate efflux from roots of *Cassia tora* L. *Planta* **217**: 168-174

**Yoon HW, Kim MC, Shin PG, Kim JS, Kim CY, Lee SY, Hwang I, Bahk JD, Hong JC, Han C, Cho MJ** (1997) Differential expression of two functional serine/threonine protein kinases from soyabean that have an unusual acidic domain at the carboxy terminus. *Mol Gen Genet* **255**: 359-371

**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**: 115-126

**Zalejski C, Zhang ZS, Quettier AL, Maldiney R, Bonnet M, Brault M, Demandre C, Miginiac E, Rona JP, Sotta B, Jeannette E** (2005) Diacylglycerol pyrophosphate is a second messenger of abscisic acid signaling in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Plant J* **42**: 145-152

**Zhang WH, Qin CB, Zhao J, Wang XM** (2004) Phospholipase D  $\alpha$ 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 9508-9513

**Zhang X, Miao YC, An GY, Zhou Y, Shangguan ZP, Gao JF, Song CP** (2001) K<sup>+</sup> channels inhibited by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in *Vicia* guard cells. *Cell Res* **11**: 195-202