



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA VEGETAL • FACULTAD DE BIOLOGÍA



CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL de NUEVOS COMPONENTES MOLECULARES  
IMPLICADOS en la SEÑALIZACIÓN del ÁCIDO ABCSÍCO (ABA) durante  
la GERMINACIÓN de SEMILLAS de *Arabidopsis thaliana*.

**Alejandro Fernández Arbaizar**



Salamanca. Enero 2011

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**  
**Departamento de Fisiología Vegetal**  
**Facultad de Biología**



**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE NUEVOS  
COMPONENTES MOLECULARES IMPLICADOS EN  
LA SEÑALIZACIÓN DEL ÁCIDO ABSCÍSICO (ABA)  
DURANTE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE**  
*Arabidopsis thaliana*

**ALEJANDRO FERNÁNDEZ ARBAIZAR**

**SALAMANCA, Enero 2011**

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

CERTIFICO:

Que la presente Memoria titulada **“Caracterización funcional de nuevos componentes moleculares implicados en la señalización del ácido abscísico (ABA) durante la germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana*”** ha sido realizada en el Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología y el Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias de la Universidad de Salamanca por el licenciado **D. ALEJANDRO FERNÁNDEZ ARBAIZAR**, bajo la dirección del Dr. D. Óscar Lorenzo Sánchez y del Dr. D. Daniel Osuna Jiménez, y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Para que así conste, firmo el presente certificado en Salamanca a 11 de Noviembre de 2010.

Fdo: Dra. Dña. Emilia Labrador Encinas.

**D. ÓSCAR LORENZO SÁNCHEZ**, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO D FISIOLÓGÍA VEGETAL DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD D SALAMANCA Y **D. DANIEL OSUNA JIMÉNEZ**, INVESTIGADOR POSTDOCTORA CONTRATADO DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAMOS:

Que la presente Memoria titulada **“Caracterización funcional de nuevos componentes moleculares implicados en la señalización del ácido abscísico (ABA) durante la germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana*”** ha sido realizada en el Departamento de Fisiología Vegetal y el Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca, bajo nuestra dirección, por el licenciado **D. ALEJANDRO FERNÁNDEZ ARBAIZAR** y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Para que así conste, firmamos el presente certificado en Salamanca a 11 de Noviembre de 2010.

Fdo: Dr. D. Óscar Lorenzo Sánchez

Fdo: Dr. D. Daniel Osuna Jiménez

*A ti, por estar incluso cuando no estabas*

*A vosotros*

## A g r a d e c i m i e n t o s

...y tras cinco años de camino llegó el día de escribir el punto final de este diario. Durante el largo recorrido, he conocido lugares, personas, muchas de ellas ahora amigas, vivido situaciones y experiencias, y sin embargo, siento que apenas he dado unos pocos pasos desde el comienzo. Por supuesto, no sería justo olvidarme de todos los que me habéis acompañado y guiado en esta travesía, porque sin vosotros nada hubiera sido posible.

Óscar y Daniel, directores de este trabajo, gracias por haber dirigido la realización de esta memoria.

A todos los integrantes del laboratorio que hicieron más fácil el trabajo (incluida Cristina). Loli y Gregorio, siempre os tendré que agradecer que intentéis hacer del laboratorio nuestra segunda casa. Abe, echaré de menos nuestras horas de confocal, mil gracias por todo señor. Patri, aunque no lo creas, finalmente encontraremos el roble centenario, ¿o era un castaño? Tomás y Marlene, qué necesario sería que hubiera más personas como vosotros (gracias por escucharme en los malos momentos). Luis, espero que tu sensatez e ilusión sea contagiosa.

También recuerdo ahora a toda la gente que ha pasado por el laboratorio y que siempre tendrán un hueco en mi memoria. Blanca, Álvaro, Xandra (qué bonita experiencia fue trabajar contigo), José Luis “garbage” (hablar contigo convalida 3 años de psicología) y por supuesto Mary Paz, quien me enseñó a andar por el mundo de la ciencia, quien me enseñó que se puede seguir siendo persona a pesar de todo. Jota, tú mereces un punto y a parte en mi recuerdo, cuánto me has enseñado compañero. Fue un placer compartir horas de laboratorio contigo (gracias por indicarme las normas básicas para vivir en EE.UU.).

Recuerdo ahora con cariño a toda la gente de la etapa del Departamento de Fisiología Vegetal. Especialmente a Nacho, enhorabuena de nuevo por tu plaza, y a Heli, cuánto se te echa de menos (eres una verdadera catedrática).

En mi andadura por los campos de la ciencia he conocido muchos lugares que sin duda han contribuido, y de qué manera, a la elaboración de este trabajo. Dr. Roberto Solano (C.N.B-Madrid), qué difícil fue enfrentarme a mi primera estancia y cuántas facilidades recibí (gracias

Gloria!), Dr. Vicente Carbajosa (C.B.G.P.-Madrid), Dr. Hiro Nonogaki (O.S.U-Corvallis), no olvidaré las reuniones de laboratorio comiendo pizza) y por último Dr. Mike Holdsworth (U. de Nottingham) gracias por todos los ánimos que me diste George y por las ale-pint compartidas!

Especialmente, ahora es el momento de recordar a la gente que ha vivido de cerca estos años de trabajo, alegrándose cuando las cosas salían bien, y sobre todo, poniendo una sonrisa cuando a mi se me olvidaba lo que era sonreír.

Para acabar un camino hay que decidir empezarlo y cuando se hace duro y el destino parece imposible de alcanzar, necesitas que algo te empuje a seguir. En todos y cada uno de los recodos en los que decidí parar y abandonar, siempre estabas tú para darme la mano y empezar de nuevo. Gran parte de este trabajo es tuyo, doctora. Ulteia!

...y para finalizar un recorrido, es necesario dar el último paso, ése que no hubiera dado sin ti, Marta. Gracias por tu eterna sonrisa, por escucharme, por tus ánimos, tus risotadas, tus locuras. Muchas gracias, ya te lo digo.

No quisiera olvidarme de las personas con las compartí mis años de carrera, y con las que afortunadamente sigo compartiendo ratitos. Barry (nunca me cansaré de escuchar tus historias), Jorge “punky” y Vicky, cualquier cosa que escriba sería estropear lo que pienso de vosotros, sólo os puedo agradecer todos y cada uno de los momentos vividos.

A los de siempre, Alberto “Baía man” (que buenos “parlaos” nos echamos últimamente), Dani (pronto nos volveremos a ver), Oliver (suerte en tu nueva etapa, al final lo conseguirás), David, Diego, Emilio (aunque estemos una década sin hablar siempre parece que nos vimos ayer).

Y al final mis aitas, Maribel y Lorenzo, y mis hermanos, Raquel y David, sin quizá saberlo son los verdaderos autores del trabajo de mi vida, quienes siempre están cuando más falta hacen y quienes menos agradecimientos han recibido por lo tanto que me han dado. Así que, GRACIAS.

...y aunque este es el último paso de este camino, sé que ahora voy a comenzar otros nuevos y espero seguir cruzándome con gente como vosotros. Nos vemos.

## A b r e v i a t u r a s   y   S i g l a s

A continuación se detallan las abreviaturas y siglas empleadas en la realización del presente trabajo. Los nombres de unidades y símbolos han sido utilizados según el Sistema Internacional de Unidades y las sustancias químicas se rigen según el sistema de nomenclatura de la IUPAC.

<b>3-AT</b>	3-aminotriazol	<b>DEPC</b>	dietil pirocarbonato
<b>aa</b>	aminoácidos	<b>DIC</b>	microscopía diferencial de contraste de interferencia
<b>ABA</b>	ácido abscísico	<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>aba</b>	mutante deficiente en ABA	<b>DNasa</b>	desoxirribonucleasa
<b>abi</b>	mutante insensible a ABA	<b>dNTP</b>	deoxinucleótidos trifosfato
<b>ABRE</b>	elemento <i>cis</i> de respuesta a ABA	<b>D.O.</b>	densidad óptica (nm)
<b>ACC</b>	ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico	<b>DPA</b>	ácido difaseico
<b>AD</b>	dominio de activación de la proteína GAL4	<b>DRE</b>	elemento <i>cis</i> de respuesta a sequía
<b>Amp</b>	ampicilina	<b>EDTA</b>	ácido etilen-diamino tetra acético
<b>ATP</b>	adenosina trifosfato	<b>EMS</b>	etil metano sulfonato
<b>A<sub>(x)</sub></b>	absorbancia a la longitud de onda x	<b>ET</b>	etileno
<b>BAC</b>	cromosoma artificial de bacterias	<b>FT</b>	factor de transcripción
<b>BD</b>	dominio de unión a DNA de la proteína GAL4	<b>GARE</b>	elemento de respuesta a GAs
<b>bZIP</b>	proteína con dominio básico y cremallera de leucina	<b>GAs</b>	giberelinas
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	calcio	<b>GFP</b>	<i>GREEN FLUORESCENT PROTEIN</i>
<b>cDNA</b>	ácido desoxirribonucleico complementario	<b>GUS</b>	gen de la β-glucuronidasa
<b>cM</b>	centiMorgan	<b>HAB</b>	<i>HOMOLOGY TO ABI</i>
<b>coi</b>	insensible a coronatina	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	peróxido de hidrógeno
<b>Col-0</b>	Columbia-0 (ecotipo de <i>Arabidopsis thaliana</i> )	<b>Hig</b>	higromicina
<b>cra</b>	<i>coi1 resistant to ABA</i>	<b>Ile</b>	isoleucina
<b>CTAB</b>	bromuro de cetil trimetilamonio	<b>IP<sub>3</sub></b>	inositol-1,4,5-trifosfato
<b>Cvi</b>	Cape Verde Islands (ecotipo de <i>Arabidopsis thaliana</i> )	<b>JA</b>	ácido jasmónico
		<b>JAs</b>	jasmonatos
		<b>Kan</b>	kanamicina

<b>kb</b>	kilo pares de bases	<b>RNA</b>	ácido ribonucleico
<b>kDa</b>	kilodalton	<b>RNasa</b>	ribonucleasa
<b>LB</b>	medio de cultivo Luria-Bertani	<b>ROS</b>	especies reactivas de oxígeno
<b>LEA</b>	proteína abundante en la embriogénesis tardía	<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>LEC</b>	<i>LEAFY COTYLEDON</i> (factor de transcripción)	<b>rRNA</b>	ácido ribonucleico ribosómico
<b>Ler</b>	Landsberg <i>erecta</i> (ecotipo de <i>Arabidopsis thaliana</i> )	<b>SA</b>	ácido salicílico
<b>LOX</b>	<i>LIPOXYGENASE</i> (gen de respuesta a JA)	<b>SDS</b>	dodecil sulfato sódico
<b>MAPK</b>	proteín-kinasa activada por mitógeno	<b>SEM</b>	microscopio electrónico de barrido
<b>MOPS</b>	ácido 3-morfolino propano sulfónico	<b>TBE</b>	tampón Tris-borato-EDTA
<b>mRNA</b>	ácido ribonucleico mensajero	<b>TE</b>	tampón Tris-EDTA
<b>MS</b>	medio de cultivo Murashige y Skoog	<b>Tris</b>	tris (hidroximetil) aminometano
<b>NAC</b>	NAM-ATAF-CUC (factor de transcripción)	<b>U</b>	unidades de enzima
<b>NADH</b>	nicotinamida adenina dinucleótido reducido	<b>v</b>	voltio
<b>PA</b>	ácido faseico	<b>v/v</b>	relación volumen/volumen
<b>pb</b>	pares de bases	<b>w/v</b>	relación peso/volumen
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa	<b>YFP</b>	<i>YELLOW FLUORESCENT PROTEIN</i>
<b>PLC</b>	fosfolipasa C		
<b>Pi</b>	fosfato inorgánico		
<b>PAC</b>	paclobutrazol		
<b>PK</b>	proteín-kinasa		
<b>PP</b>	proteín-fosfatasa		
<b>PP2C</b>	proteín-fosfatasa de tipo 2C		
<b>psi</b>	libra por pulgada cuadrada (unidad de presión)		
<b>Q RT-PCR</b>	PCR cuantitativa		
<b>RAB18</b>	<i>RESPONSIVE TO ABA 18</i> (gen de respuesta a ABA)		

# Índice

## INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
2. EMBRIOGÉNESIS Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS.....	4
2.1. Embriogénesis.....	5
2.2. Papel de las hormonas en la embriogénesis.....	8
2.3. Germinación de semillas.....	9
2.4. Papel de las hormonas vegetales en la dormición y germinación de semillas.....	12
3. BIOSÍNTESIS, SEÑALIZACIÓN Y EFECTOS FISIOLÓGICOS DEL ÁCIDO ABSCÍSICO (ABA).....	15
3.1. Biosíntesis del ABA.....	15
3.2. Percepción del ABA.....	19
3.3. Señalización del ABA.....	19
3.3.1. Proteín-fosfatasa de tipo 2C (PP2Cs).....	22
3.3.2. Factores transcripcionales.....	24
3.4. Efectos fisiológicos del ABA.....	25
3.4.1. Maduración y dormición de semillas.....	25
3.4.2. Germinación de semillas.....	27
3.4.3. Respuesta a estreses bióticos producidos por patógenos.....	28
3.4.4. Respuesta a estreses abióticos.....	30
4. BIOSÍNTESIS, SEÑALIZACIÓN Y EFECTOS FISIOLÓGICOS DE LOS JASMONATOS (JAs).....	31
4.1. Biosíntesis de JAs: ruta de los octadecanoides.....	32
4.2. Percepción y señalización de los JAs.....	34
4.3. Efectos fisiológicos de los JAs.....	37
4.3.1. Función del JA en procesos del desarrollo.....	38
4.3.2. Función del JA en estreses bióticos y abióticos.....	39

## ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	43
-------------------------------	----

## MATERIALES Y TÉCNICAS

1. MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO.....	49
1.1. Material vegetal.....	49
1.2. Microorganismos.....	50
1.3. Vectores empleados.....	51
2. CONDICIONES DE SIEMBRA, CULTIVO Y TRATAMIENTOS EMPLEADOS. ....	53
2.1. Esterilización y estratificación de las semillas.....	53
2.2. Siembra y obtención de plántulas.....	53
2.3. Tratamientos de germinación empleados.....	55
2.4. Análisis del crecimiento de la raíz ( <i>root growth</i> ).....	58
3. CARACTERIZACIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO.....	58
3.1. Evaluación de la viabilidad de las semillas.....	58
3.2. Microscopía diferencial de contraste de interferencia (D.I.C.).....	59
3.3. Microscopía electrónica de barrido (S.E.M.).....	59
4. MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	60
4.1. Manipulación y cultivo de <i>Escherichia coli</i> .....	60
4.1.1. Crecimiento, medios de cultivo y conservación de cepas.....	60
4.1.2. Preparación de células competentes.....	61
4.1.3. Transformación de células competentes.....	61
4.2. Manipulación y cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	62
4.2.1. Crecimiento, medios de cultivo y conservación de cepas.....	62
4.2.2. Preparación de células competentes.....	62
4.2.3. Transformación de células competentes.....	63
4.3. Inoculación de plantas de <i>A. thaliana</i> con microorganismos fitopatógenos.....	63
4.3.1. Infección de plantas de <i>Arabidopsis</i> .....	64
4.3.2. Tinción de hifas fúngicas.....	65

5. ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	65
5.1. Extracción y purificación de DNA genómico.....	66
5.2. Extracción y purificación de DNA plasmídico.....	66
5.3. Extracción y purificación de RNA total.....	67
5.3.1. Extracción y purificación de RNA total de tejido verde.....	68
5.3.2. Extracción y purificación de RNA total de semillas.....	68
5.4. Cuantificación de ácidos nucleicos.....	69
5.5. Tratamiento y modificación de ácidos nucleicos.....	70
5.5.1. Digestión del DNA con enzimas de restricción.....	70
5.5.2. Reacción de ligación y recombinación por tecnología <i>GATEWAY</i> .....	70
5.5.3. Reacción de retrotranscripción del RNA.....	72
5.6. Amplificación de DNA: reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	73
5.7. Electroforesis de DNA.....	74
5.8. Purificación de fragmentos de DNA.....	75
5.9. Secuenciación de DNA.....	75
5.10. Electroforesis de RNA.....	76
5.11. Transferencia de RNA a membrana: Northern Blot.....	77
5.12. Marcaje radiactivo de DNA, hibridación y autorradiografía.....	78
5.13. RT-PCR cuantitativa (Q RT-PCR).....	80
5.14. Análisis transcriptómico mediante micromatrices de oligonucleótidos.....	81
5.14.1. Síntesis de cRNA biotinilado.....	82
5.14.2. Hibridación, lavado y escaneado.....	82
5.14.3. Análisis de datos.....	82
6. CONDICIONES DE LA BÚSQUEDA DE MUTANTES <i>cra</i> ( <i>coi1-16 resistant to ABA</i> ).....	83
6.1. Mutagénesis de semillas con EMS.....	83
6.2. Selección de mutantes.....	84
6.3. Cruzamiento de plantas.....	84
6.4. Localización de la mutación.....	86
7. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE PLANTAS TRANSGÉNICAS.....	86
7.1. Transformación de <i>A. thaliana</i> por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	86
7.1.1. Construcciones para la transformación de plantas de <i>A. thaliana</i> .....	86
7.1.2. Infiltración de plantas de <i>A. thaliana</i> con <i>A. tumefaciens</i> .....	87
7.2. Selección de plantas transgénicas.....	88

7.2.1. Análisis de la segregación del marcador de resistencia a higromicina en la generación T2.....	88
7.3. Ensayo histológico de la actividad $\beta$ -glucuronidasa. ....	89
8. TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA DE TEJIDO VEGETAL.....	89
8.1. Transformación transitoria por bombardeo de partículas. ....	89
8.1.1. Preparación de microproyectiles de DNA. ....	90
8.1.2. Bombardeo de células de epidermis de cebolla. ....	90
8.2. Transformación transitoria por agroinfiltración. ....	91
8.3. Ensayos de Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC). ....	92
9. ENSAYOS DE TRANSACTIVACIÓN Y HOMODIMERIZACIÓN.....	93
9.1. Transformación de levaduras. ....	94
9.2. Ensayo $\beta$ -GAL con malla. ....	95
9.3. Ensayo con 3-aminotriazol (3-AT). ....	96
10. ANÁLISIS Y PRESENTACIÓN DE DATOS.....	96
10.1. Fotografía. Autorradiografía. ....	96
10.2. Análisis informático. ....	97
10.3. Presentación de datos. ....	97
10.4. Pautas seguidas para la redacción de esta memoria. ....	97

## RESULTADOS

CAPÍTULO I: BÚSQUEDA DE NUEVOS MUTANTES CON SENSIBILIDAD DISMINUIDA A ABA DURANTE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS EN <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	100
1. CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA A ÁCIDO ABSCÍSICO (ABA) Y JASMONATOS (JAs) DURANTE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS EN <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	101
1.1. Efecto del ABA y del JA en la inhibición de la germinación. ....	101

2. AISLAMIENTO DE MUTANTES AFECTADOS EN LAS RESPUESTAS A ABA DURANTE LA GERMINACIÓN Y EL DESARROLLO TEMPRANO. ....	103
2.1. Mutagénesis de semillas <i>coi1-16</i> .....	105
2.2. Selección de mutantes <i>cra</i> ( <i>coi1 resistant to ABA</i> ). ....	106
2.3. Clasificación fenotípica de los mutantes <i>cra</i> .....	107
3. CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES MUTADOS.....	109
3.1. Selección de la población de mapeo.....	109
3.2. Cartografía de los genes mutados.....	110
3.3. Identificación de los genes mutados.....	111
3.3.1. Mutante <i>cra3</i> . ....	111
3.3.2. Mutante <i>cra2</i> . ....	114
3.3.3. Mutante <i>cra4</i> . ....	115
3.3.4. Mutante <i>cra1</i> . ....	117
4. CARACTERIZACIÓN DE HAB2, UNA PROTEÍN-FOSFATASA DE TIPO 2C (PP2C) IMPLICADA EN LA REGULACIÓN DE LAS RESPUESTAS A ABA. ....	118
4.1. Caracterización de la proteína codificada: estudio comparativo y dominios funcionales.....	118
4.2. Evolución filogenética de la familia de proteínas PP2C del grupo A. ....	119
4.3. Caracterización fenotípica del mutante <i>hab2</i> . ....	121
4.3.1. Análisis fenotípico del desarrollo de semillas en el mutante <i>hab2;coi1-16</i> .....	121
4.3.2. Respuesta del mutante <i>hab2</i> a ABA durante la germinación de semillas.....	126
4.3.3. Estudio de la dormición y del efecto del almacenamiento en seco ( <i>after-ripening</i> ) de las semillas. ....	127
4.3.4. Respuesta del mutante <i>hab2</i> a ABA durante el desarrollo temprano.....	131
4.3.5. Ensayo de crecimiento de raíz ( <i>root-growth</i> ).....	132
4.3.6. Estrés abióticos: respuesta al estrés salino, osmótico y temperaturas subóptimas de germinación. ....	133
4.3.7. Estrés bióticos. ....	136
4.4. Estudio de la expresión génica en el mutante <i>hab2</i> .....	137
4.5. Localización subcelular de la proteína HAB2.....	138
4.6. Análisis de la interacción entre HAB2 y proteínas de la familia de receptores de ABA PYR1/PYL-RCAR. ....	140
4.7. Generación de las líneas transgénicas <i>35S:GFP:HAB2</i> y <i>35S:GFP:hab2</i> .....	144
4.7.1. Segregación de los transgenes en la progenie. ....	144

4.7.2. Caracterización molecular de los transgenes <i>HAB2</i> y <i>hab2</i> .	145
4.7.3. Caracterización fenotípica de las plantas <i>35S:GFP:HAB2</i> y <i>35S:GFP:hab2</i> .	146
4.7.4. Efecto de la expresión constitutiva de <i>HAB2</i> y su versión mutada <i>hab2</i> en la regulación de genes de respuesta a ABA.	148
4.7.5. Localización subcelular de <i>HAB2</i> y <i>hab2G245E</i> en las plantas transgénicas.	148
CAPÍTULO II: ANÁLISIS FUNCIONAL DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL	
ANAC089.	150
5. NUEVA ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA DE MUTANTES AFECTADOS EN LAS REPUESTAS A ABA.	150
5.1. Localización cromosómica de las mutaciones.	151
6. CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA CODIFICADA: ESTUDIO COMPARATIVO Y DOMINIOS FUNCIONALES.	152
7. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL MUTANTE <i>anac089</i> .	153
7.1. Análisis de la germinación y el desarrollo temprano en el mutante <i>anac089</i> .	153
7.2. Respuesta a estreses abióticos en el mutante <i>anac089-2</i> .	155
8. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ANAC089.	156
8.1. Análisis de la expresión génica de <i>ANAC089</i> durante la germinación de semillas.	156
8.2. Localización subcelular de la proteína ANAC089.	157
8.3. Análisis de transactivación y dimerización de ANAC089.	158
8.4. Análisis transcriptómico de la respuesta a aba durante la germinación de semillas en el mutante <i>anac089-2</i> .	160
8.4.1. Meta-análisis de genes dependientes de ABA y otras hormonas vegetales.	163
8.4.2. Búsqueda de elementos reguladores <i>cis</i> reconocidos por ANAC089.	165

## DISCUSIÓN

1. DISCUSIÓN GENERAL.	169
2. INTERACCIONES ENTRE LA SEÑALIZACIÓN DE ABA Y JAs EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE <i>Arabidopsis thaliana</i> .	170

3. APROXIMACIONES GENÉTICAS PARA LA BÚSQUEDA DE MUTANTES AFECTADOS EN LA SEÑALIZACIÓN DE ABA.....	172
4. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA PROTEÍN-FOSFATASA DE TIPO 2C (PP2C) HAB2.....	177
5. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL ANAC089.....	193

## CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.....	203
-------------------	-----

## SUMMARY

INTRODUCTION.....	206
AIM OF THE WORK.....	209
RESULTS AND DISCUSSION.....	209
Chapter I: Isolation and characterization of the clade A PP2C HAB2 protein.....	209
Chapter II: Characterization of the ANAC089 transcription factor.....	222
CONCLUSIONS.....	230

## APÉNDICES

APÉNDICES.....	234
----------------	-----

## BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA.....	242
-------------------	-----



# Introducción

Introducción





## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.

La semilla es la unidad de reproducción sexual de las plantas, tiene la función de multiplicar y perpetuar la especie a la que pertenece y puede ser definida como el producto maduro de un óvulo fecundado del cual partirá un nuevo espécimen vegetal. Además, es uno de los elementos más eficaces para que la especie se disperse, tanto en el tiempo como en el espacio. La semilla es uno de los principales recursos para el mantenimiento de la vida, esencial para la renovación, persistencia y sucesión ecológica vegetal así como un pilar fundamental para el ser humano, representando su utilización por parte del hombre el desarrollo de la agricultura, dando lugar a uno de los mayores cambios históricos. Para que la semilla cumpla con su objetivo, es necesario que el embrión se transforme en una plántula capaz de valerse por sí misma y convertirse en una planta adulta. Todo ello comprende una serie de procesos metabólicos y morfogenéticos cuyo resultado final es la germinación de las semillas.

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, tales como la acumulación de sustancias de reserva y un estado de reposo metabólico que se completa con la desecación, y un estricto control por parte de factores hormonales y ambientales.

La ciencia de las semillas es un área de gran relevancia dentro de la Fisiología Vegetal. La secuenciación del genoma completo de *Arabidopsis thaliana* ha permitido disponer de una valiosa herramienta de investigación, empleándose como modelo para comprender la biología de numerosos cultivos. De este modo, ha aumentado el conocimiento de numerosos aspectos de la biología de las semillas con interés agronómico así como de árboles de valor forestal. Sin embargo, muchos de los procesos fisiológicos y moleculares que tienen lugar en las semillas no están del todo aclarados, siendo necesario intensificar la investigación en algunos de los aspectos más desconocidos de la biología de las semillas, como por ejemplo la regulación de su formación, dormición y la germinación.

Las semillas son el punto de partida para el establecimiento de una nueva planta y para ello, han de integrar en su interior las señales ambientales y hormonales que les permitan percibir si las condiciones que las rodean son o no favorables para germinar. Para ello, la célula vegetal debe percibir el estímulo, poner en funcionamiento un intrincado mecanismo de transmisión de la señal hasta el núcleo, y que en última instancia se active la expresión de genes específicos. Dentro de este mecanismo general, la fosforilación y desfosforilación de proteínas y la regulación transcripcional parecen tener una importancia crucial en la regulación de la dormición y germinación de las semillas.

Por otro lado, las hormonas vegetales tienen un papel fundamental en la regulación de las diferentes etapas durante la vida de una planta. Varias sustancias reguladoras del crecimiento actúan como moléculas señalizadoras en la germinación de semillas, y entre ellas, el ácido abscísico (ABA), ha sido una de las más estudiadas. Por su parte, los jasmonatos (JAs) participan en varios procesos fisiológicos entre los que están el desarrollo, maduración y germinación de semillas, basándose en su relación con el ABA. Actualmente, se desconocen los mecanismos moleculares que subyacen a esta interacción durante la germinación y el comienzo del desarrollo y que permiten a la planta su regulación génica. La identificación de los elementos responsables de esta respuesta es, por tanto, esencial para entender los medios con los que cuentan las plantas para su percepción y señalización.

Debido a su gran relevancia como moléculas señalizadoras en procesos de desarrollo vegetal y estreses abióticos y bióticos, durante los últimos años se ha ampliado el conocimiento sobre las rutas de percepción y señalización del ABA (Ma et al., 2009; Pandey et al., 2009; Park et al., 2009) y de los JAs (Turner et al., 2002; Lorenzo et al., 2004; Chini et al., 2007; Fonseca et al., 2009), así como de la interacción entre ambas hormonas en la regulación de estos procesos (Lorenzo y Solano, 2005; Yadav et al., 2005; Adie et al., 2007).

En esta introducción se recopilan los conocimientos actuales más relevantes sobre la embriogénesis y germinación de semillas, así como del mecanismo de acción y los efectos del ABA y de los JAs en los procesos de desarrollo y respuestas a estrés, utilizando la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

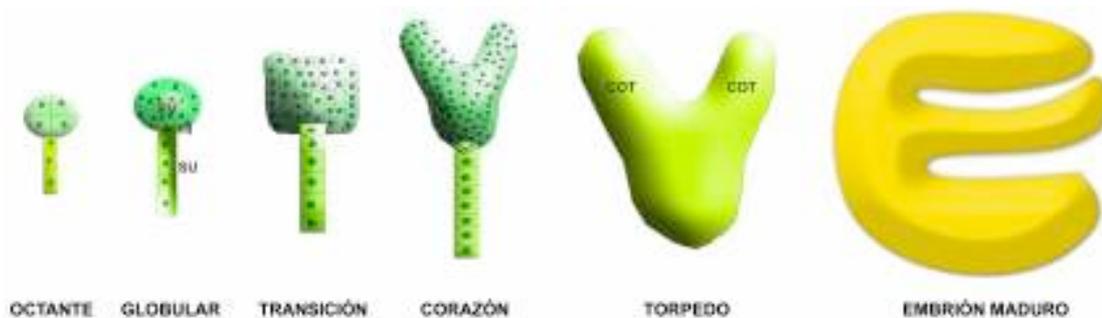
## **2. EMBRIOGÉNESIS Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS.**

La formación de la semilla comprende la etapa de morfogénesis, en la que se establece el eje embrionario y se desarrollan los tejidos y órganos que constituirán la futura planta, y la etapa de maduración, que incluye la detención de la morfogénesis, acumulación de sustancias de reserva, inhibición de la germinación precoz y tolerancia a la desecación. El desarrollo embrionario en las plantas está regulado por un elevado número de genes con complejos patrones de expresión diferencial en función de la etapa del desarrollo y de la región del embrión (Kagaya et al., 2005; To et al., 2006), y que conducen finalmente a la maduración, adquisición de la dormición y tolerancia a la desecación (Harada et al., 1997). Durante la dormición, el embrión es metabólicamente quiescente hasta que las condiciones que rodean a la semilla son las adecuadas para que se pueda producir la germinación, que se inicia con la toma de agua por parte de la semilla y finaliza con la elongación del eje embrionario, haciéndose visible mediante la emergencia de la raíz a través de las cubiertas de la semilla (Bewley y Black, 1994).

## 2.1. Embriogénesis.

Durante el proceso de desarrollo denominado embriogénesis, que da inicio al desarrollo vegetal, se produce la transformación de una célula única denominada cigoto en una planta embrionaria multicelular (Figura I.1). Los estados más importantes por los que pasa el embrión durante su desarrollo son (Taiz y Zeiger, 2006):

- **Globular:** tras la primera división del cigoto, la célula apical sufre dos divisiones dando lugar a un embrión globular de 8 células (octante). Posteriormente, otras divisiones adicionales aumentan el número de células en la esfera.
- **Corazón:** este estado se forma por divisiones celulares en las dos regiones a cada lado del futuro brote caulinar apical, dando lugar a dos protuberancias que posteriormente constituirán los cotiledones.
- **Torpedo:** esta fase se alcanza como resultado de la elongación de las células a lo largo del eje embrionario y por el desarrollo de los cotiledones.
- **Maduración:** al final de la embriogénesis el embrión y la semilla pierden agua y se hacen metabólicamente quiescentes.



**Figura I.1. Etapas del desarrollo embrionario.** Durante la embriogénesis el cigoto sufre tres divisiones para dar lugar al octante, que continúa el desarrollo hasta alcanzar la fase globular. En la fase de corazón se forman los primordios de los cotiledones, perfectamente visibles en la etapa de torpedo. El final de la embriogénesis coincide con la fase de maduración. **EV:** embrión verdadero. **HI:** hipófisis. **SU:** suspensor. **COT:** cotiledones.

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

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

Los análisis de expresión génica muestran que estas fases iniciales del desarrollo del embrión están controladas por programas específicos de regulación transcripcional (Lu et al., 1996; Laux et al., 2004) (Tabla I.1). Así, en la división asimétrica que sufre el cigoto, se produce una distribución diferencial de los mRNAs de genes que codifican factores transcripcionales, como por ejemplo las proteínas *WOX* (*WUSCHEL HOMEODOMAIN*), lo que permite establecer la diferente identidad de las dos células procedentes de aquella división, así como el eje apical-basal del embrión (Haecker et al., 2004).

En este sentido, también hay evidencias de la existencia de diferentes programas de expresión génica en el embrión y en el suspensor (Tabla I.1). Así, mientras algunas mutaciones como *knolle*, *fass* y *hobbit* afectan a la división y organización celular del embrión, hipófisis y suspensor respectivamente (Torres-Ruiz et al., 1994; Lukowitz et al., 1996; Willemsen et al., 1998), otras como *hydra1* provocan únicamente defectos en el embrión, lo que indica que *HYDRA1* se expresa específicamente en el embrión pero no en el suspensor. En los mutantes *abnormal suspensor* (*sus*) y *raspberry* (*rsy*), en los que el desarrollo del embrión verdadero está interrumpido (Schwartz et al., 1994; Yadegari et al., 1994), se producen una serie de divisiones celulares anormales en el suspensor, adquiriendo características propias del embrión, como por ejemplo la acumulación de cuerpos proteicos y lipídicos y de granos de almidón. En el caso de los mutantes *twin* (Vernon y Meinke, 1994), una vez que se detiene el desarrollo del embrión verdadero las células del suspensor se reorganizan en un segundo embrión.

Una vez finalizado el desarrollo del embrión, debido al cese de la división celular, comienza la etapa de maduración durante la cual se produce la acumulación de sustancias de reserva. Todo ello coincide con un aumento en los niveles de ABA, que induce la expresión de un inhibidor de kinasas dependiente de ciclinas (ICK1), conduciendo a la detención del ciclo celular en la fase de transición G1/S (Wang et al., 1998). Así, estudios con mutantes de tomate deficientes en ABA muestran que semillas maduras presentan una mayor proporción de células en fase G2, corroborando la hipótesis de que el ABA endógeno es necesario para que se produzca la detención del ciclo celular en la fase G1 (Liu et al., 1994).

**Tabla I.1.** Clasificación de mutantes afectados en diferentes aspectos del desarrollo embrionario.

GEN	PROTEÍNA	MUTACIÓN	REFERENCIAS
<i>PIN1</i>	Proteína transportadora de auxinas (familia PIN).	Patrón de división celular aberrante en la hipófisis.	Friml et al., 2003.
<i>PIN4</i>	Proteína transportadora de auxinas (familia PIN).	Patrón de división aberrante en hipófisis y columela.	Friml et al., 2002a.
<i>PIN7</i>	Proteína transportadora de auxinas (familia PIN).	Patrón de división aberrante en hipófisis y célula apical.	Friml et al., 2003.
<i>GNOM</i>	Regulador endosómico de vesículas incipientes.	Ausencia de raíz en el embrión.	Mayer et al., 1993.
<i>YODA</i>	MAPKKK.	Desarrollo anormal del suspensor.	Lukowitz et al., 2004.
<i>MP</i>	Factor de respuesta a auxinas 5 (ARF5).	Ausencia de raíz e hipocotilo en el embrión.	Berleth et al., 1993; Hardtke et al., 1998.
<i>BDL</i>	Proteína IAA 12 (IAA12).	Ausencia de raíz en el embrión.	Hamann et al., 1999; Hamann et al., 2002.
<i>RSY 1,2,3</i>	Proteínas de función desconocida.	Desarrollo aberrante del suspensor; ausencia de raíz y cotiledones en el embrión.	Yadegari et al., 1994; Apuya et al., 2002.
<i>GURKE</i>	Proteína de función desconocida.	Formación defectuosa de los primordios de la raíz y cotiledones.	Torres-Ruiz et al., 1996.
<i>WOX2</i>	Factor transcripcional.	Patrón de división aberrante en la célula inicial apical.	Haecker et al., 2004.
<i>WOX8</i>	Factor transcripcional.	Patrón de división aberrante en la célula inicial basal.	Haecker et al., 2004.
<i>CUC1,2,3</i>	Factores transcripcionales.	Fusión de los cotiledones en el embrión.	Aida et al., 1997, 1999; Vroemen et al., 2003.
<i>HOBBIT</i>	Proteína reguladora del ciclo celular.	Patrón de división aberrante de la célula inicial basal; ausencia del meristemo de la raíz.	Willemsen et al., 1998.
<i>AXR6</i>	Ubiquitin ligasa.	Patrón de división aberrante de la célula inicial basal; ausencia del meristemo de la raíz.	Hobbie et al., 2000.
<i>PLT1,2</i>	Factores transcripcionales.	Patrón de división celular aberrante en la hipófisis, desarrollo anormal del centro quiescente.	Aida et al., 2004; Blilou et al., 2005.
<i>KNOLLE</i>	Sintaxina, fusión de membranas derivadas del Golgi.	Citocinesis alterada, células multinucleadas.	Lukowitz et al., 1996.
<i>FASS</i>	Proteína de función desconocida.	Patrón de división celular alterado en la hipófisis.	Berleth y Jürgens, 1993; Torres-Ruiz et al., 1994.
<i>HYDRA1</i>	Delta8-Delta7 esteroisomerasa.	Alteraciones en la formación del primordio vascular.	Topping et al., 1997.
<i>TWIN2</i>	Valyl-tRNA sintasa.	Divisiones celulares aberrantes en el suspensor.	Vernon y Meinke, 1994; Zhang y Somerville, 1997.
<i>SUS1 (DCL)</i>	PoL dominio RNA helicasa.	Divisiones celulares aberrantes en el suspensor.	Schwartz et al., 1994.

## 2.2. Papel de las hormonas en la embriogénesis.

Durante la embriogénesis se suceden una serie de eventos que aseguran el correcto posicionamiento de los tejidos y órganos del embrión, así como de las células que formarán parte de cada órgano, dando como resultado la formación de una plántula, el punto de partida para el resto de la vida de la planta. En este sentido, se sabe que las auxinas tienen un papel fundamental en el establecimiento del eje embrionario. En la primera división asimétrica que sufre el cigoto, las auxinas determinan el desarrollo diferencial de cada una de las dos células hijas resultantes: la célula apical responde a la acción de las auxinas y comienza a dividirse siguiendo un patrón vertical, mientras que la célula basal no presenta respuesta a esta fitohormona, siguiendo un patrón horizontal en su división (revisado en Weijers y Jürgens, 2005). El descubrimiento de que algunos genes que participan en el transporte de auxinas, tales como *PIN1*, *PIN4* y *PIN7* (Friml et al., 2002; Friml et al., 2003) (Tabla I.1), también se expresan en el embrión, pone de manifiesto la participación de las auxinas en la embriogénesis. El control temporal y espacial de la expresión de los genes *PIN* podría controlar el flujo de auxinas durante el desarrollo del embrión y con ello jugar un papel fundamental en el establecimiento del eje apical/basal del mismo. Mutantes en los genes *PIN1*, *PIN4* y *PIN7* muestran alteraciones en los patrones de división celular. Concretamente, los mutantes *pin7* en la célula apical y en la hipófisis (Friml et al., 2003), *pin4* en la columela inicial y en la hipófisis (Friml et al., 2002) y por último, *pin1* en la hipófisis (Friml et al., 2003). También se sabe que el establecimiento de un transporte de auxinas en el embrión es un requisito necesario para que se produzca la transición desde la fase globular a corazón.

Por otra parte, el ABA y la GAs son las dos hormonas que regulan la fase de maduración de las semillas. Los niveles de ABA aumentan con el inicio de la fase de maduración, empiezan a disminuir al final de dicha fase y son muy bajos durante la germinación, mientras que la concentración de GAs es muy baja durante la etapa de maduración y aumentan durante la germinación, de modo que el balance entre ambas hormonas podría promover el inicio de esta etapa (Hays et al., 2001). La función de las GAs durante la maduración de las semillas todavía se desconoce, pero podría estar relacionada con la supresión de la división celular (White et al., 2000; Hu et al., 2008).

El ácido jasmónico (JA) también juega un papel muy importante en el desarrollo embrionario, así como en la acumulación de sustancias de reserva (Staswick, 1990; He et al., 2002). Se sabe que mutantes *jai1* (*jasmonic acid insensitive 1*) en tomate no son capaces de formar semillas viables debido a la detención de la maduración del embrión en desarrollo (Li et al., 2001, 2004).

Las hormonas vegetales presentan complejas interacciones entre ellas para llevar a cabo la regulación de los diferentes procesos del desarrollo. De este modo, ABA y JA cooperan en la acumulación de sustancias de reserva durante la maduración del embrión de *Brassica napus*. Así, en tratamientos conjuntos de ABA y JA se produjo una mayor acumulación de mRNAs de oleosina que en aquellos tratamientos llevados a cabo con cada una de las hormonas por separado (Hays et al., 1999). Diversas observaciones indican que la capacidad del JA para inducir la expresión de los genes que codifican la oleosina y la napina en el embrión dependería de la concentración de ABA en la célula, de modo que el JA actuaría a través de la ruta de señalización del ABA (Hays et al., 1999). El JA induciría un paso limitante entre la transducción de la señal del ABA y la expresión del gen y además, podría alterar la concentración de ABA en el citoplasma mediante un descenso del pH, debido a que la compartimentación del ABA es pH-dependiente. Esta explicación implica que el JA requiere del ABA como intermediario en la expresión de genes inducidos por JA. Así, al añadir fluridona (un inhibidor de la biosíntesis del ABA) a embriones derivados de microsporas de *Brassica napus*, dejan de acumularse mRNAs de napina inducidos por JA.

### 2.3. Germinación de semillas.

La germinación puede definirse como el conjunto de procesos metabólicos y morfogénicos que tienen como resultado la transformación de un embrión en una plántula con potencial para llegar a ser una planta adulta.

El signo visible de la germinación es la aparición de la radícula (precursor de la raíz) a través de la cubierta de la semilla. Sin embargo, la germinación *sensu stricto* comienza con la toma de agua por parte de la semilla (imbibición) y finaliza con la elongación del eje embrionario dentro de la semilla (Bewley, 1997).

En climas templados, la mayoría de las semillas maduras constan de un embrión (formado por un eje embrionario y uno o más cotiledones) rodeado por un endospermo (tejido especializado de reserva) y una cubierta seminal (testa). Cuando son dispersadas de la planta madre, presentan un contenido en agua muy bajo (5-15%) y ausencia de actividad metabólica. Para que la germinación tenga lugar, es necesario que la semilla quiescente se hidrate bajo condiciones que estimulen la recuperación de la actividad biológica, tales como una temperatura adecuada y oxígeno. La absorción de agua por parte de la semilla, desencadena una serie de cambios metabólicos que incluyen la respiración, la síntesis proteica y la movilización de reservas.

En el proceso de germinación se pueden distinguir tres fases (Bewley, 1997; Azcón-Bieto y Talón, 2000; Manz et al., 2005):

- **Hidratación:** durante esta fase se produce una intensa absorción de agua por parte de los tejidos que forman la semilla, lo que ocasiona cambios en la permeabilidad de la semilla y con ello, la pérdida de solutos de bajo peso molecular como inhibidores de la germinación y ABA. Esta toma de agua va acompañada de un aumento en la actividad respiratoria.
- **Activación metabólica:** en esta fase la absorción de agua se reduce considerablemente y se producen los cambios metabólicos necesarios para el correcto desarrollo de la plántula.
- **Crecimiento:** en esta etapa aumenta la absorción de agua, la actividad respiratoria y se produce la emergencia de la radícula. Esto conlleva el cambio a un metabolismo aerobio que se mantendrá en el resto del desarrollo de la plántula y de la planta adulta.

La germinación está afectada por factores internos (propios de la semilla) y factores externos (propios del ambiente). Dentro de los primeros, cabe señalar la madurez de las semillas (morfológica y fisiológica) y su viabilidad. Se dice que una semilla está madura cuando ha alcanzado un completo estado de desarrollo, tanto desde un punto de vista morfológico como fisiológico. La madurez morfológica se da por finalizada cuando el embrión ha alcanzado su máximo desarrollo y para ello, se ha de producir una desecación de los tejidos de la semilla. Por otro lado, deben ocurrir una serie de transformaciones fisiológicas (pérdida de sustancias inhibitoras, acumulación de sustancias promotoras, reajustes en el equilibrio hormonal...) para que las semillas sean capaces de germinar. En cuanto a la viabilidad de las semillas, ésta se define como el periodo de tiempo durante el cual una semilla es capaz de germinar; este periodo es variable y depende de la semilla y de las condiciones de almacenamiento. Una semilla será tanto más longeva cuanto menor sea su actividad biológica, de modo que, ralentizando su metabolismo mediante desecación o almacenamiento a bajas temperaturas, se consigue aumentar su viabilidad.

Por lo que se refiere a los factores externos, la humedad, la temperatura y los gases, son las condiciones ambientales que más influyen en la germinación. Para que la semilla recupere el metabolismo, es necesaria la rehidratación de sus tejidos. La toma de agua se produce a través de las paredes celulares de la cubierta seminal por una diferencia de potencial hídrico entre la semilla y el medio que la rodea. La temperatura afecta a la germinación actuando sobre las enzimas que regulan las distintas reacciones bioquímicas que ocurren tras la rehidratación, debido a que cada enzima tiene una temperatura óptima de actuación. Por otro lado, la semilla requiere para su germinación de un medio que permita una adecuada disponibilidad de  $O_2$  y  $CO_2$  con el fin de obtener la energía necesaria para completar su desarrollo (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

Todos estos factores son necesarios para que se produzcan los cambios metabólicos requeridos para que la semilla recupere la actividad biológica. En primer lugar, se ha de producir un aumento en la actividad respiratoria con el fin de obtener energía, poder reductor y compuestos intermedios. Las rutas bioquímicas que permiten la obtención de ATP y pirimidín nucleótidos son la glicolisis, ciclo de las pentosas fosfato y ciclo de Krebs. A partir de la imbibición de la semilla seca, el proceso respiratorio puede dividirse en cuatro fases (Bewley y Black, 1983):

- **Fase I:** durante las primeras 12 horas se produce un aumento de la respiración proporcional a la hidratación de los tejidos de la semilla, siendo la sacarosa el principal sustrato energético.
- **Fase II:** la actividad respiratoria se estabiliza debido a que las cubiertas seminales, todavía intactas, limitan la entrada de O<sub>2</sub>.
- **Fase III:** como consecuencia de la emergencia radicular se rompe la testa, permitiendo una mayor entrada de O<sub>2</sub> en la semilla, provocando con ello un aumento de la actividad respiratoria, que es favorecida por la síntesis de mitocondrias.
- **Fase IV:** las reservas de los cotiledones han sido exportadas y disminuye la respiración.

Al iniciarse la germinación de las semillas se promueve la síntesis proteica, y con ello, la formación de enzimas hidrolíticas que permiten la movilización de sustancias de reserva, las cuales pueden estar almacenadas en el embrión (cotiledones) o en el tejido extraembrionario (endospermo). Las reservas se encuentran principalmente formando cuerpos intracelulares que contienen carbohidratos, lípidos, proteínas y compuestos inorgánicos. El hidrato de carbono de reserva más extendido en las semillas es el almidón, que se encuentra formando los granos de almidón, los cuales pueden adoptar formas características en cada especie (esféricas, poligonales...). En la hidrólisis del almidón, sus componentes, la amilosa y la amilopectina, son hidrolizados por la  $\alpha$ - y  $\beta$ -amilasas para dar glucosa. Los lípidos de reserva predominantes en la semilla son los triglicéridos. En la movilización de los lípidos participan tres tipos de estructuras como son, los cuerpos lipídicos (en los que se produce la degradación de los triglicéridos por parte de las lipasas para producir ácidos grasos y glicerol), los glioxisomas (en los que los ácidos grasos se oxidan hasta succinato) y mitocondrias (donde se produce la conversión de succinato hasta oxalacetato, el cual dará lugar a sacarosa en el citoplasma). Finalmente, la hidrólisis de las proteínas de reserva hasta péptidos y aminoácidos, está catalizada por proteasas; estos productos resultantes pueden ser empleados para la síntesis de nuevas proteínas o para proporcionar energía mediante la oxidación de su esqueleto carbonado en el citoplasma (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

No obstante, hay especies que presentan semillas que, aún en condiciones favorables, no germinan; esto es debido a un proceso denominado dormición. Este proceso adaptativo permite a las plantas sobrevivir frente a condiciones adversas para la vida. Las causas que determinan la dormición pueden estar presentes en la cubierta seminal o en el propio embrión. La dormición primaria comienza durante la fase de maduración y su mantenimiento en la semilla madura depende de factores genéticos y ambientales (Gubler et al., 2005). La dormición secundaria se puede iniciar en semillas maduras no durmientes provocada por condiciones ambientales desfavorables para la germinación (como elevadas temperaturas y anoxia). La eliminación de la dormición está controlada por complejas interacciones entre factores genéticos y ambientales, pudiendo ser facilitada por el almacenamiento (*after-ripening*) y por la estratificación (imbibición de las semillas a bajas temperaturas). El primer proceso necesario para la eliminación de la dormición es la captación de los estímulos por parte del embrión para que se produzca la transducción de la señal que dará lugar a cambios metabólicos y hormonales, dando lugar, como resultado final, a la emergencia del eje embrionario a través de las cubiertas de la semilla (revisado en Bewley, 1997)

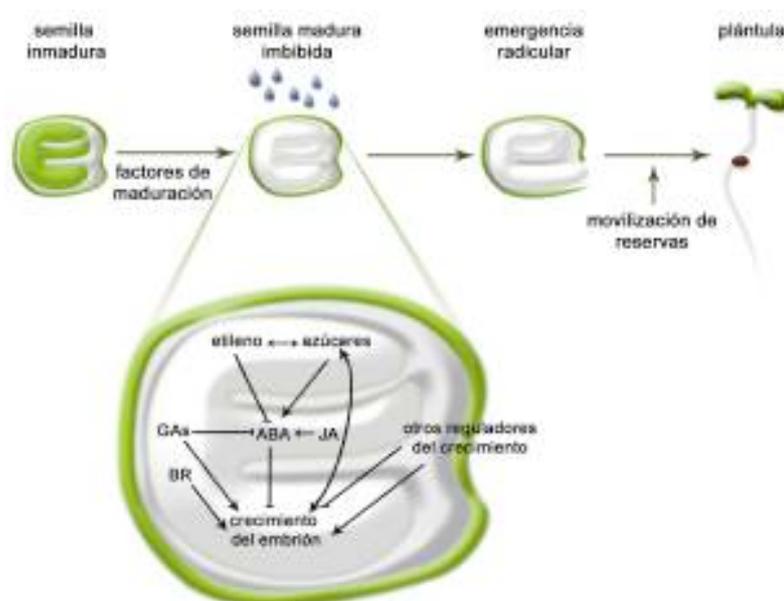
El endospermo, además de su función como almacén de sustancias de reserva, participa en el control de la germinación a través de la secreción de enzimas relacionadas con procesos de pérdida de rigidez de la pared celular, eliminando la resistencia mecánica de la capa del endospermo que dificulta la emergencia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

#### **2.4. Papel de las hormonas vegetales en la dormición y germinación de semillas.**

La germinación es uno de los procesos fisiológicos más profundamente influenciados por las hormonas vegetales (Figura I.2). Diversas evidencias apoyan la hipótesis de que la regulación de la germinación y la dormición de semillas se lleva a cabo a través de acciones hormonales opuestas. Por ejemplo, el ABA tiene una función determinante en el mantenimiento de la dormición y en la inhibición de la germinación de las semillas (Leung y Giraudat, 1998). El etileno (ET), por su parte, actúa estimulando positivamente la germinación (Satler et al., 1985; Abeles, 1986; Pirrello et al., 2006); en este mismo sentido, los brasinosteroides (BRs) también promueven la germinación. Así, tratamientos en los que se añaden ET y BRs de modo exógeno a mutantes deficientes en giberelinas (GAs), ponen de manifiesto un estímulo de la germinación en estas semillas mutantes (Steber y McCourt, 2001). Estos resultados indican que la germinación de semillas está determinada por el efecto de múltiples hormonas y sugiere la presencia de interacciones entre GAs, ABA, ET y BRs.

De todas las hormonas, son las GAs las que desarrollan un papel esencial en la germinación de *Arabidopsis thaliana* (Davies et al., 1985). Diversos estudios han demostrado

que esta hormona promueve la germinación de semillas de tipo silvestre en *Arabidopsis*, mientras que mutantes deficientes en GAs como *gal-1* presentan alteraciones en esta etapa del desarrollo (Debeaujon y Koornneef, 2000). Por otro lado, inhibidores de la síntesis de GAs, tales como el paclobutrazol y uniconazol, impiden la germinación de semillas (Nambara et al., 1991; Jacobsen y Olszewsky, 1993), sugiriendo que es necesaria la síntesis de GAs tras la imbibición para que se produzca la emergencia radicular. Todo ello demuestra que los niveles de GAs son determinantes para la germinación de semillas. Sin embargo, los mecanismos por los cuales se regulan los niveles de GAs no están todavía suficientemente aclarados. Por otro lado, parece que las GAs no están implicadas directamente en el control de la dormición. Así, en las semillas de algunas especies se produce un incremento en los niveles de esta hormona en respuesta a estímulos externos, si bien, no hay evidencias directas de que este incremento o su señalización sean importantes para la eliminación de la dormición (León-Kloosterziel et al., 1996; Chiwocha et al., 2005).



**Figura I.2. Interacciones hormonales en la germinación de semillas.** La regulación de la actividad biológica en las semillas hidratadas, se lleva a cabo por complejas interacciones hormonales. Las flechas hacen referencia a efectos inductores, mientras que las barras indican efectos inhibidores. Adaptado de Bentsink y Koornneef, 2002.

Además de las GAs, otras hormonas participan en la regulación positiva de la germinación. Así, se sabe que el ET estimula la germinación de mutantes deficientes en GAs (Gazzarrini y McCourt, 2003). Sin embargo, no está determinado si el ET puede revertir la dormición estimulada por ABA o si es capaz de estimular la germinación de un modo independiente a las GAs. En este mismo sentido, los BRs, además de controlar la elongación y división celular, participan en la regulación de la germinación y actuarían de un modo semejante a las GAs, ayudando a romper la dormición inducida por ABA y estimulando la

germinación, pudiendo llegar a ser necesarios para la normal germinación de semillas (Chen et al., 2004; Li et al., 2007).

Otras hormonas, como el ABA y los jasmonatos (JAs), regulan negativamente la germinación. Así, el ABA está implicado en el control de la expresión génica en semillas y desarrolla un papel principal en el establecimiento y mantenimiento de la dormición, así como en el bloqueo de la germinación. Varios estudios han revelado que el nivel de dormición podría depender de la sensibilidad a ABA más que del contenido de la hormona en la semilla, lo que indicaría que la eliminación de la dormición sería debida a cambios en la señalización del ABA (Bewley y Black, 1994). Sin embargo, estudios más recientes en los que se analiza la eliminación de la dormición mediante almacenamiento (*after-ripening*), estratificación y ausencia de luz, han correlacionado cambios en los niveles de ABA durante la imbibición con un correspondiente aumento en los porcentajes de germinación (Ali-Rachedi et al., 2004). Este tipo de tratamientos provoca la activación del catabolismo del ABA provocando con ello un descenso en el contenido de la hormona en el embrión y un aumento de los catabolitos procedentes de su degradación, tales como el ácido faseico (PA) y el ácido dihidrofaseico (DPA) (Jacobsen et al., 2004; Kushihiro et al., 2004). Los cambios en el contenido de ABA en semillas imbibidas podrían reflejar cambios en el equilibrio entre el metabolismo y el catabolismo de la hormona, predominando la síntesis en semillas durmientes y el catabolismo en semillas no durmientes. Estos resultados indicarían que la regulación del metabolismo del ABA en semillas maduras podría ser un elemento clave en la eliminación de la dormición.

Por su parte, los JAs inhiben la germinación en varias especies como *Brassica napus* o *Linum usitatissimum*, y en este sentido, tienen un efecto sinérgico con el ABA en la inhibición de la germinación de semillas en *Arabidopsis* (Wilén et al., 1991; Staswick et al., 1992; Ellis y Turner, 2002). Existen diversas teorías que explicarían el modo de interacción entre ambas hormonas. Una de ellas, indica que el JA estimula un incremento en los niveles endógenos de ABA (Melan et al., 1993), ya que se ha observado que los JAs inducen la expresión del gen que codifica la enzima lipoxigenasa, y se sabe que una enzima tipo lipoxigenasa (*lipoxigenase-like*) participa en la ruta de biosíntesis del ABA que parte de los carotenoides. Esta dependencia también fue observada por Staswick et al. (1992), quienes demostraron que el MeJA, que no es capaz de inhibir la germinación de semillas de *Arabidopsis* por sí solo, incrementaba la sensibilidad de las mismas al añadir ABA exógeno. En este estudio también se examinaron los índices de germinación de mutantes resistentes a JA sembrados en medios que contenían ABA, observándose que eran más bajos que en el tipo silvestre y poniendo de manifiesto su hipersensibilidad a ABA durante la germinación.

Los siguientes apartados de la presente memoria se centrarán en el estudio de la biosíntesis, mecanismos de acción y funciones de las hormonas ABA y JAs.

### **3. BIOSÍNTESIS, SEÑALIZACIÓN Y EFECTOS FISIOLÓGICOS DEL ÁCIDO ABSCÍSICO (ABA).**

El ABA es una sustancia reguladora del crecimiento que participa en muchos aspectos del desarrollo de las plantas, tales como la síntesis de proteínas y lípidos de reserva, inducción de la dormición, inhibición del proceso de germinación y transición del crecimiento vegetativo al crecimiento reproductivo (Leung y Giraudat, 1998; Rock, 1999; Rohde et al., 2000; Penfield et al., 2006). Además, el ABA participa en la respuesta a distintos tipos de estreses ambientales como bajas temperaturas, sequía, hipoxia, elevada salinidad, infecciones generadas por patógenos y heridas provocadas por insectos (Leung y Giraudat, 1998; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Adie et al., 2007; de Torres-Zabala et al., 2007). Estas respuestas se producen a diferente velocidad tras generarse el estímulo: el cierre de los estomas en respuesta a la sequía es relativamente rápido y únicamente requiere modificaciones en la actividad de varias moléculas señalizadoras y canales iónicos, mientras que el resto de respuestas son más lentas y necesitan de cambios en la expresión génica. En cualquier caso, estas respuestas a ABA, rápidas y lentas, requieren la acción de elementos de señalización tanto comunes como específicos, además de la actuación de segundos mensajeros y componentes de cascadas de fosforilación.

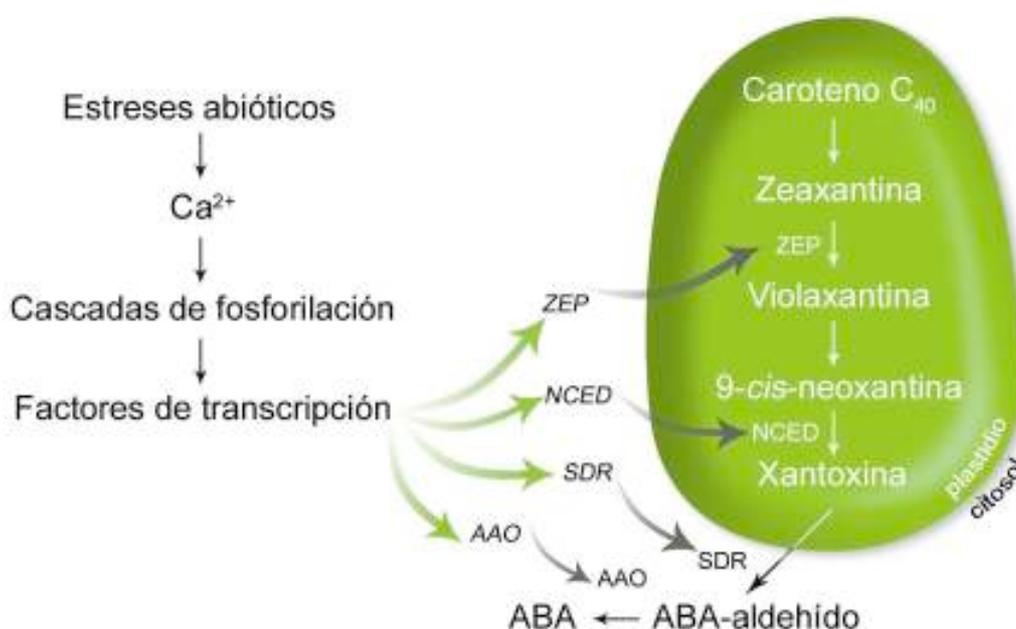
#### **3.1. Biosíntesis del ABA.**

En la actualidad, el estudio de mutantes deficientes en la biosíntesis del ABA, principalmente en *Arabidopsis*, ha permitido aumentar nuestro conocimiento sobre los intermediarios que participan en la ruta de biosíntesis de esta hormona (Tabla I.2). La información procedente de *Arabidopsis* es aplicable a otras especies de plantas, porque los genes implicados en esta ruta de biosíntesis están muy conservados en angiospermas. Estos estudios sugieren que en plantas superiores, el ABA se sintetiza a partir de una ruta indirecta que parte de un precursor de carotenoides C<sub>40</sub>, seguida de una conversión en dos pasos del intermediario xantoxina hasta ABA vía ABA-aldehído (Finkelstein et al., 2002; González-Guzmán et al., 2002; Schwartz et al., 2004).

**TABLA I.2.** Clasificación de los mutantes de distintas especies vegetales relacionados con el ABA (adaptada de Finkelstein et al., 2002).

MUTACIÓN	ESPECIE	PRODUCTO GÉNICO	REFERENCIAS
<b>MUTANTES DEFICIENTES EN ABA</b>			
<i>aba1</i>	<i>A. thaliana</i>	Zeaxantina epoxidasa.	Koornneef et al., 1982; Ishitani et al., 1997; Niyogi et al., 1998; Xiong et al., 2001, 2002.
<i>aba2</i>	<i>A. thaliana</i>	Conversión de xantoxina a ABA-aldehído.	Leon-Kloosterziel et al., 1996; Laby et al., 2000; Rook et al., 2001.
<i>aba3</i>	<i>A. thaliana</i>	Aldehído oxidasa: adición de azufre al cofactor de molibdeno de ABA oxidasa.	Léon-Kloosterziel et al., 1996; Llorente et al., 2000; Rook et al., 2001; Xiong et al., 2001.
<i>vp2, vp14</i>	<i>Z. mays</i>	Biosíntesis de carotenoides.	Robertson, 1955; Neill et al., 1986; Schwartz et al., 1997.
<i>fic, sit</i>	<i>L. esculentum</i>	Oxidación de ABA-aldehído a ABA.	Tal y Nevo, 1973; Taylor et al., 1988.
<i>aba1</i>	<i>N. plumbaginifolia</i>	Oxidación de ABA-aldehído a ABA.	Rousselin et al., 1992.
<i>ao3</i>	<i>A. thaliana</i>	Aldehído oxidasa.	Seo et al., 2000.
<b>MUTANTES INSENSIBLES A ABA</b>			
<i>abi1</i>	<i>A. thaliana</i>	Protein-fosfatasa 2C.	Koornneef et al., 1982; Leung et al., 1994; Meyer et al., 1994.
<i>abi2</i>	<i>A. thaliana</i>	Protein-fosfatasa 2C.	Koornneef et al., 1982; Leung et al., 1997; Rodríguez et al., 1998.
<i>abi3</i>	<i>A. thaliana</i>	Factor de transcripción específico de semillas, dominio B3.	Koornneef et al., 1982; Giraudat et al., 1992.
<i>abi4</i>	<i>A. thaliana</i>	Factor de transcripción específico de semillas, dominio APETALA2.	Finkelstein, 1994; Arenas-Huertero et al., 2000; Huijser et al., 2000; Laby et al., 2000; Rook et al., 2001.
<i>abi5</i>	<i>A. thaliana</i>	Factor de transcripción, dominio bZIP.	Finkelstein, 1994; Finkelstein y Lynch, 2000; López-Molina y Chua, 2000.
<i>abi8</i>	<i>A. thaliana</i>	Proteína de 533 aa de función desconocida.	Finkelstein et al., 1998; Brocard-Gifford et al., 2004.
<i>vp1</i>	<i>Z. mays</i>	Factor de transcripción específico de semillas, dominio B3.	Robertson, 1955; McCarty et al., 1991.
<i>cpr22</i>	<i>A. thaliana</i>	Transportador de iones.	Mosher et al., 2010.
<i>chotto1</i>	<i>A. thaliana</i>	Factor de transcripción, dominio APETALA2.	Yamagishi et al., 2009; Yano et al., 2009.
<i>tos1</i>	<i>L. esculentum</i>	Proteína de función desconocida.	Jurado et al., 2009.
<b>MUTANTES HIPERSENSIBLES A ABA</b>			
<i>abh1</i>	<i>A. thaliana</i>	Proteína de unión a RNA.	Hugouvieux et al., 2001.
<i>era1</i>	<i>A. thaliana</i>	Farnesil transferasa, subunidad β.	Cutler et al., 1996.
<i>era3</i>	<i>A. thaliana</i>	Alélo de ein2, sensor metálico unido a membrana.	Alonso et al., 1999; Ghassemian et al., 2000.
<i>cyp707a</i>	<i>A. thaliana</i>	ABA 8'-hidroxilasa, catabolismo del ABA.	Okamoto et al., 2006; Umezawa et al., 2006; Matakiadis et al., 2009.
<i>ahg2-1</i>	<i>A. thaliana</i>	Ribonucleasa específica de poly(A).	Nishimura et al., 2009.

El primer paso en la biosíntesis del ABA (Figura I.3) es la epoxidación de zeaxantina y anteraxantina hasta violaxantina y está localizado en los plastidios. Esta transformación está catalizada por una zeaxantina epoxidasa (ZEP). Después de una serie de modificaciones moleculares, la violaxantina es transformada a 9-*cis*-epoxicarotenoide. La hidrólisis oxidativa del epoxicarotenoide más representativo, 9-*cis*-neoxantina, por la 9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED), da lugar a la formación de un intermediario C<sub>15</sub>, la xantoxina, que es exportada al citosol donde es convertida a ABA. Una alcohol deshidrogenasa/reductasa (SDR) cataliza el primer paso de esta reacción y genera ABA-aldehído. Finalmente, la enzima ABA-aldehído oxidasa (AAO) cataliza el último paso de la ruta de biosíntesis del ABA.



**Figura I.3. Síntesis del ácido abscísico (ABA).** Los estreses abióticos (salinidad, sequía...) inducen la expresión de los genes que participan en la biosíntesis del ABA desde el precursor carotenoide C<sub>40</sub>. ZEP: zeaxantina epoxidasa. NCED: 9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa. SDR: alcohol deshidrogenasa/reductasa. AAO: aldehído oxidasa.

Por lo que se refiere a la regulación de su biosíntesis, hay evidencias de que azúcares solubles, estreses ambientales (sequía, salinidad) y el propio ABA, son señales que activan la síntesis del ABA en semillas en desarrollo. Además, otras señales como la luz podrían regular también su biosíntesis directa o indirectamente (Seo et al., 2009). Los altos niveles de ABA presentes en las plantas tras estos tipos de estreses, son consecuencia de un aumento en la síntesis *de novo* de esta hormona. Tales estreses provocan un incremento de los niveles de Ca<sup>2+</sup>, y a través de cascadas de fosforilación, se produce la activación de factores de transcripción (FTs) que a su vez inducen la expresión de genes que codifican las enzimas implicadas en la

biosíntesis del ABA. Así, se sabe que los niveles de expresión del gen *ZEP* de *Arabidopsis* (a pesar de tener una alta expresión basal en todos los tejidos de la planta) aumentan por sequía y elevada salinidad en tallos y raíces (Xiong et al., 2002), poniendo de manifiesto que el gen *AtZEP* está regulado por estrés. Estudios de expresión llevados a cabo con otros genes que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis del ABA (*NCED*, *AAO3*), revelan que son inducidos por sequía y estrés salino (Tan et al., 1997; Barrero et al., 2005; Barrero et al., 2006).

Al igual que en la mayoría de rutas de biosíntesis, el ABA también controla su propia acumulación. Durante mucho tiempo se creía que el ABA regulaba negativamente su síntesis mediante la activación de enzimas catabólicas (Cutler y Krochko, 1999). Sin embargo, estudios con líneas mutantes revelaron que ciertos genes de la síntesis del ABA (*ZEP*, *AO3*) además de estar regulados por estrés, estaban inducidos por ABA (Xiong et al., 2001, 2002). Por otra parte, el catabolismo del ABA en plantas se lleva a cabo a través de diferentes rutas, si bien, en todas ellas se producen dos tipos de reacciones que incluyen la hidroxilación de la molécula de ABA y la conjugación de los metabolitos resultantes hasta glucosa (Nambara y Marion-Poll, 2005). En la mayor parte de las plantas la hidroxilación ocurre en los carbonos 7', 8' y 9' (Zhou et al., 2004), siendo la hidroxilación en el C-8' la predominante en la mayoría de los procesos fisiológicos regulados por ABA (Nambara y Marion-Poll, 2005). La hidroxilación del ABA en el C-8' está catalizada por una citocromo P450 monooxigenasa produciendo 8'-hidroxi-ABA, que se isomeriza espontáneamente a PA, un catabolito con escasa actividad biológica (Krochko et al., 1998). Recientemente, se han identificado en *Arabidopsis* los genes *P450 CYP707A* que codifican las enzimas ABA 8'-hidroxilasas capaces de hidrolizar *in vitro* el ABA hasta PA (Kushiro et al., 2004; Okamoto et al., 2006).

El balance entre la síntesis y el catabolismo de esta hormona determina la regulación de un gran número de procesos controlados por ABA tales como la dormición, la germinación de las semillas y las respuestas frente a estreses osmóticos. Los niveles endógenos de ABA cambian drásticamente durante el desarrollo de semillas, la germinación y el crecimiento de las plantas en respuesta a cambios en el desarrollo y en el medio. De este modo, mientras que el contenido de ABA es muy elevado durante los estadios intermedios de la maduración de semillas, decrece considerablemente durante la fase de desecación. Asimismo, se sabe que la germinación está precedida por un descenso en el contenido de ABA en la semilla como resultado de una disminución de su síntesis y la activación de su catabolismo (Feurtado et al., 2004; Kushiro et al., 2004). Cuando los niveles de ABA decrecen durante la imbibición, se detecta un incremento de los metabolitos procedentes de su catabolismo como PA/DPA como consecuencia de un incremento en la inducción del gen *CYP707A2* (Kushiro et al., 2004).

### 3.2. Percepción del ABA.

Tras llegar a su lugar de acción, el ABA ha de ser reconocido por un receptor específico. Algunos estudios sugieren que hay varios tipos de receptores, tanto intracelulares como extracelulares.

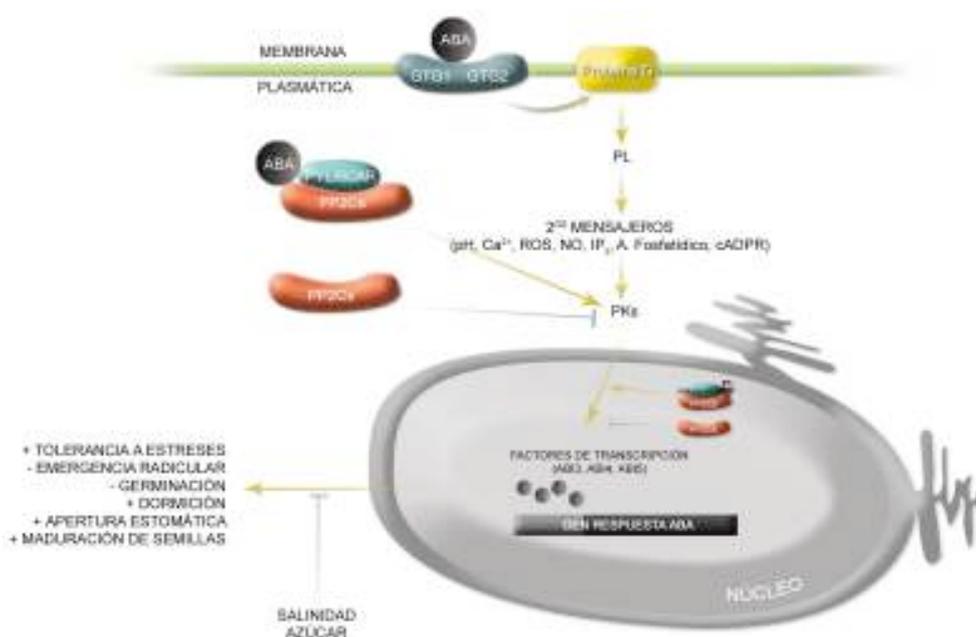
En los años 2006 y 2007 se identificaron tres proteínas a las que se asignó el papel de receptores de ABA (revisado en Novikova et al., 2009). FCA (*Flowering Time Control Protein Alpha*) una proteína de unión a RNA que participa en la regulación de la floración (Razem et al., 2006). Otro hipotético receptor encontrado es la subunidad H del complejo  $Mg^{2+}$ -quelatasa (CHLH), denominada ABAR, implicada en las respuestas a ABA durante la germinación, en el desarrollo post-germinativo, así como en el movimiento estomático (Shen et al., 2006). Por último, GCR2 (*G Protein Coupled Receptor 2*) es una proteína transmembrana que interactúa con la subunidad  $\alpha$  de una proteína G trimérica (Liu et al., 2007). Sin embargo, trabajos recientes cuestionan el papel de estas tres proteínas como receptores de ABA (Gao et al., 2007; Risk et al., 2008; Müller et al., 2009).

Por otro lado, se han identificado dos proteínas localizadas en el plasmalema de la célula capaces de unir ABA fisiológicamente activo que podrían actuar como receptores de ABA: GTG1 y GTG2 (*GPCR-Type G Proteins 1 and 2*) (Pandey et al., 2009). En cualquier caso, la delección de ambas proteínas no elimina completamente las respuestas a ABA, lo que pone de manifiesto la existencia de otros receptores alternativos.

En este sentido, se ha identificado una familia de 14 proteínas que presentan un dominio START denominadas PYR/PYLs (*Pyrabactin Resistance 1-PYR-Like*), también conocidas como RCARs (*Regulatory Component of ABA Receptor*), capaces de interaccionar e inhibir a proteín-fosfatasa de tipo 2C (PP2Cs) tras unirse a ABA (Ma et al., 2009; Park et al., 2009). Recientemente, se ha establecido el modo de interacción entre el ABA y estos receptores. El ABA provoca cambios conformacionales en las proteínas PYR/PYL, permitiendo su unión con las PP2Cs a través del centro activo de éstas, inhibiendo de este modo su actividad fosfatasa (Melcher et al., 2009; Miyazono et al., 2009; Yin et al., 2009). En presencia de la hormona, se produce el cierre de dos dominios  $\beta$ -loop altamente conservados presentes en las proteínas receptoras y que actúan como “puerta de entrada” para el ligando, provocando la formación de un punto de unión con las PP2Cs (*gate-latch interface*) (Melcher et al., 2009). En el apartado siguiente se profundizará en el estudio de esta interacción.

### 3.3. Señalización del ABA.

Análisis bioquímicos, farmacológicos y genéticos, han mostrado que tras la unión del ABA al receptor comienza la cascada de transducción de la señal hormonal, en la que participan diversos componentes como proteínas G, fosfolipasas, segundos mensajeros ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{IP}_3$ ...), proteín-fosfatasa, proteín-quinasas y FTs (Finkelstein et al., 2002; Assmann, 2004). En la figura I.4 aparecen representados los componentes implicados en la ruta de señalización del ABA así como su localización intracelular.



**Figura I.4. Receptores e intermediarios de la señalización del ácido abscísico (ABA).** El ABA se une a los receptores (GTG1/GTG2, PYR-PYL/RCAR), poniendo en funcionamiento un intrincado mecanismo de señalización, en el que participan proteínas G, fosfolipasas (PL) y segundos mensajeros que interaccionan con proteín-quinasas (PKs) y proteín-fosfatasa de tipo 2C (PP2Cs), que a su vez modifican FTs, activando o reprimiendo genes de respuesta a ABA.

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

En cuanto a los segundos mensajeros, se ha observado que tras un tratamiento exógeno con ABA se produce un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  y ácido fosfatídico en la célula. Además, otros

segundos mensajeros como las especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico (NO) y fosfolípidos como el fosfatidilinositol 3-fosfato o el inositol-trifosfato (IP<sub>3</sub>), están implicados en la regulación de los niveles de Ca<sup>2+</sup> (Fan et al., 2004; Israelsson et al., 2006). El pH es otro factor que podría actuar como segundo mensajero en la señalización del ABA. En concreto, se sabe que participa en el cierre estomático de las células guarda mediado por ABA a través de un descenso en los niveles de K<sup>+</sup> citosólico, provocado por un incremento en la actividad del canal de salida de K<sup>+</sup> (GORK) y una disminución en su entrada (Grabov y Blatt, 1998).

Después de la actuación de los segundos mensajeros, interviene una compleja red de reguladores positivos y negativos, principalmente proteín-kinasas y proteín-fosfatasa, así como un gran número de FTs. Estos dos últimos componentes moleculares se estudiarán en mayor profundidad en los apartados 3.3.1 y 3.3.2 de esta introducción, respectivamente.

Diferentes investigaciones han revelado la conexión entre las PP2Cs y las proteín-kinasas (PK), particularmente con SnRK2 y SnRK3. Así, se ha observado que SnRK2 participa en el cierre estomático regulando la expresión de genes inducidos por ABA, además de en las respuestas a estrés durante la germinación (Yoshida et al., 2002, 2006; Fujii et al., 2007). El descubrimiento de OST1 (*Open stomata 1*)/SRK2E/SnRK2.6, como un elemento clave en la apertura estomática en respuesta a ABA y que interacciona directamente con la proteína ABI1, puso de manifiesto una compleja conexión entre PP2C y SnRK2. Para que se produzca la activación de estas kinasas, es necesaria la fosforilación de algunos residuos de Ser/Thr, poniendo de manifiesto que otras kinasas podrían actuar aguas arriba de SnRK2 en la señalización del ABA. Por otro lado, puesto que otros residuos aminoacídicos podrían ser autofosforilados (Belin et al., 2006), y que algunos estímulos podrían gobernar esta autofosforilación, se cree que las PP2Cs podrían regular la fosforilación de estos residuos (Figura I.5). En estudios recientes donde se analizó el triple mutante *knockout* en las tres proteínas que integran la subclase III de la familia SnRK2 (SnRK2D, SnRK2E y SnRK2I), se pudo comprobar como la inactivación de estas proteín-kinasas conducía a fenotipos de insensibilidad a ABA y ausencia de actividad ABA-kinasa, lo que indica que las SnRK2s desarrollan un papel fundamental en las respuestas mediadas por ABA (Umezawa et al., 2009).

En los últimos años, se han encontrado evidencias de la implicación del ABA en el metabolismo del RNA. Alteraciones en los componentes que participan en el procesamiento del RNA, incluido el transporte desde el núcleo hasta el citoplasma y su degradación, dan lugar a cambios en las respuestas a ABA. Así, modificaciones en el complejo CBC (*Cap Binding Complex*) de unión al extremo 5' del RNA, dan lugar a fenotipos de hipersensibilidad a ABA (Hugouvieux et al., 2001; Papp et al., 2004). Un estudio reciente indica que el ABA modula la expresión de los genes más abundantes, y para ejercer los cambios en su expresión, podría requerir de una regulación muy exhaustiva del procesamiento del RNA (Nemhauser et al.,

2006). Por lo tanto, defectos en el funcionamiento de la expresión génica o en la regulación post-transcripcional podrían alterar las respuestas a ABA.

### 3.3.1. Proteín-fosfatasas de tipo 2C (PP2Cs).

La fosforilación y desfosforilación de sustratos está implicada en una gran variedad de procesos y todo ello requiere la acción coordinada de proteín-fosfatasas y kinasas, constituyendo el mecanismo general de transmisión de señales desde el medio extracelular hacia el interior de las células (revisado en Rodríguez, 1998). Las proteín-fosfatasas proporcionan reversibilidad a los mecanismos de fosforregulación, gobernando de este modo un amplio espectro de procesos en *Arabidopsis* como el transporte de auxinas y la señalización del ABA (Wang et al., 2007).

En función del sustrato sobre el que actúan, las proteín-fosfatasas pueden ser divididas en tirosina fosfatasas (PTPs) y serina/treonina fosfatasas. A su vez, las serina/treonina fosfatasas incluyen dos familias génicas compuestas por fosfoproteínas fosfatasas (PPPs) y serina/treonina proteín-fosfatasas dependientes de magnesio ( $Mg^{2+}$ ) o manganeso ( $Mn^{2+}$ ) (PPM). Las PPPs, por su parte, incluyen las fosfatasas de tipo 1 (PP1), fosfatasas de tipo 2A (PP2A) y fosfatasas de tipo 2B (PP2B), mientras que las PPM incluyen las proteín-fosfatasas de tipo 2C (PP2C) y las fosfatasas piruvato deshidrogenasas. En el genoma de *Arabidopsis* se han identificado 112 secuencias que presentan el dominio catalítico típico de las proteín-fosfatasas (Schweighofer et al., 2004).

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

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

En *Arabidopsis* las 76 PP2Cs se clasifican en 10 grupos (A-J). Dentro del grupo A se encuentran proteín-fosfatasas implicadas en la regulación de la ruta de señalización del ABA tales como ABI1, ABI2, HAB1 (*Homology to ABI1 and ABI2*) y AtPP2CA. Diversos análisis genéticos han revelado que todas ellas actúan como reguladores negativos de esta ruta de

señalización, interaccionando e inhibiendo a las proteín-kinasas SnRK2s (Park et al., 2009). Así, mutantes de pérdida de función de estos genes muestran fenotipos similares de hipersensibilidad a ABA, mientras que mutaciones dominantes hipermórficas provocadas por sustituciones equivalentes de Gly por Asp en el dominio catalítico de la proteína (ABI1<sup>G180D</sup>, ABI2<sup>G168D</sup>, HAB1<sup>G246D</sup>), provocan fenotipos de insensibilidad en diversas respuestas mediadas por ABA (Koornneef et al., 1984; Robert et al., 2006).



**Figura I.5. Modelo de señalización del ABA mediada por los receptores PYR/PYL/RCAR y PP2Cs.** En ausencia de ABA las PP2Cs desfosforilan e inactivan a las SnRKs. En presencia de la hormona las proteínas PYR/PYL/RCAR interaccionan con las PP2Cs inhibiendo su actividad represora sobre las SnRKs. Mutaciones dominantes en las PP2Cs como *abi1-1* impiden la interacción PYR/PYL/RCAR-PP2C. En la figura aparecen representados los tres dominios funcionales de las proteínas SnRKs (KD, I y II). Adaptado de Umezawa et al., 2009.

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

fosforilar los factores transcripcionales ABFs induciendo la expresión de genes de respuesta a ABA tales como *RD29B* (*Responsive to Dehydration 29B*) (Fujii et al, 2009; Nakashima et al., 2009; Umezawa et al., 2009) (Figura I.5). Sin embargo, mutaciones dominantes en el dominio catalítico de las PP2Cs, tales como *abi1-1* o *abi2-1*, impiden que se produzca la unión entre las proteínas PYR/PYL/RCAR y las PP2Cs, de modo que estas últimas desfosforilan constitutivamente a las SnRKs, generando fenotipos de insensibilidad a ABA (Figura I.5).

### 3.3.2. Factores transcripcionales.

Del mismo modo que ocurre en otras rutas de señalización, las respuestas a ABA conducen a cambios en la expresión génica. Los elementos reguladores responsables de estos cambios han sido identificados a través de aproximaciones genéticas y bioquímicas, identificándose diferentes clases de factores *trans* implicados en la regulación transcripcional de la respuesta a ABA (Tabla I.2), entre los que se encuentran proteínas bZIP (*Leucine Zipper Basic*), proteínas con dominio B3, AP2/EREBP, MYC/MYB y proteínas con homeodominio junto a una cremallera de leucina (HD-Zip) (Finkelstein et al., 2002). Las secuencias reguladoras más comunes que confieren especificidad de respuesta a ABA son los elementos de respuesta a ABA G-box (ABRE, *ABA-Responsive Element*) reconocidos por factores transcripcionales de la familia b-ZIP, secuencias ricas en GC presentes en elementos de respuesta a sequía (DRE, *Dehydration-Responsive Element*) y CEs (*Coupled Elements*) reconocidos por proteínas de la familia APETALA2 (AP2) o elementos RY/Sph a los que se unen proteínas con dominio B3. Además, muchos genes regulados por ABA contienen lugares de unión para TFs de la familia MYB y MYC. De igual forma, miembros específicos de las familias de proteínas HD-ZIP (*Homeodomain-leucine zipper*), NAC (*No apical meristem/Ataf/CupShaped cotyledons*), WRKY, bHLH (*Non MYC basic helix-loop-helix*) y dedos de Zn también participan en algunas respuestas a ABA.

Se han encontrado 81 genes que codifican factores bZIP (aunque probablemente gran parte de ellos no estén implicados en la señalización del ABA), entre los que se encuentra *ABI5* (*ABA insensitive 5*) (Finkelstein y Lynch, 2000; Uno et al., 2000) relacionado con la regulación de la germinación, crecimiento vegetativo y respuestas a sequía mediadas por ABA. La familia B3 incluye los TFs *ABI3/VP1* (*ABA insensitive 3/Viviparous1*), implicados en la regulación de genes inducidos por ABA (como *RABI8*) y en las respuestas a ABA relacionadas con la maduración de semillas y crecimiento de la raíz (Nakamura et al., 2001), y finalmente, los TFs *FUS3* (*Fusca 3*) y *LEC2* (*Leafy cotyledon 2*) que participan también en el desarrollo de las semillas (revisado en Suzuki y McCarty, 2008). Dentro de la familia AP2/EREBP cabe destacar la proteína *ABI4* (*ABA insensitive 4*) necesaria para que se produzca la respuesta a

ABA. El mutante *abi4* presenta insensibilidad a ABA y es resistente a concentraciones elevadas de azúcar y sal durante la germinación de semillas (Soderman et al., 2000). Se han encontrado dos proteínas pertenecientes a las familias MYB y MYC (AtMYB2 y AtMYC2, respectivamente) implicadas en el control de las respuestas a estrés hídrico reguladas por ABA (Abe et al., 2003; Lorenzo et al., 2004). Recientemente, se han identificado varios genes con dominio NAC como *ANAC019*, *ANAC055*, *ANAC072* y *ATAF1* inducidos por sequía, salinidad y ABA, y cuyos productos génicos se unen a secuencias específicas de genes de respuesta a estreses como *ERDI* (Tran et al., 2004; Lu et al., 2007).

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

### **3.4. Efectos fisiológicos del ABA.**

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

#### **3.4.1. Maduración y dormición de semillas.**

La maduración de las semillas comienza cuando cesa el crecimiento del embrión por división celular y se inicia el crecimiento por elongación de las células y el almacenamiento de sustancias de reserva. Esta transición coincide con un aumento de ABA en la semilla, que

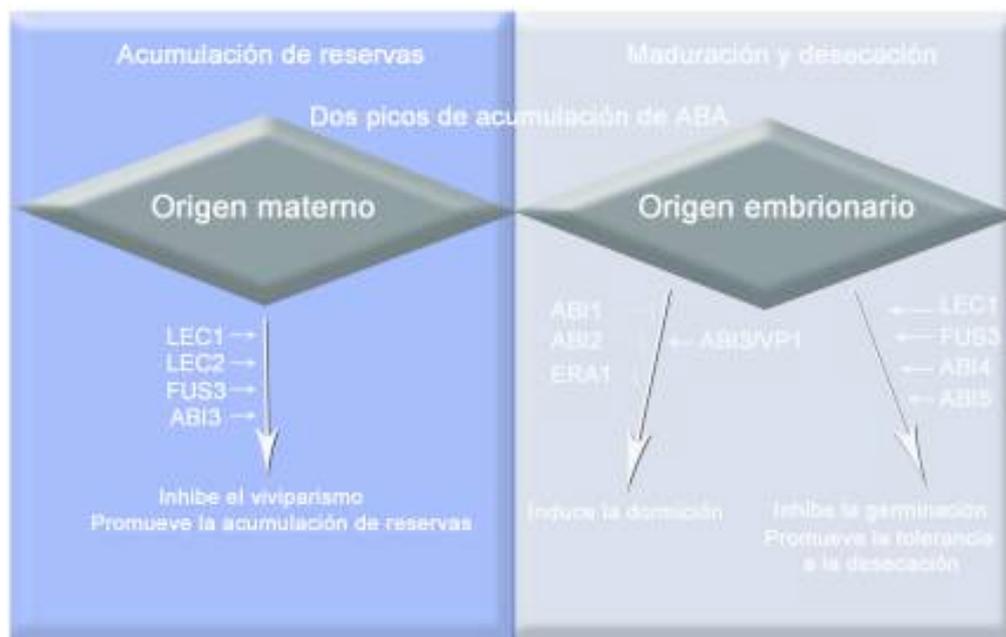
puede inducir la expresión de un inhibidor de kinasas dependiente de ciclinas (ICK1) (Wang et al., 1998) que permitiría la transición G1/S del ciclo celular.

Se sabe que FTs inducidos por ABA regulan la transcripción de genes que codifican proteínas de reserva imprescindibles para que se produzca tolerancia a la desecación en las semillas (revisado en Braybrook y Harada, 2008). Así, algunos aspectos de la maduración de semillas, tales como la acumulación de sustancias de reserva y la expresión de genes *LEA* (*Late-Embryogenesis-Abundant*), son controlados por la acción coordinada de varios FTs. Las secuencias promotoras de tales genes, contienen elementos esenciales que les confieren especificidad de respuesta a hormonas y de tejido (Busk y Pages, 1998). En este sentido, mutantes con una respuesta disminuida a ABA son incapaces de acumular proteínas de reserva en las semillas (Carles et al., 2002; Penfield et al., 2006).

De todos los FTs conocidos que regulan la expresión génica durante la embriogénesis media/tardía, algunos como ABI3/VP1, ABI4 y ABI5, también regulan alguna de las respuestas a ABA, mientras que otros como LEC1 (*Leafy Cotyledon 1*) LEC2 (*Leafy Cotyledon 2*) y FUS3 (*Fusca3*), regulan principalmente la transición entre la embriogénesis y la fase de crecimiento. Sin embargo, esta distinción no es tan sencilla, ya que diversos estudios señalan que la mayoría de los reguladores del desarrollo embrionario y FTs, presentan complejos patrones de regulación e interacciones directas. En cualquier caso, mutantes de pérdida de función en estos genes no presentan tolerancia a la desecación durante la maduración de las semillas (revisado en Suzuki y McCarty, 2008).

Durante la maduración de semillas en muchas especies de plantas, hay dos picos en el contenido de ABA (Fig. I.6). En algunas especies, como en *Brassica napus* (colza), estos picos se correlacionan con una baja germinación de embriones aislados (Finkelstein et al., 1985), mientras que en otras, como en maíz, no existe esta correlación (Rivin y Grudt, 1991). Estudios genéticos en *Arabidopsis*, han demostrado que el primer pico en contenido de ABA está determinado maternalmente y precede a la fase de maduración (Koornneef et al., 1989). Este hecho es esencial para evitar la maduración prematura en la fase de división celular de la embriogénesis. El segundo pico en el contenido de ABA en semillas de ecotipo silvestre de *Arabidopsis*, se produce por la síntesis de ABA en el propio embrión (Koornneef et al., 1989). Aunque la acumulación de ABA en el embrión es sólo una tercera parte de los niveles acumulados a los diez días tras la polinización, es esencial para la inducción de la dormición, que se mantiene a pesar de la disminución en los niveles de hormona de hasta seis órdenes durante la maduración de la semilla. Por otro lado, el contenido en ABA en semillas secas de ecotipo silvestre de *Arabidopsis*, es únicamente 1.4 veces superior al existente en mutantes no durmientes, sugiriendo que el ABA endógeno no es la única señal para el mantenimiento de la dormición en las semillas maduras. En cualquier caso, comparaciones de semillas durmientes y semillas

no durmientes de coliflor, cebada y tabaco, han revelado que la dormición está relacionada con la síntesis *de novo* de ABA durante la imbibición (Le Page-Degivry y Garello, 1992; Grappin et al., 2000).



**Figura I.6.** Esquema de las vías de señalización del ABA en el desarrollo de las semillas. Adaptado de Finkelstein et al., 2002.

A pesar de las evidencias de la implicación del ABA en la dormición, se sabe que es un proceso controlado por muchos factores. Así, en algunos mutantes de *Arabidopsis* con dormición reducida como *ordo1* (*reduced dormancy 1*) y *dag1* (*dof affecting germination 1*) los niveles de ABA y la sensibilidad a esta hormona son similares a los mostrados por el ecotipo silvestre (Leon-Kloosterziel et al., 1996a). En este sentido, la mayoría de los mutantes testa-deficientes tienen también una dormición disminuida (Debeaujon et al., 2000), lo que podría indicar que las GAs son necesarias para superar la dormición impuesta por ABA y por las cubiertas de la semilla (Debeaujon y Koornneef, 2000).

### 3.4.2. Germinación de semillas.

La germinación de semillas maduras de *Arabidopsis* puede ser suprimida por bajas concentraciones de ABA. Sin embargo, se desconoce si la supresión de la germinación requiere la síntesis *de novo* de ABA, en cuyo caso, el ABA producido durante la embriogénesis podría ser irrelevante para causar tal efecto.

Por otro lado, durante la germinación de semillas el ABA interactúa con otras hormonas, como las GAs, BRs, ET (en este caso antagonizando sus efectos) y el JA (estableciendo interacciones positivas y negativas con el ABA). Uno de los efectos mejor estudiados del ABA durante la germinación, es su relación antagónica con las GAs sobre la movilización de sustancias de reserva (Lovegrove y Hooley, 2000). La movilización del almidón está catalizada por la activación de  $\alpha$ -amilasas, una familia de enzimas sujeta a una regulación temporal, espacial, hormonal y metabólica desigual que afecta a la expresión génica en múltiples niveles, incluyendo la transcripción, estabilidad del mRNA y la secreción de enzimas dentro del endospermo. Las GAs promueven la expresión de genes de respuesta a  $\alpha$ -amilasa mediante la síntesis del FT GAMyb, que se une específicamente a elementos de respuesta a GAs (Gubler et al., 1995). Estos elementos de respuesta a GAs también son necesarios para la regulación negativa mediada por ABA (Hoecker et al., 1995).

En la capa de aleurona de semillas maduras y viables de cebada, el ABA induce la expresión de una proteína-quinasa, PKABA1, que reprime la inducción por GAs del FT GAMyb (Gómez-Cadenas et al., 1999, 2001). La inhibición mediada por PKABA1 no puede ser neutralizada en el mutante *slender*, que presenta ausencia constitutiva de respuesta a GAs, indicando que PKABA1 actúa aguas abajo del paso regulado por SLENDER. El mutante *abi-1* carece también de la represión de la  $\alpha$ -amilasa por PKABA1 o ABA, y PKABA1 tiene un efecto muy pequeño sobre la expresión de genes inducidos por ABA, indicando que la inducción y represión por ABA se realizan por dos vías de señalización diferentes (Shen et al., 2001). Los primeros pasos en esta vía de señalización parecen implicar la activación de PLD por proteínas G y la señalización por ácido fosfatídico y  $Ca^{2+}$  como segundos mensajeros. La expresión de  $\alpha$ -amilasa inducida por GAs también puede ser inhibida en el epitelio del escutelo por el efecto combinado de ABA y azúcares.

Además del antagonismo del ABA sobre la inducción de la expresión génica mediada por GAs, el ABA retrasa la muerte celular programada en las células de aleurona. De modo similar, el ABA parece retrasar la muerte celular inducida por ET que ocurre al final del desarrollo del endospermo en cereales (Young y Gallie, 2000).

### 3.4.3. Respuesta a estreses bióticos producidos por patógenos.

Las respuestas de defensa de la planta frente al ataque de microorganismos patógenos son el resultado de una serie de cambios coordinados a nivel celular, regulados por una intrincada red de señalización hormonal. En este punto, el ABA emerge como un importante regulador de las respuestas frente a estreses bióticos, existiendo en ocasiones una correlación negativa entre los niveles de esta hormona y la resistencia al ataque de algunos patógenos,

mientras que en otros casos regula positivamente la activación de este tipo de respuestas (revisado en Ton et al., 2009). Así, se sabe que algunas bacterias usan los estomas como vía de entrada al interior de la planta y en este punto, la regulación del cierre estomático por ABA representa una importante barrera pre-invasiva frente al ataque de algunos patógenos virulentos (Melotto et al., 2006).

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

La complejidad de estas respuestas aumenta cuando se analiza el efecto de los patógenos en mutantes de la señalización de esta hormona. Así, se ha demostrado que frente al ataque de oomicetos hemibiotrofos como *Pythium irregulare*, el mutante *abi4-1* muestra una susceptibilidad aumentada, lo que indica que el ABA es un regulador positivo de las respuestas de defensa frente a este patógeno (Adie et al., 2007). En este mismo estudio se realizó un análisis transcriptómico de las respuestas de defensa frente a *P. irregulare* en plantas de *Arabidopsis* del ecotipo silvestre, poniendo de manifiesto la presencia de elementos de respuesta a ABA (ABRE) en los promotores de muchos genes que participan en respuestas de defensa, y en plantas del mutante *aba2-12*, observándose la deficiencia en la activación de genes de respuesta a JA. Para profundizar en el análisis del tipo de interacción entre ambas fitohormonas, se cuantificó el nivel de JA tras la infección con el patógeno en tales mutantes, observándose que el incremento de los niveles de JA era menor que en el tipo silvestre, lo que indicaba que la formación de ABA era necesaria para la síntesis de JA y para la activación de las respuestas frente a *P. irregulare*, revelando una conexión positiva entre ABA y JA. Por el contrario, se ha determinado que un regulador positivo de la ruta de señalización del ABA como AtMYC2, regula negativamente la expresión de los genes *PDF1.2* (*PLANT DEFENSIN 1.2*) y *CHI* (*CHITINASA*), que participan en la respuesta de defensa frente al ataque de *Fusarium oxysporum* y que a su vez están regulados positivamente por el JA, lo que pone de manifiesto una interacción negativa entre ambas hormonas en la regulación de algunas respuestas de defensa frente al ataque de patógenos (Anderson et al., 2004).

En este mismo sentido, se sabe que los mutantes *abi1-1* y *abi2-1* responden de modo diferente a la exposición al patógeno necrotrofo *Leptosphaeria maculans*. Mientras que el primero de ellos presenta una mayor susceptibilidad a la infección, el mutante *abi2-1* mantiene las repuestas de defensa frente al ataque de este patógeno, lo que pone de manifiesto una vez

más el complejo papel que desempeña el ABA en las respuestas frente a estreses bióticos (Kaliff et al., 2007).

Por otro lado, la naturaleza biotrofa o necrotrofa del patógeno tampoco sería esencial para determinar el papel del ABA en estas respuestas. Así, en *Arabidopsis* el ABA regula negativamente las respuestas de defensa frente al patógeno necrotrofo *Botrytis cinerea* (Anderson et al., 2004) mientras que en tomate lo haría de modo positivo (Abuqamar et al., 2009).

Todo ello pone de manifiesto que el ABA juega un papel ambivalente en las respuestas de defensa frente al ataque de patógenos, pudiendo actuar como un regulador positivo o negativo en múltiples niveles de la señalización de este tipo de respuesta, dependiendo de la etapa en la que se encuentra el proceso infeccioso, el tipo de interacción planta-patógeno (más que la especie de planta o el estilo de vida del patógeno), de las interacciones con otras rutas de señalización hormonales e incluso de las condiciones ambientales reinantes en el medio (revisado en Asselbergh et al., 2008).

#### **3.4.4. Respuesta a estreses abióticos.**

Una de las principales funciones del ABA durante el crecimiento vegetativo es la de permitir el desarrollo bajo condiciones adversas. A nivel celular puede promover la tolerancia a algunos estreses abióticos como la sequía, la salinidad y el frío.

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

Los mecanismos fisiológicos que gobiernan las respuestas de las plantas frente a estrés salino son muy semejantes a los que regulan las respuestas a sequía, sugiriendo que ambos estreses deben ser percibidos por la planta como una menor presencia de agua (Jakab et al.,

2005). Una alta concentración de sal en el sustrato provoca una disminución del potencial hídrico, lo que afecta a la disponibilidad de agua (Hasegawa et al., 2000). Además del choque hiperosmótico y del estrés oxidativo generado (Borsani et al., 2001), también se produce toxicidad y una elevada concentración salina en la solución externa de las células vegetales (Serrano et al., 1999; Rodríguez-Navarro, 2000). En respuesta a estresos osmóticos, muchas especies de plantas acumulan prolina (osmolito protector que secuestra radicales libres y que regula el potencial redox) debido a la activación de la biosíntesis de ABA y a la inactivación de su degradación durante el estrés (Hare et al., 1999).

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

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

#### 4. BIOSÍNTESIS, SEÑALIZACIÓN Y EFECTOS FISIOLÓGICOS DE LOS JASMONATOS (JAs).

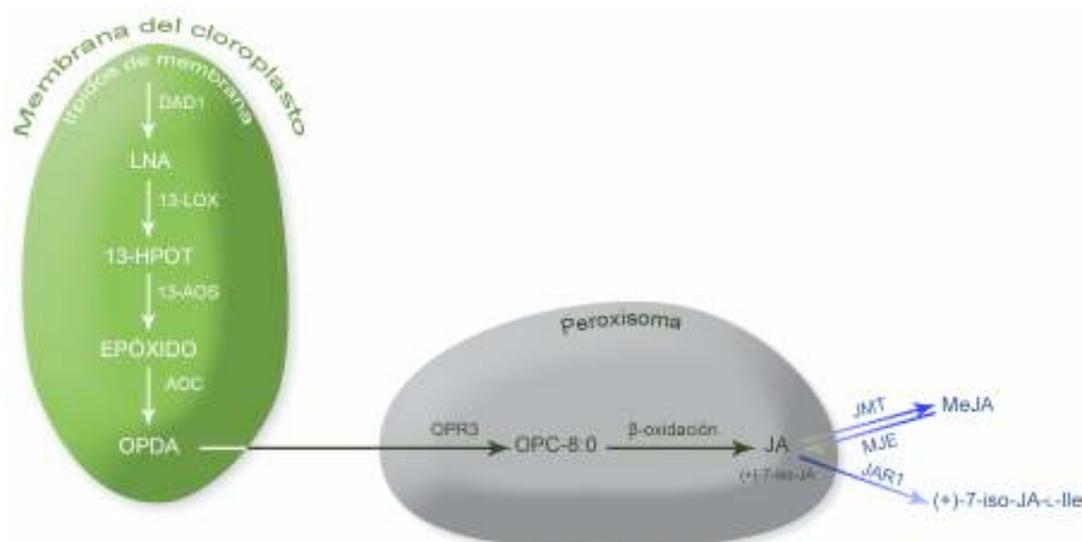
Los jasmonatos (JAs) son fitohormonas lipídicas derivadas de los ácidos grasos linoleico y linolénico principalmente, que actúan como moléculas señalizadoras de las respuestas de las plantas a numerosas situaciones de estrés y como reguladoras de diversos procesos del desarrollo. Entre la gran variedad de procesos en los que participan, cabe destacar la maduración de frutos, desarrollo del polen, crecimiento de la raíz, enrollamiento de zarcillos y respuesta de las plantas a estreses bióticos (ataques de insectos y hongos patógenos) y abióticos (sequía, exposición al ozono...) (Farmer et al., 1992; Rao et al., 2000; Huffaker et al., 2006; Kong, 2006; Wasternack, 2007; Suza y Staswick, 2008).

##### 4.1. Biosíntesis de JAs: ruta de los octadecanoides.

La biosíntesis de los JAs es estimulada por un amplio rango de estreses, incluyendo estrés osmótico (Kramell et al., 1997), heridas, sequía y exposición a elicitors como oligosacáridos y extractos de levadura (Parchmann et al., 1997; Leon et al., 2001) y durante procesos de desarrollo como la maduración del polen (Creelman y Mullet, 1997).

La biosíntesis de JAs puede partir de varios sustratos como el ácido linolénico (LNA, 18:3), el ácido linoleico (LA, 18:2) o el ácido hexadecatrienoico (16:3) (Weber et al., 1997) (Figura I.7). Una vez que el LNA es liberado de la membrana del cloroplasto por acción de la fosfolipasa A<sub>1</sub> (DAD1) (Ishiguro et al., 2001), la 13-lipoxigenasa (13-LOX) cataliza en el cloroplasto la oxidación del ácido graso hasta su derivado hidroperóxido, el ácido 13-hidroperoxioctadecatrienoico (13-HPOT) (Bell et al., 1995). A continuación, la 13-aleno óxido sintasa (13-AOS) cataliza la deshidratación del ácido 13-hidroperoxioctadecatrienoico hasta un epóxido inestable, el cual es convertido a ácido (9S, 13S)-12-oxofitodienoico (OPDA) por una aleno óxido ciclasa (AOC) (Stenzel et al., 2003). Debido a la inestabilidad del epóxido, es posible que AOS y AOC estén funcional y físicamente unidas. Posteriormente, el OPDA es reducido en el peroxisoma a 3-oxo-2-(2'(Z)-pentenil)-ciclopentano-1-octanoico (OPC-8:0) por acción de la OPDA reductasa (OPR3) (Stintzi et al., 2001). Finalmente, el OPC-8:0 da lugar al JA por medio de tres ciclos de  $\beta$ -oxidación, en los que participan una acyl-CoA oxidasa (ACX), una proteína multifuncional con actividad enoyl-CoA hidratasa y  $\beta$ -hidroxi-acil-CoA deshidrogenasa (MFP) y una 3-cetoacil-CoA tiolasa (Cruz Castillo et al., 2004; Li et al., 2005; Delker et al., 2006). En la actualidad se desconoce cómo se produce el transporte del OPDA desde el cloroplasto al peroxisoma, pero se sabe que es introducido al interior del orgánulo por

acción del transportador COMATOSE (Russell et al., 2000; Footitt et al., 2002, 2007) como consecuencia de la diferencia de pH que existe entre el citoplasma y el peroxisoma (Theodoulou et al., 2005).



**Figura I.7. Localización intracelular de las enzimas e intermediarios de la biosíntesis de los jasmonatos (JAs).** DAD1: fosfolipasa A<sub>1</sub>. 13-LOX: 13-lipoxigenasa. 13-AOS: 13-aleno óxido sintasa. AOC: aleno óxido ciclasa. OPR3: OPDA reductasa. JMT: S-adenosil-L-metionina:ácido jasmónico carboximetil transferasa. MJE: metil jasmonato esterasa. JAR1: JA-amino sintetasa. LNA: ácido linoleico. 13-HPOT: ácido 13-hidroperoxioctadecatrienoico. OPDA: ácido (9S, 13S)-12-oxofitodienoico. OPC-8:0: ácido 3-oxo-2-(2'(Z)-pentenil)-ciclopentano-1-octanoico. MeJA: jasmonato de metilo.

Adicionalmente, se puede producir la metilación del JA hasta jasmonato de metilo (MeJA) en una reacción regulada por la enzima S-adenosil-L-metionina:ácido jasmónico carboximetil transferasa (JMT) (Seo et al., 2001). Recientemente, se ha establecido que para activarse, el JA se ha de conjugar con aminoácidos (preferiblemente isoleucina, Ile) por acción de la enzima JAR1 (JA-amino sintetasa), de modo que la forma molecularmente activa de la hormona sería JA-L-Ile (Katsir et al., 2008; Fonseca et al., 2009). En este sentido, la molécula que promueve una mayor activación de la ruta de señalización del JA es el esteroisómero (+)-7-iso-JA-L-Ile, si bien existen otros JAs bioactivos.

Los análisis por microarray revelan que varios de los genes que responden a JA participan en la biosíntesis de esta fitohormona, indicando la existencia de un sistema de regulación por *feedback* positivo para la biosíntesis de JA (Sasaki et al., 2001). Las heridas y otros estreses que provocan las respuestas mediadas por JA, también inducen la formación de estos transcritos. Además, la activación transcripcional de estos genes ocurre en el mismo lugar de la biosíntesis del JA, por lo que parece que el JA es sintetizado localmente en respuesta a

señales de estrés y desarrollo, y los productos de esta ruta de señalización actúan como reguladores positivos de la síntesis, provocando la amplificación de la señal.

#### 4.2. Percepción y señalización de los JAs.

Los intermediarios que participan en la señalización del JA conocidos hasta el momento, han sido descubiertos en búsquedas de mutantes que, o bien tienen disminuida su sensibilidad a JA, MeJA y/o a la coronatina (fitotoxina bacteriana análoga a JA), o bien presentan una respuesta incrementada o constitutiva a JA (Turner et al., 2002; Lorenzo et al., 2004) (Tabla I.3). Las respuestas de defensa en *Arabidopsis* están mediadas por OPDA y JA, mientras que el desarrollo de estambres y la transcripción de genes que codifican proteínas de reserva (como el gen VSP), están inducidos solamente por JA (Ishiguro et al., 2001; Stintzi et al., 2001). Esto sugiere que en *Arabidopsis* hay al menos dos rutas de transducción de la señal del JA, una para el reconocimiento de OPDA o JA para desencadenar las respuestas de defensa, y otra para el reconocimiento del JA, pero no del OPDA, para el desarrollo de estambres y síntesis de proteínas de reserva.

Entre los mutantes que tienen alterada su respuesta a JA se encuentra *coi1* (*coronatine insensitive 1*), que es completamente insensible a JA. COI1 ha sido identificado molecularmente como una proteína F-box presente en un complejo SCF E3 ubiquitín-ligasa, lo que implica que en la señalización del JA hay degradación de proteínas por ubiquitilación (Devoto et al., 2002; Xu et al., 2002; Feng et al., 2003). La existencia de una función conservada de COI en otras especies, ha sido demostrada por la identificación de un homólogo de COI1 en tomate (Li et al., 2006).

Además de *coi1*, se han descrito otros mutantes insensibles a JA, algunos de los cuales ya se han identificado molecularmente, como se detalla en la tabla I.3. *JARI* (*Jasmonate Resistant 1*) codifica una enzima que adenila el JA, lo que indica que esta modificación modula la señal del JA (Staswick et al., 2002; Suza y Staswick, 2008). *JAI1/JIN1* (*Jasmonate Insensitive 1*) codifica la proteína MYC2, un factor transcripcional de tipo bHLH-zip localizado en el núcleo celular, que regula diferencialmente genes implicados en las respuestas de defensa frente a patógenos y herida (Lorenzo et al., 2004). Por su parte, *JAI4* (*Jasmonate Insensitive 4*) codifica una proteína (SGT1b) cuyo homólogo en levaduras interacciona con componentes del complejo SCF E3 ubiquitín-ligasa, por lo que se ha sugerido que esté implicado en la regulación de la degradación de proteínas por el proteosoma (Lorenzo y Solano, 2005).

**TABLA I.3.** Clasificación de los mutantes afectados en su respuesta a JA en *Arabidopsis thaliana*.

MUTACIÓN	PRODUCTO GÉNICO Y FENOTIPO	REFERENCIAS
<b>MUTANTES INSENSIBLES A JA</b>		
<i>coi1</i>	Insensibilidad a coronatina en inhibición del crecimiento de raíz; proteína F-box.	Feys et al., 1994; Xie et al., 1998.
<i>jar1/jin4</i>	Insensibilidad a MeJA en inhibición del crecimiento de raíz; enzima que adenila JA.	Staswick et al., 1992; Berger et al., 1996.
<i>jin1</i>	Insensibilidad a JA en inhibición del crecimiento de raíz; proteína MYC2.	Berger et al., 1996; Lorenzo et al., 2004.
<i>jai3</i>	Insensibilidad a JA en inhibición del crecimiento de raíz; fondo <i>ein3</i> ; represor de la respuesta a JA; proteína JAZ.	Lorenzo et al., 2004; Chini et al., 2007.
<i>jai4</i>	Insensibilidad a JA en inhibición del crecimiento de raíz en fondo <i>ein3</i> ; proteína SGT1b.	Lorenzo et al., 2004.
<i>mpk4</i>	Alteración en la expresión de genes de respuesta a JA y SA; proteína MPK4.	Petersen et al., 2000.
<i>axr4</i>	Insensibilidad a JA en la inhibición del crecimiento de raíz.	Tiryaki y Staswick, 2002; Xu et al., 2002.
<i>jue1, jue2, jue3</i>	Expresión reducida de <i>pLOX2:LUC</i> .	Jensen et al., 2002.
<b>MUTANTES CON RESPUESTA CONSTITUTIVA A JA</b>		
<i>cet1/9</i>	Expresión constitutiva de <i>pTHI2.1:BAR</i> .	Hilpert et al., 2001.
<i>cev1</i>	Expresión constitutiva de <i>pVSP1:LUC</i> ; celulosa sintasa.	Ellis y Turner, 2001.
<i>cex1</i>	Inhibición del crecimiento de raíz y expresión constitutiva de genes de respuesta a JA.	Xu et al., 2001.
<i>joe1</i>	Expresión aumentada de <i>pLOX2:LUC</i> y acumulación de antocianinas.	Jensen et al., 2002.
<i>joe2</i>	Expresión aumentada de <i>pLOX2:LUC</i> y disminución en la inhibición del crecimiento de raíz.	Jensen et al., 2002.
<b>OTROS</b>		
<i>cos1</i>	Supresor de <i>coi1</i> ; lumazina sintasa.	Xiao et al., 2004.

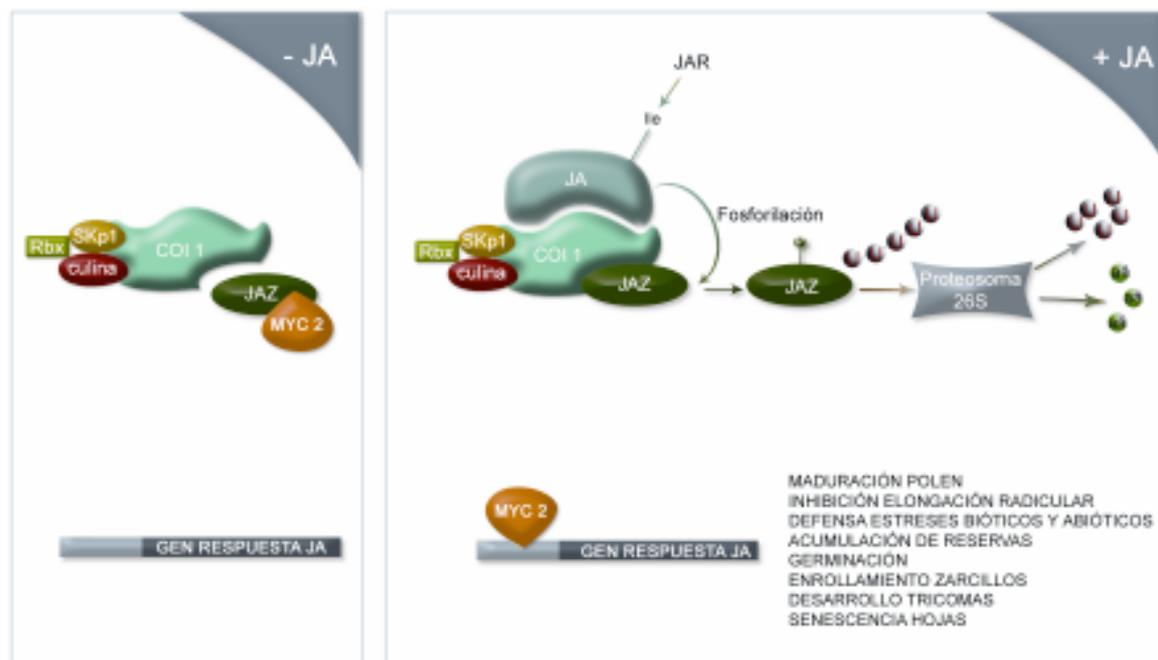
La ruta de señalización del JA comprende 2 pasos: el primero de ellos integra componentes y reguladores del complejo SCF (*Skip/Cullin/F-box*), relacionado con la degradación de proteínas por el proteosoma 26S; el segundo de los pasos está definido por FTs, tales como MYC2 y ERF1, los cuales regulan la expresión de los genes de respuesta a JA (Lorenzo et al., 2003, 2004; Boter et al., 2004). La existencia de estos dos tipos de componentes en la señalización del JA, ha conducido a la hipótesis de que la activación de las respuestas a JA por FTs requiere la degradación mediada por ubiquitina de un represor, que es

dirigido al proteosoma 26S por el complejo SCF<sup>COI1</sup> después de la percepción del JA (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007).

Recientemente, se ha descubierto la conexión entre el complejo SCF y los FTs gracias a la identificación de JAI3 y de la familia de proteínas JAZ (*Jasmonate Zim-domain proteins*) que ha demostrado la existencia de una familia de represores en la señalización del JA. La activación de las respuestas a JA está regulada por un *feedback* negativo que incluye las proteínas MYC2 y JAZ, lo que explicaría la pérdida de sensibilidad de la planta a JA tras recibir el estímulo de la hormona. MYC2 es un regulador esencial de las respuestas dependientes de JA e interactúa con la mayoría de proteínas JAZ conocidas. La unión de la hormona (que es modificada en el interior celular por la proteína JAR1 mediante la adición de un resto de Ile) a su receptor COI1, induce la degradación por el proteosoma 26S de las proteínas JAZ mediada por SCF<sup>COI1</sup>, liberando MYC2 y permitiendo la activación transcripcional de la respuesta a JA (Figura I.8). Por otro lado, debido a que los genes *JAZ* son dianas transcripcionales de MYC2, su rápida expresión inducida por este FT contribuye a la represión de MYC2. Sin embargo, la reprogramación de la transcripción tras la unión del JA al receptor no puede ser atribuida únicamente a MYC2, puesto que mutaciones en este gen no provocan una insensibilidad total a JA (Boter et al., 2004; Lorenzo et al., 2004).

Además de MYC2, se han identificado otros factores transcripcionales involucrados en diversas respuestas inducidas por JA, tales como miembros de la familia ERF, MYB, NAC y dedos de zinc, pero no se ha podido demostrar que interactúen con las proteínas JAZ (revisado en Fonseca et al., 2009).

El reciente descubrimiento de que JA-Ile promueve la interacción COI-JAZ ha conducido a la hipótesis de que COI1 podría ser el receptor de JA. Así, un ensayo realizado en tomate en el que se marcó radiactivamente la Coronatina (COR), mostró que se unía específicamente y con alta afinidad al complejo COI-JAZ, de modo que estabilizaría dicha interacción. En este sentido, una mutación puntual (L418F) en una región de la proteína COI1 homóloga al lugar de unión entre el receptor de auxinas (TIR1) y la hormona, evitó la interacción con el ligando y/o las proteínas JAZ, lo que ponía de manifiesto la necesidad de una COI1 funcional para que se produzca la unión de COR (Katsir et al., 2008). Asimismo, se ha comprobado que en levaduras la expresión de las proteínas COI y JAZ es suficiente para que se produzca la percepción de la hormona (Thines et al., 2007; Melotto et al., 2008) y en ensayos de *pull down* se ha comprobado que la interacción COI-JAZ3 es dosis-dependiente de JA, reversible y se produce con rapidez, todas ellas características esperadas para un receptor hormonal (Fonseca et al., 2009). Todos estos datos indican que COI es el receptor de JA (Chini et al., 2009; Pauwels et al., 2010).



**Figura I.8. Componentes de la ruta de señalización del JA.** El JA, a través del complejo SCF<sup>COI1</sup> ubiquitín ligasa, induce la degradación del represor JAZ por el proteosoma 26S, permitiendo así la unión del FT MYC2 a los genes de respuesta a JA. P: fosfato. U: ubiquitina. aá: aminoácido.

### 4.3. Efectos fisiológicos de los JAs.

El JA está implicado en la regulación de diversos procesos del desarrollo en plantas como la germinación, el desarrollo del polen, la dehiscencia de las anteras (Feys et al., 1994; McConn y Browse, 1996; Sanders et al., 2000; Stintzi et al., 2001), la senescencia, el desarrollo de tricomas, el crecimiento de la raíz (Staswick et al., 1992) y el enrollamiento de zarcillos (Weiler et al., 1994).

Por otra parte, el JA también participa en respuestas de defensa contra el ataque de insectos (McConn et al., 1997) y patógenos necrotrofos (Thomma et al., 1999; Adie et al., 2007), se requiere para la protección contra los efectos provocados por el ozono (Rao et al., 2000) y es la señal primaria en la producción de alcaloides protectores en cultivos celulares de *Eschscholtzia californica* (Gundlach et al., 1992).

La producción de JA conduce finalmente a la inducción de muchos genes, incluidos aquellos que codifican proteínas de reserva (*VSPs*; Benedetti et al., 1995), una tionina (*Thi2.1*; Epple et al., 1995; Vignutelli et al., 1998) y una defensina de plantas (*PDF1.2*; Penninckx et al., 1998). Sin embargo, la comprensión del papel que desempeña el JA en estas funciones es complicada debido a la observación de que muchos de los intermediarios de la síntesis del JA, son también activos en algunos de estos procesos. Así, el ácido 12-oxofitodienoico (OPDA) es

más activo que el JA en la activación de los mecanismos que provocan el enrollamiento de zarcillos en *Bryonia dioica* (Weiler et al., 1994).

#### 4.3.1. Función del JA en procesos del desarrollo.

El JA participa en el desarrollo, maduración y germinación de semillas basándose en su relación con el ABA. En particular, se ha estudiado el papel del JA en la embriogénesis de *Brassica napus* (Wilén et al., 1991), donde el JA endógeno modula los efectos del ABA en la expresión de genes que codifican las proteínas de reserva napina y oleosina. Además, el JA podría modular los niveles de ABA en las últimas etapas del desarrollo de las semillas (Hays et al., 1999).

La participación del JA en el desarrollo del polen y las anteras se ha conocido a partir del aislamiento de varios mutantes. El triple mutante de *Arabidopsis*, *fad3-2; fad7-2; fad8*, que presenta interrumpida la ruta de síntesis de dos precursores del JA, el ácido hexadecatrienoico (16:3) y el ácido linolénico (18:3), es androestéril (McConn y Browse, 1996). El mutante *opr3* también es androestéril y muy semejante al anterior ya que los filamentos de la antera no se desarrollan lo suficiente antes de la antesis y las anteras no sufren dehiscencia en el momento de la antesis. Ambos mutantes recuperan la fertilidad mediante tratamiento de sus flores con JA. Del mismo modo, el mutante insensible a JA *coil-1* es incapaz de producir polen viable y presenta alteraciones en la elongación de los filamentos de los estambres, siendo también androestéril, lo que sugiere que el JA desempeña un papel crucial en este proceso (Xie et al., 1998).

La senescencia es el último estadio en el desarrollo de las plantas. Los genes expresados durante la senescencia de las hojas (*SAGs*), codifican proteínas relacionadas con la fotosíntesis, así como intermediarios en el metabolismo, proteólisis y procesos de defensa (Wasternack y Hause, 2002). El papel del JA en la senescencia se relaciona con la inhibición de proteínas *housekeeping* codificadas por genes relacionados con la fotosíntesis, y la inducción de genes que participan en las respuestas a estreses bióticos y abióticos (Wasternack et al., 2006; Loscos et al., 2008). Además, se ha sugerido que el JA podría promover la senescencia de hojas a nivel transcripcional activando el grupo de genes *SAGs* (Wiermer et al., 2005). Por otro lado, ensayos en los que se aplica exógenamente JA y MeJA provocan una disminución en la expresión de genes relacionados con la fotosíntesis, observándose una reducción de la traducción y una mayor degradación de la subunidad pequeña de la proteína Rubisco así como una rápida disminución de los niveles de clorofila en hojas de cebada (*Hordeum vulgare*) (Reinbothe et al., 1993).

Muchas especies de plantas responden al ataque de insectos mediante un incremento en la densidad y/o número de tricomas en las nuevas hojas (Agrawal, 1998; Traw y Bergelson, 2003), ya que el desarrollo de barreras físicas es muy importante en la defensa de las plantas frente a herbívoros. Dentro de los factores hormonales que regulan la producción de tricomas, el ácido salicílico (SA), las giberelinas (GAs) y el ácido jasmónico (JA) son los más importantes (Pieterse, 1999). Diferentes estudios han demostrado interacciones sinérgicas entre el JA y las GAs en la formación de tricomas. La aplicación exógena de JA en presencia de GAs a plantas de ecotipo Landsberg *erecta* (*Ler*) provoca un incremento en densidad y número de tricomas (Traw y Bergelson, 2003). También hay fuertes interacciones, en este caso negativas, entre el JA y el SA en la producción de tricomas. Así, en presencia de SA los efectos inductores del JA sobre la producción de tricomas en las hojas de *Arabidopsis* se ven fuertemente reducidos.

Se sabe que el JA está también implicado en la inhibición de la elongación radicular de varias especies como *Arabidopsis* (Wasternack, 2007). Mutantes insensibles a JA como *coil*, *jin1* o *jar1* tratados con MeJA, muestran raíces de longitud similar a las raíces de plantas de ecotipo silvestre sin ser sometidas a dicho tratamiento. Por otro lado, mutantes que presentan expresión constitutiva de genes de respuesta a JA como *cev1*, *cet1* o *cex1*, presentan raíces cortas y un retraso en el desarrollo semejante a plantas de ecotipo silvestre tratadas con JA (Ellis et al., 2002).

El JA también está relacionado con el enrollamiento de zarcillos en *Bryonia dioica* (Schaller y Weiler, 1997). El estudio de esta respuesta reveló que el OPDA era más activo que el JA en este proceso (Weiler et al., 1994).

#### 4.3.2. Función del JA en estreses bióticos y abióticos.

El JA activa las respuestas de defensa de las plantas frente a estreses bióticos (ataques de insectos y patógenos) y abióticos (sequía, exposición al ozono...) (Peña-Cortés et al., 1995; McConn et al., 1997; Rao et al., 2000). Además, se ha comprobado la existencia de una interacción entre las rutas de señalización del JA y el ABA durante la regulación génica de este tipo de respuestas de adaptación (Lee et al., 1996; Hays et al., 1999; Anderson et al., 2004; Yadav et al., 2005), así como en la limitación de la transpiración y en la inducción del cierre estomático (Munemasa et al., 2007).

Las plantas responden a las heridas causadas por insectos y al ataque por patógenos activando una gran variedad de genes. Se ha observado que las heridas causadas por insectos provocan un incremento en los niveles endógenos de JA (Laudert et al., 1996; Pieterse et al., 1998; Suza y Staswick, 2008), lo que da lugar a la activación de genes de defensa, algunos de

los cuales se inducen únicamente en tejidos adyacentes al lugar de la herida, mientras que otros se expresan sistémicamente activándose en partes no dañadas de la planta (Peña-Cortés et al., 1995). Además, el JA induce la formación de defensas indirectas (emisiones volátiles) y directas (formación de proteínas y otros pequeños componentes de defensa) (Howe y Jander, 2007; Pieterse y Dicke, 2007). La función de los JAs en procesos de defensa ante el ataque de insectos fue establecida por Farmer et al., (1992), que relacionaron las heridas causadas por insectos, la formación de JAs y la inducción de genes que codifican proteínas inhibidoras de proteinasas (PINs), las cuales impiden la degradación proteolítica en el intestino de los insectos (Huffaker et al., 2006). Asimismo, los niveles de JA endógeno se ven incrementados tras el ataque de hongos necrotrofos como *Alternaria brassicicola* y *Phytophthora irregularis* (Penninckx et al., 1996), observándose que mutantes deficientes en la biosíntesis o en la señalización del JA como *coi1* o *jar1* son más susceptibles ante este tipo de ataque (Vijayan et al., 1998).

El JA también participa en las respuestas de defensa frente a estreses abióticos como la exposición al ozono, observándose un incremento en los niveles de JAs y de los transcritos de las enzimas que participan en su biosíntesis (Rao et al., 2000). De este modo, el JA limitaría el daño que el ozono produce en la planta, caracterizado por la aparición de lesiones necróticas.

# Antecedentes y Objetivos

Antecedentes  
y Objetivos





Este trabajo se engloba dentro de un amplio proyecto de investigación, que pretende identificar nuevos componentes moleculares implicados en la ruta de señalización del ácido abscísico (ABA) durante la germinación de semillas. Para ello, emplearemos *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo por las características propias de esta planta: genoma de pequeño tamaño completamente secuenciado, amplias colecciones de mutantes y herramientas genéticas (tanto de genética directa como reversa) y por la facilidad de su manejo en el laboratorio.

El ABA es la principal hormona implicada en la formación, maduración e inhibición de la germinación de semillas y según los datos disponibles, actúa a través de procesos de fosforilación/desfosforilación de proteínas para la inducción o represión de genes específicos mediante los factores de transcripción correspondientes (Cutler et al., 2010; Raghavendra et al., 2010).

Se sabe que otras hormonas vegetales interactúan positiva y negativamente con el ABA en la inhibición de la germinación en *Arabidopsis*. En este sentido, el ABA y los jasmonatos (JAs) tienen efectos sinérgicos en la inhibición de la germinación y relaciones negativas durante esta etapa del desarrollo, tal y como sugiere la hipersensibilidad a ABA mostrada por los mutantes insensibles a JAs, *jar1* y *coil* (Staswick et al., 1992; Ellis y Turner, 2002).

La línea de investigación de nuestro grupo se ha centrado en el estudio de los mecanismos hormonales, bioquímicos y moleculares que están implicados en el control de la germinación, utilizando como sistemas modelos las especies *Fagus sylvatica* L. (haya) y *Arabidopsis thaliana* L. En lo referente a la función del ABA durante esta etapa del desarrollo, en trabajos previos de nuestro grupo se han aislado y caracterizado varios clones de cDNA regulados por ABA y relacionados con el mantenimiento o la eliminación de la dormición (Lorenzo, Tesis Doctoral 2000; Lorenzo et al., 2002a) así como varias proteín-kinasas y proteín-fosfatasas implicadas en estos procesos (Lorenzo, Tesis Doctoral 2000; Lorenzo et al., 2001, 2002b, 2003) y se ha realizado el análisis funcional de algunas de estas proteín-fosfatasas, demostrando el papel que desempeñan como reguladores negativos de las respuestas a ABA (González-García et al., 2003; González-García, Tesis Doctoral 2005; González-García et al., 2006; Reyes et al., 2006), así como de las proteínas que interactúan con ellas (Saavedra et al., 2010).

Con estos antecedentes y basándonos en trabajos anteriores en los que la utilización de fondos genéticos hipersensibles ha resultado ser un mecanismo óptimo para la selección positiva de mutantes afectados en las respuestas a una hormona (Lorenzo et al., 2004), nuestro propósito en la primera parte de este trabajo es la elaboración de una estrategia de búsqueda de nuevos mutantes alterados en su respuesta a ABA, empleando para ello un fondo genético insensible a JA e hipersensible a ABA y de esta forma, poder aumentar el conocimiento sobre

los mecanismos e intermediarios que participan en la transducción de la señal del ABA en la germinación de las semillas.

En este sentido, y con el objetivo de diseccionar en mayor profundidad las repuestas a ABA durante la germinación de semillas, se ha establecido una colaboración con el grupo de investigación del Dr. Eiji Nambara (Universidad de Toronto, Canadá) quien ha llevado a cabo con anterioridad búsquedas de mutantes afectados en sus respuestas a ABA durante esta etapa del desarrollo, aislando diferentes alelos de mutantes insensibles a la hormona como *abi3*, *abi4* y *abi5* (Nambara et al., 1992; Nambara et al., 2002). Además, ha identificado nuevos mutantes que presentan alterados diferentes procesos fisiológicos regulados por ABA, tales como *chotto1* (Yamagishi et al., 2009; Yano et al., 2009) y *anac089-2*, siendo este último objeto de estudio en la segunda parte de la presente memoria.

Para ello, se han planteado los siguientes objetivos:

1. Análisis de las respuestas a ABA y JAs en la germinación de semillas de Arabidopsis, utilizando varios mutantes previamente descritos como insensibles a ABA y JAs. Del mismo modo, se llevará a cabo el estudio de la interacción entre ambas hormonas realizando ensayos dosis-respuesta durante la germinación y el desarrollo temprano.
2. Búsqueda de mutantes con una respuesta disminuida a ABA durante la germinación y clonaje posicional de la mutación correspondiente, mediante *screening* empleando semillas mutagenizadas del mutante insensible a JA e hipersensible a ABA más adecuado, lo que nos permitirá encontrar nuevos mutantes con distinto grado de resistencia a ABA en esta etapa del desarrollo, y la identificación de los genes mutados mediante la técnica del paseo cromosómico.
3. Caracterización fenotípica y molecular del primer mutante seleccionado, estudiando su fenotipo durante la germinación, en presencia de estreses abióticos y bióticos y analizando la expresión de genes marcadores de ABA en el fondo mutante.
4. Análisis de la función que desempeña el gen identificado en la señalización del ABA, mediante estudios de localización subcelular de la proteína codificada y de interacción con otras proteínas y a través de la obtención y caracterización de plantas transgénicas que sobreexpresen el gen de interés y su versión mutada.

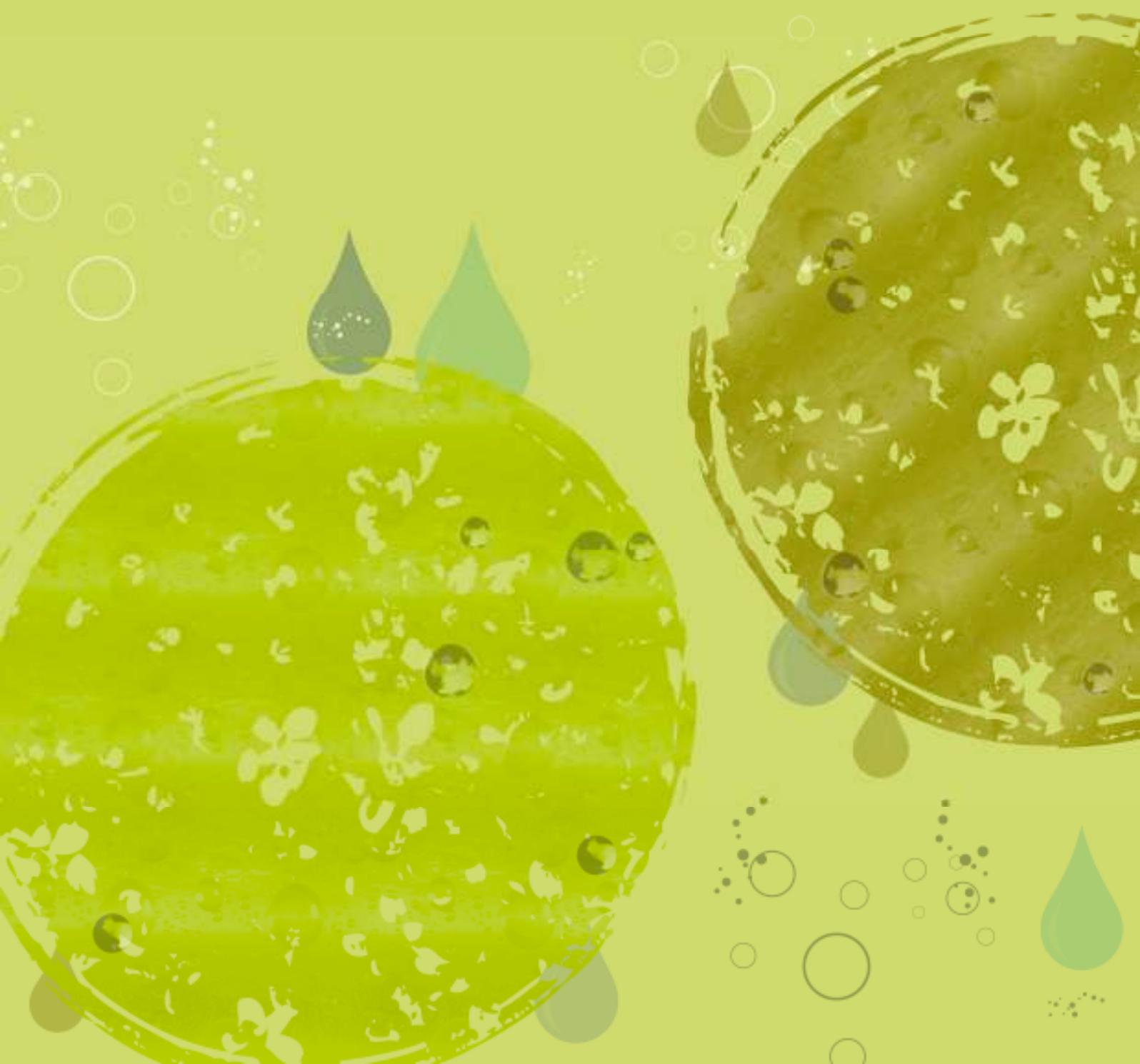
5. Estudio fenotípico y funcional del factor transcripcional ANAC089, caracterizando el fenotipo mostrado por el mutante en presencia de ABA y de diferentes estreses, así como determinando su localización subcelular y la actividad transcripcional llevada a cabo por la proteína.
  
6. Análisis de la regulación génica ejercida por ANAC089 en la germinación de semillas, mediante el análisis de un perfil transcriptómico comparado del mutante *anac089-2* en respuesta a la adición exógena de ABA durante esta etapa del desarrollo, frente a semillas del tipo silvestre, así como la identificación de la secuencia *cis* consenso de unión al DNA.

La memoria que se expone a continuación, recoge el material, las técnicas empleadas y los resultados obtenidos.



# materiales y Técnicas

Materiales  
y Técnicas





## 1. MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO.

### 1.1. Material vegetal.

Para la realización de este trabajo se emplearon semillas de la especie *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, ecotipos Columbia (Col-0) y Landsberg *erecta* (Ler). Estos ecotipos actualmente se encuentran depositados en varios centros, entre los que se encuentran el NASC (Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre, U.K.) o el ABRC (*Arabidopsis* Biological Resource Center, U.S.A.). Además, se emplearon semillas de varios mutantes que aparecen detallados en la tabla M.1.

El estudio del factor transcripcional ANAC089 se ha llevado a cabo mediante la colaboración establecida con el Dr. Eiji Nambara (Universidad de Toronto, Canadá), quien amablemente nos ha cedido los mutantes *anac089-1* y *anac089-2* y la línea transgénica *proANAC089:GUS*.

Asimismo, se empleó tejido epidérmico de cebolla (*Allium cepa*) con el que se realizó la transformación transitoria mediante la técnica de biobalística y se utilizaron plantas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*) para llevar a cabo la transformación transitoria por agroinfiltración y los ensayos de complementación bimolecular fluorescente (BiFC) con el objetivo de analizar las interacciones entre diferentes proteínas.

**Tabla M.1.** Mutantes de *Arabidopsis thaliana* empleados en la realización de este trabajo.

MUTANTE	FENOTIPOS	ENSAYOS	REFERENCIAS
<i>coi1-16</i>	Insensible a JA e hipersensible a ABA durante la germinación de semillas.	Fondo genético utilizado en la mutagénesis de semillas. Ensayos de respuesta a ABA y a JA.	Feys et al., 1994; Xie et al., 1998.
<i>jar1-1</i>	Insensible a JA e hipersensible a ABA durante la germinación de semillas.	Ensayos de respuesta a ABA y a JA.	Staswick et al., 1992; Berger et al., 1996.
<i>abi1-1</i>	Insensible a ABA.	Control en ensayos de respuesta a ABA.	Koornneef et al., 1982; Leung et al., 1994; Meyer et al., 1994.
<i>abi3-1</i>	Insensible a ABA.	Ensayo de complementación.	Koornneef et al., 1982; Giraudat et al., 1992.
<i>abi3-6</i>	Insensible a ABA.	Ensayo de complementación.	Nambara et al., 1994.
<i>abi4-1</i>	Insensible a ABA.	Ensayo de complementación.	Finkelstein, 1994; Arenas-Huertero et al., 2000; Huijser et al., 2000; Laby et al., 2000; Rook et al., 2001.
<i>abi5-1</i>	Insensible a ABA.	Control en ensayos de respuesta a ABA.	Finkelstein, 1994; Finkelstein y Lynch, 2000; López-Molina y Chua, 2000.

## 1.2. Microorganismos.

Los microorganismos empleados en el desarrollo del presente trabajo han sido las bacterias *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y los microorganismos fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Pythium ultimum*. Las distintas cepas utilizadas, junto con sus características genotípicas, aplicación y origen o referencia bibliográfica se especifican en la tabla M.2.

*E. coli* se empleó para subclonar fragmentos de cDNA y para amplificar plásmidos que contuvieran el gen letal *CCDB*. La transformación transitoria de hojas de *Nicotiana benthamiana* y la transformación de plantas de *Arabidopsis* para generar plantas transgénicas se llevaron a cabo empleando *A. tumefaciens*. *S. cerevisiae* fue utilizada para llevar a cabo los ensayos de transactivación y dimerización de proteínas en levadura. Los microorganismos fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Pythium ultimum* se emplearon para realizar ensayos infectivos en plantas de *Arabidopsis* y fueron cedidos amablemente por el Prof. Ernesto Pérez-Benito (USAL) y por el Dr. Roberto Solano (CNB-CSIC), respectivamente.

**Tabla M.2.** Cepas de *Escherichia coli* (E), *Agrobacterium tumefaciens* (A), *Saccharomyces cerevisiae* (S) y microorganismos fitopatógenos (*Botrytis cinerea* y *Pythium ultimum*) utilizados en este trabajo.

CEPA	CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS	APLICACIONES	REFERENCIAS
DH5α (E)	F, Φ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>s</sub></i> , <i>m<sub>s</sub></i> ), <i>supE44</i> , <i>deoR</i> , <i>relA1</i> , Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169.	Subclonar fragmentos de cDNA. Células competentes.	Hanahan, 1983.
DB3.1 (E)	F, <i>gyrA462</i> , <i>endA1</i> , <i>glnV44Δ</i> ( <i>se1-recA</i> )/ <i>mcrB</i> , <i>mrr</i> , <i>hsdS20</i> ( <i>r<sub>s</sub></i> , <i>m<sub>s</sub></i> ), <i>ara14</i> , <i>galK2</i> / <i>lacY1</i> , <i>proA2</i> , <i>rpsL20</i> ( <i>Sm<sup>r</sup></i> ), <i>xyf5</i> , Δ <i>leu</i> <i>mtl</i> .	Amplificación de plásmidos con gen letal <i>CCDB</i> mediante la tecnología GATEWAY.	Miki et al., 1992.
TOP10F <sup>+</sup> (E)	F, { <i>lacI</i> <sup>+</sup> Tn10 ( <i>tet<sup>R</sup></i> )} <i>mcrA</i> , Δ ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> ), Φ80 <i>d lacZ</i> Δ <i>M15</i> , Δ <i>lacX74recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ( <i>ara-leu</i> )7697, <i>galU galK</i> , <i>rpsL</i> , ( <i>str<sup>R</sup></i> ), <i>endA1</i> , <i>nupG</i> .	Subclonar fragmentos de cDNA. Células competentes.	Invitrogen.
C58C1 (A)	<i>rif</i> , contiene el plásmido binario pGV2260, <i>cb1</i> .	Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> . Células competentes.	Deblaere et al., 1985.
SFY526 (S)	<i>MATα</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>hys2-801</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>can1</i> / <i>gal4-542</i> , <i>gal80-538</i> , URA3:: <i>GAL1<sub>UAS</sub></i> - <i>GAL1<sub>TATA</sub></i> - <i>lacZ</i> .	Ensayos de doble híbrido.	Clontech.
<i>Botrytis cinerea</i> (BO5-10)	Hongo necrotrofo.	Infección de plantas de <i>Arabidopsis</i> .	Backhouse y Willetts, 1987.
<i>Pythium ultimum</i>	Oomiceto hemibiotrofo.	Infección de plantas de <i>Arabidopsis</i> .	Plaats-Niterink, 1981.

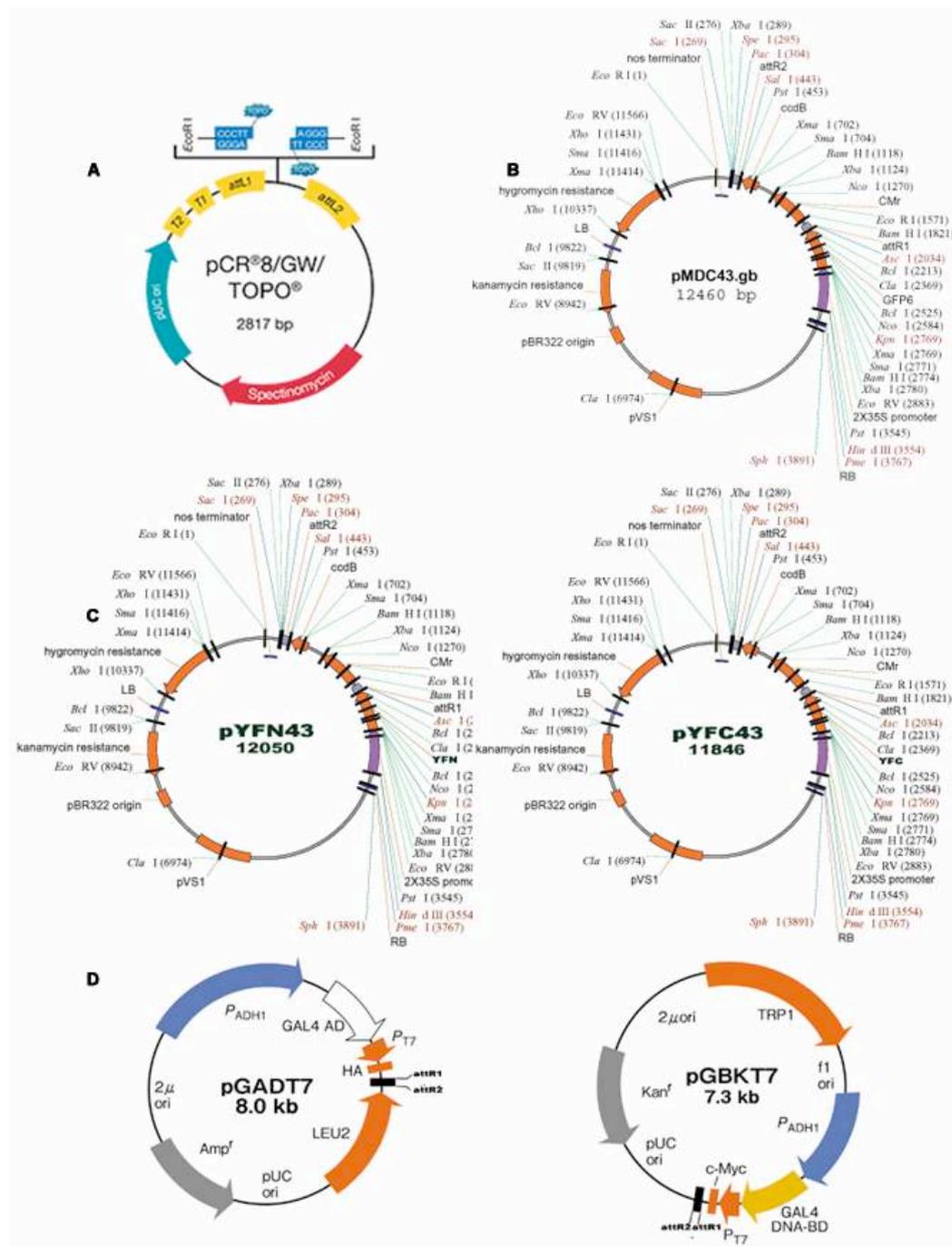
### 1.3. Vectores empleados.

Los vectores empleados en este trabajo, así como sus características más destacables y el mapa correspondiente, se detallan en la tabla M.3 y en la figura M.1.

**Tabla M.3.** Plásmidos empleados en la realización de este trabajo.

PLÁSMIDO	RESISTENCIA	ENSAYO	REFERENCIAS
pCR <sup>®</sup> 8/GW/TOPO <sup>®</sup>	Espectinomicina	Vector de entrada para subclonar fragmentos de cDNA. Tecnología GATEWAY.	Invitrogen.
pMDC43	Kanamicina (procariota) Higromicina (eucariota)	Construcción de plantas transgénicas; transformación transitoria (biobalística, agroinfiltración).	Curtis y Grossniklaus (2003).
pYFN43	Kanamicina (procariota) Higromicina (eucariota)	Complementación bimolecular fluorescente (BiFC).	Curtis y Grossniklaus (2003).
pYFC43	Kanamicina (procariota) Higromicina (eucariota)	Complementación bimolecular fluorescente (BiFC).	Curtis y Grossniklaus (2003).
pGADT7	Ampicilina	Transactivación y dimerización de proteínas.	Clontech.
pGBKT7	Kanamicina	Transactivación y dimerización de proteínas.	Clontech.

El vector pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen) se ha empleado en la subclonación de fragmentos de cDNA. El vector pMDC43 contiene el gen reportador *GFP* (*GREEN FLOURESCENT PROTEIN*) bajo el control del promotor 35S de CamV (virus del mosaico de la coliflor), el gen *NPTII* (*NEOMICINA FOSFOTRANSFERASA II*) que confiere resistencia a Kan y el gen *HPT* (*HIGROMICINA FOSFOTRANSFERASA*) que confiere resistencia a higromicina y se ha utilizado para llevar a cabo la transformación de plantas de *Arabidopsis* (apartado 7), la transformación transitoria de células de epidermis de cebolla mediante biobalística (apartado 8.1) y de hojas de *Nicotiana benthamiana* mediante agroinfiltración (apartado 8.2). Los vectores pYFN43 y pYFC43, ambos derivados del plásmido pMDC43, se han utilizado para llevar a cabo el ensayo de complementación bimolecular fluorescente (apartado 8.3). Con los vectores pGADT7 y pGBKT7, que contienen genes de resistencia a ampicilina (*amp<sup>r</sup>*) y a kanamicina (*kan<sup>r</sup>*) respectivamente, se realizaron los ensayos de transactivación y dimerización de proteínas en levadura (apartado 9).



**Figura M.1.** Mapas de los vectores de replicación en *E. coli* pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> (A), de los vectores binarios de replicación en *A. tumefaciens* pMDC43 (B), pYFC43 y pYFN43 (C) y de los vectores de replicación en levadura pGADT7 y pGBKT7 (D), empleados en la realización de este trabajo.

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

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

Para llevar a cabo la esterilización superficial de semillas de *A. thaliana*, con las que se realizaron experimentos *in vitro*, se siguieron los siguientes pasos:

1. Introducir las semillas en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
2. Lavar las semillas con una solución compuesta por lejía comercial (hipoclorito sódico) al 75% (v/v) y Tritón X-100 al 0.01%.
3. Agitar en vórtex durante 5-6 minutos y desechar la solución limpiadora.
4. Realizar tres lavados consecutivos con 1 ml de agua estéril.
5. Añadir 1 ml de agua estéril o agarosa al 0.15%.

Debido a que las semillas de *Arabidopsis* presentan dormición, una vez esterilizadas se mantuvieron imbibidas en agua o en agarosa al 0.15% entre 3 y 5 días en oscuridad, dentro de cámaras refrigeradas a una temperatura de 4°C para favorecer la eliminación de la dormición y sincronizar la germinación. Cuando se llevaron a cabo los ensayos para analizar el grado de dormición de las semillas y el efecto del almacenamiento (*after-ripening*) (apartado 2.3) las semillas no fueron sometidas a estratificación después de ser esterilizadas.

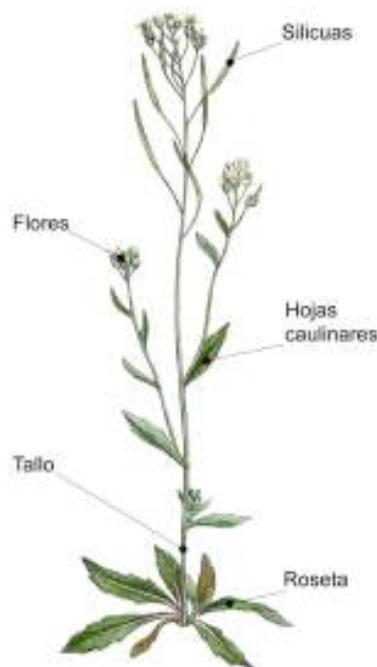
### 2.2. Siembra y obtención de plántulas.

Transcurrido el periodo de estratificación, las semillas fueron sembradas en medio de crecimiento MS (Murashige y Skoog, 1962) comercializado por Duchefa. Para la elaboración de 100 ml de medio de cultivo, se siguieron los siguientes pasos:

1. Añadir 50 ml de agua milli Q en un vaso de precipitados.
2. Incorporar 0.49 g de MS comercial (Duchefa).
3. Añadir 2 g de glucosa y disolver.
4. Ajustar a pH 5.7 con KOH 2 M.
5. Añadir 0.6 g de agar bacteriológico como agente solidificante y completar hasta 100 ml con agua milli Q.
6. Autoclavar durante 1 hora a 120°C.
7. Distribuir en placas Petri estériles, solidificar y conservar a 4°C.

La siembra se realizó en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar horizontal y las placas se sellaron con esparadrapo quirúrgico Micropore Scotch 3M, tras lo cual fueron incubadas a 21-22°C en cámaras de cultivo bajo condiciones de 16 horas de luz (80-100  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ) y 8 horas de oscuridad durante 8-10 días.

Para la obtención de plantas adultas (Figura M.2), las semillas de *Arabidopsis* que habían sido germinadas *in vitro* en medio MS, se sembraron individualmente en bandejas de 50 alvéolos para su crecimiento en suelo. El sustrato empleado fue ligeramente ácido (mezcla de turbas, Tref) y se mezcló en una proporción de 3:1 con vermiculita (Termita<sup>®</sup>, Asfaltex) para facilitar el drenaje. La siembra se realizó traspasando las plántulas de 8-10 días a los alvéolos con ayuda de pinzas. A continuación, las bandejas se cubrieron con plástico durante los 2-3 primeros días para mantener unos niveles altos de humedad. El plástico fue perforado paulatinamente para que las plántulas se aclimataran a las condiciones de las cámaras de cultivo o del invernadero, en las que se mantuvieron hasta el momento de su recolección.



**Figura M.2.** Partes de una planta adulta de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Las condiciones de crecimiento de las cámaras de cultivo fueron de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, 60% de humedad y la temperatura seleccionada fue de 21-22°C, con la excepción del mutante *coil-16* cuya temperatura apropiada fue de 15°C. Cuando las plantas fueron mantenidas en el invernadero, las condiciones fueron de 20-23°C y 16 horas de luz. El aporte de agua se realizó por pulverización y subirrigación en las bandejas hasta alcanzar una

altura de 2-3 cm, desechando el agua sobrante tras 1-2 horas. Para facilitar el crecimiento de las plantas se emplearon varillas cilíndricas de madera, en torno a las cuales se enrollaron y sujetaron los tallos con alambres plastificados.

Una vez finalizada la floración, se interrumpió el aporte de agua y se mantuvieron las plantas en la cámara de cultivo o en el invernadero 10-15 días más, trasladándolas después a una habitación sin fuente de luz y con una temperatura de 25°C para acelerar el proceso de secado de las mismas.

En la recolección de semillas, se emplearon sobres de papel en los que se introdujeron las plantas individualmente para evitar posibles contaminaciones entre semillas de distintas estirpes. Los sobres con las semillas se almacenaron a temperatura ambiente hasta su posterior uso.

### **2.3. Tratamientos de germinación empleados.**

Para realizar la selección de mutantes y plantas transgénicas y su posterior caracterización fenotípica, se suplementó el medio MS con distintas hormonas, sustancias químicas y/o antibióticos (suministrados por Sigma y Duchefa). Los tratamientos empleados en la siembra de las semillas de *Arabidopsis*, sus respectivas concentraciones y sus efectos sobre la germinación de las semillas se indican en la tabla M.4. Todas las concentraciones de hormonas empleadas habían sido probadas y optimizadas previamente (Lorenzo et al., 2004; Fernández-Arbaizar, Trabajo de Grado, 2008):

1. Elaborar medio MS (apartado 2.2) y autoclavar a 120°C durante 1h.
2. Estabilizar el medio MS autoclavado en un baño a 50-55°C.
3. Añadir la hormona o sustancia química a la concentración necesaria.
4. Distribuir en placas Petri estériles, solidificar y conservar a 4°C.

**Tabla M.4.** Tratamientos de germinación empleados.

	CONCENTRACIÓN		VOLUMEN POR 100 ml	ENSAYO
	FINAL	STOCK		
<b>Ácido abscísico (ABA)</b>	0,5µM	1mM	50µl	Selección de mutantes. Inhibición de la germinación.
	0,8µM		80µl	Fenotípico. Inhibición de la germinación.
	1µM		100µl	Fenotípico. Inhibición de la germinación.
	2µM		200µl	Fenotípico. Inhibición de la germinación.
	3µM		300µl	Selección de mutantes <i>abi</i> . Inhibición de la germinación.
	5µM		500µl	Fenotípico. Inhibición de la germinación.
<b>Ácido jasmónico (JA)</b>	1µM	0.1M	1µl	Fenotípico. Caracterización de la germinación y el desarrollo.
	10µM		10µl	Fenotípico. Caracterización de la germinación y el desarrollo.
	50µM		50µl	Fenotípico. Caracterización de la germinación y el desarrollo.
	100µM		100µl	Fenotípico. Caracterización de la germinación y el desarrollo.
<b>Paclobutrazol (PCB)</b>	1µM	1mM	100µl	Fenotípico. Inhibición de la germinación.
	3µM		300µl	Fenotípico. Inhibición de la germinación.
	5µM		500µl	Fenotípico. Inhibición de la germinación.
<b>Manitol</b>	250mM	—	—	Fenotípico. Resistencia a estrés osmótico.
	400mM			
<b>Cloruro sódico</b>	100mM	—	—	Fenotípico. Resistencia a estrés salino.
	150mM			
	200mM			
<b>Agua destilada estéril</b>	—	—	—	Tratamiento control.

Los ensayos de dormición, almacenamiento (*after-ripening*) y de estreses provocados por bajas temperaturas sobre la germinación de semillas se llevaron a cabo en el Departamento *Plant and Crop Sciences* de la Universidad de Nottingham (Reino Unido). Para realizar el análisis de dormición se siguieron las siguientes pautas:

1. Recoger las semillas de la planta madre procedentes de silicuas maduras y que todavía se mantengan cerradas.
2. Extraer las semillas del interior de las silicuas.
3. Esterilizar y sembrar las semillas en placas de MS (apartado 2.1) estratificando una parte de las semillas a 4°C durante 48 horas (tratamiento control), mientras que el resto se siembran sin ser sometidas a dicho tratamiento.
4. Mantener las placas a 22°C bajo condiciones de luz continua. Analizar la germinación tras la visualización de la emergencia radicular.

El ensayo de *after-ripening* utilizado para analizar el efecto del almacenamiento en seco sobre la germinación de las semillas, se realizó como se indica a continuación:

1. Crecer todas las plantas en la misma bandeja y mantenerlas en una cámara de cultivo bajo condiciones controladas (16 horas de luz y 22°C de temperatura).
2. Recoger las semillas de la planta una vez que ésta haya finalizado su ciclo vital y conservarlas en bolsas de papel bajo condiciones de almacenamiento controladas (oscuridad, ausencia de humedad y 24°C de temperatura).
3. Esterilizar (apartado 2.1).
4. Sembrar las semillas en placas de MS en semanas consecutivas durante 1 mes sin someterlas a estratificación.
5. Mantener las placas a 22°C bajo condiciones de luz continua. Analizar la germinación tras la visualización de la emergencia radicular.

Adicionalmente, se analizó el efecto de bajas temperaturas sobre la germinación de las semillas procediendo de la siguiente manera:

1. Esterilizar semillas conservadas bajo condiciones de almacenamiento controladas (oscuridad, ausencia de humedad y 24°C de temperatura).
2. Sembrar en placas de MS.
3. Estratificar a 4°C para eliminar la dormición de las semillas.
4. Mantener las placas en cámaras de crecimiento a 22°C (tratamiento control) y 10°C bajo condiciones de luz continua. Analizar la germinación *sensu stricto* y el desarrollo de cotiledones verdes por separado.

## 2.4. Análisis del crecimiento de la raíz (*root growth*).

El análisis del crecimiento de la raíz en plántulas de *Arabidopsis*, se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Sembrar las semillas en placas de MS y mantenerlas durante 5 días a 22°C bajo condiciones de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.
2. Transferir las plántulas a placas de medio MS (tratamiento control) y medio MS suplementado con ABA 50  $\mu$ M.
3. Colocar las placas verticalmente en cámaras de crecimiento y mantenerlas durante 10 días a 22°C bajo condiciones de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.
4. Fotografiar y medir la longitud de la raíz en las plántulas utilizando el programa informático *Image J*.

## 3. CARACTERIZACIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO.

El análisis del desarrollo embrionario, a lo largo de este trabajo, se ha llevado a cabo en la Universidad del Estado de Oregón (*Oregon State University*, Corvallis, Oregón, U.S.A.) bajo la supervisión del Prof. Hiro Nonogaki. La evaluación de la viabilidad de las semillas, así como la obtención de imágenes mediante microscopía diferencial de contraste de interferencia (D.I.C.), se llevó a cabo en el Departamento de Horticultura. Por su parte, el análisis de los embriones empleando microscopía electrónica de barrido (S.E.M.) se realizó en el Departamento de Botánica y Patología de Plantas del citado centro.

### 3.1. Evaluación de la viabilidad de las semillas.

La sal de tetrazolium (incolores, soluble y oxidada) es empleada para medir la actividad respiratoria asociada a cadenas transportadoras de electrones. Estas sales se reducen por medio de enzimas deshidrogenasas a partir de los electrones liberados por las cadenas respiratorias de los orgánulos (mitocondrias y cloroplastos en plantas) de los tejidos vivos. Esta sal, al reducirse, forma un precipitado de color rojo intenso e insoluble en agua llamado formazán. Para completar este ensayo se siguió el siguiente procedimiento:

1. Rehidratar durante 48 horas semillas secas del ecotipo silvestre y de los mutantes correspondientes.

2. Extraer los embriones de las semillas empleando pinzas de microcirujía y una cuchilla quirúrgica esterilizadas con etanol, bajo una lupa de disección.
3. Sumergir los embriones en una solución al 0.5% (w/v) de 2,3,5-cloruro de trifeniltetrazolium durante 6-8 horas.
4. Colocar los embriones en un portaobjetos y observar al microscopio (Axioskop 2 plus, Zeiss). Las imágenes fueron tomadas con una cámara Pixera PVC 100C (Pixera Corporation, Los Gatos, CA, USA) acoplada al microscopio.

### 3.2. Microscopía diferencial de contraste de interferencia (D.I.C.).

El uso de esta técnica permite la obtención de imágenes en relieve de muestras que previamente han sido decoloradas. En este tipo de microscopía, un rayo de luz atraviesa la muestra y luego se divide en dos rayos que interfieren entre sí por medio de un prisma birrefringente. El procedimiento llevado a cabo para analizar la morfología de los embriones empleando esta técnica se describe a continuación:

1. Fijar y deshidratar los embriones durante 3 horas en etanol al 70%.
  2. Sumergir los embriones en una solución de cloralhidrato durante toda la noche.
  3. Disponer las muestras en portaobjetos, añadiendo 1 ml de solución Hoyer's y colocar un cubreobjetos.
  4. Observar las muestras con un microscopio Axioskop 2 plus (Zeiss). Las imágenes fueron tomadas con una cámara Pixera PVC 100C acoplada al microscopio.
- **Solución de cloralhidrato:** 3.5 ml H<sub>2</sub>O, 0.5 g de glicerol, 10 g de cloralhidrato.
  - **Solución Hoyer's:** 7.5 ml de H<sub>2</sub>O, 1.3 g de glicerol, 1.9 g de goma arábiga y 25 g de cloralhidrato.

### 3.3. Microscopía electrónica de barrido (S.E.M.).

La técnica de microscopía electrónica de barrido (S.E.M.) permite la obtención de imágenes en tres dimensiones y de gran resolución. En este tipo de microscopios, la luz es sustituida por un haz de electrones y las lentes por electroimanes. El haz de electrones recorre la superficie de la muestra y cada punto leído se corresponde con un píxel en un monitor de televisión. A continuación, se describen los pasos seguidos para el estudio morfológico de los embriones empleando esta técnica:

1. Fijar los embriones en una solución de paraformaldehído al 4% durante 3 horas.
2. Deshidratar los embriones en una solución de etanol al 70% durante 2 horas.
3. Disponer las muestras en una plancha de aluminio y cubrir con 10 nm de 60/40% Au/Pd empleando un *sputter coater* Edwards S150B (Edwards High vacuum, Ltd., West Sussex, Inglaterra). Trabajar a una presión de 5 mbar de Argón,  $1 \times 10^{-2}$  Torr, 1.5 kV, 20mA durante 60 segundos.
4. Obtener imágenes empleando el microscopio electrónico de barrido AmRAY 3300FE SEM (AmRay, Bedford, MA, USA).

## 4. MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS

### 4.1. Manipulación y cultivo de *Escherichia coli*.

#### 4.1.1. Crecimiento, medios de cultivo y conservación de cepas.

Las diferentes cepas de *E. coli* empleadas para la realización de este trabajo se crecieron a 37°C. Los cultivos en medio líquido se mantuvieron en agitación constante (225 rpm) en un agitador orbital con condiciones de temperatura controlada. El crecimiento de los mismos se estimó midiendo la densidad óptica (D.O.) a 600 nm.

Los medios de cultivo que se utilizaron para la propagación de las cepas fueron los siguientes (Sambrook et al., 1989):

**Medio Luria-Bertani (LB):** bactotripton 1%, NaCl 1%, extracto de levadura 0.5%, pH 7.0. Para la obtención de medio sólido se añadió agar bacteriológico al 2%.

**SOC:** bactotripton 2%, NaCl 10 mM, extracto de levadura 0.5%, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 10 mM y glucosa 20 mM.

Todos los medios se prepararon con agua destilada y fueron autoclavados durante 1 hora a 120°C.

Cuando se llevó a cabo la selección de clones por resistencia a antibióticos, los medios se suplementaron con ampicilina (Amp), kanamicina (Kan) o espectinomicina (Spc) hasta una concentración final de 50 µg/ml (Sigma), preparados en agua y esterilizados a través de filtros estériles de 0.45 µm de diámetro de poro (Albet).

Las cepas bacterianas de *E. coli* se mantuvieron a corto plazo en placas de agar a una temperatura de 4°C. La conservación a largo plazo de las cepas se hizo por congelación en nitrógeno líquido de cultivos crecidos hasta la fase logarítmica tardía:

1. Añadir glicerol estéril a los cultivos hasta una concentración del 30% v/v.
2. Congelar en nitrógeno líquido.
3. Almacenar a una temperatura de -80°C.

#### 4.1.2. Preparación de células competentes.

Para la introducción de DNA plasmídico en *E. coli* se emplearon células competentes, por ser más permeables al DNA, consiguiendo de este modo una transformación más eficiente. La obtención de células competentes DH5 $\alpha$  y DB3.1 de *E. coli* se realizó como se indica a continuación:

1. Realizar un preinóculo en un volumen final de 3 ml de medio LB a partir de una colonia aislada procedente de un cultivo en placa de *E.coli*. Incubar durante toda la noche a 37°C en agitación (250 rpm).
2. Inocular 1 ml de cultivo saturado en un volumen final de 100 ml de medio LB.
3. Incubar durante 3-4 horas a 37°C en agitación (250 rpm).
4. Comprobar el estado de crecimiento del cultivo mediante espectrofotometría. Detener la incubación cuando la D.O a 600 nm sea igual a 0.6.
5. Centrifugar 15 minutos a 3.000 rpm.
6. Descartar el sobrenadante y lavar el precipitado con CaCl<sub>2</sub> 50 mM.
7. Centrifugar 15 minutos a 3.000 rpm.
8. Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado en un volumen final de 1 ml de una solución al 10% de glicerol y CaCl<sub>2</sub> 50 mM.
9. Hacer alícuotas de 100  $\mu$ l y congelar en nitrógeno líquido.
10. Conservar a -80°C.

El resto de células competentes empleadas, TOP10F', fueron suministradas por la casa comercial Invitrogen.

#### 4.1.3. Transformación de células competentes.

La transformación de células competentes de *E.coli* con el producto de la reacción de ligación entre DNA plasmídico y DNA vegetal o con el producto de la reacción de recombinación entre dos plásmidos (apartado 5.5.2), se realizó siguiendo los pasos que se detallan a continuación:

1. Añadir 2-3  $\mu\text{l}$  (aproximadamente 150 ng) del plásmido, producto de ligación o de recombinación a un tubo eppendorf con 50-100  $\mu\text{l}$  de células competentes descongeladas en hielo y mezclar los componentes.
2. Mantener la reacción en hielo durante 30 minutos.
3. Incubar la reacción a 42°C durante 45 segundos y mantener en hielo durante 2 minutos.
4. Añadir 500  $\mu\text{l}$  de medio SOC.
5. Incubar a 37°C con agitación (200 rpm) durante 1 hora.
6. Centrifugar y descartar 200  $\mu\text{l}$  de sobrenadante.
7. Sembrar 2 diluciones diferentes (50 y 200  $\mu\text{l}$ ) en placas con medio LB agar suplementadas con el antibiótico correspondiente para la selección de colonias.
8. Incubar a 37°C durante toda la noche.
9. Conservar las colonias crecidas a 4°C.

## **4.2. Manipulación y cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*.**

### **4.2.1. Crecimiento, medios de cultivo y conservación de cepas.**

La cepa C58C1 de *A. tumefaciens* se creció a una temperatura de 28°C y los cultivos líquidos se mantuvieron en agitación constante (150 rpm) bajo condiciones de temperatura controlada. El crecimiento de los mismos se estimó midiendo la D.O. a 600 nm.

Los medios de cultivo empleados para su propagación fueron los mismos que los usados para las cepas de *E. coli* (apartado 4.1.1).

Cuando se llevó a cabo la selección de clones por resistencia a antibióticos, los medios se suplementaron con Rif y Kan hasta una concentración final de 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Sigma).

La preparación de las muestras bacterianas de *A. tumefaciens* para su conservación fue la misma que la empleada para *E. coli* (apartado 4.1.1).

### **4.2.2. Preparación de células competentes.**

Para la obtención de células competentes de *A. tumefaciens* se realizaron los siguientes pasos:

1. Realizar un preinóculo, a partir de una colonia aislada procedente de un cultivo en placa de *A. tumefaciens*, en un volumen final de 10 ml de medio LB añadiendo Rif hasta alcanzar una concentración final de 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Incubar durante la noche a 28°C en agitación (200 rpm).

2. Inocular 4 ml de cultivo saturado en un volumen final de 200 ml de medio LB, añadiendo Rif hasta alcanzar una concentración final de 50 µg/ml.
3. Incubar durante 5-6 horas a 28°C en agitación (200 rpm).
4. Comprobar el estado de crecimiento del cultivo mediante espectrofotometría. Detener la incubación cuando la D.O. a 600 nm sea igual a 0.8.
5. Centrifugar 5 minutos a 4.000 rpm y a una temperatura de 4°C.
6. Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 100 ml de Tris-HCl 10 mM, pH 8.
7. Centrifugar 5 minutos a 4.000 rpm y a una temperatura de 4°C.
8. Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado en un volumen final de 2 ml de medio LB, añadiendo glicerol hasta alcanzar una concentración del 10%.
9. Hacer alícuotas de 200 µl y congelar en nitrógeno líquido.
10. Conservar a -80 °C.

#### 4.2.3. Transformación de células competentes.

Para llevar a cabo la transformación de células competentes de *A. tumefaciens* C58C1 se siguieron los pasos que se detallan a continuación:

1. Añadir 100-500 ng de DNA transformante a una suspensión de 200 µl de células competentes de *A. tumefaciens*, previamente descongelada en hielo y mezclar.
2. Congelar en nitrógeno líquido durante 5 minutos.
3. Descongelar en un baño a 37°C durante 25 minutos.
4. Añadir 1 ml de LB.
5. Incubar durante 1 hora a 28°C en agitación (200 rpm).
6. Centrifugar y descartar 200 µl de sobrenadante.
7. Sembrar 2 diluciones diferentes (50 y 200 µl) en placas de LB suplementadas con Rif y con el antibiótico frente al que presente resistencia el DNA transformante hasta alcanzar una concentración final de 50 µg/ml.
8. Incubar a 28°C durante toda la noche y conservar las placas a 4°C.

#### 4.3. Inoculación de plantas de *A. thaliana* con microorganismos fitopatógenos.

La infección de plantas de *A. thaliana* se realizó usando el hongo necrotrofo *Botrytis cinerea* (cepa BO5-10), cedido por el Prof. Ernesto Pérez-Benito (USAL) y el oomiceto hemibiotrofo *Pythium ultimum*, cedido por el Dr. Roberto Solano (CNB-CSIC). *B. cinerea* es

un hongo fitopatógeno de muchas especies vegetales, caracterizado por presentar abundantes conidios (esporas sexuales) capaces de originar nuevas infecciones y por reproducirse mediante esclerocios altamente resistentes frente a condiciones ambientales adversas. Este tipo de patógenos son organismos heterótrofos que primero matan los tejidos que parasitan, para después asimilarlos saprotróficamente. Por su parte, *P. ultimum* es un oomiceto parásito de plantas que tiende a ser muy inespecífico y generalista con sus huéspedes. Son necrotrofos facultativos que pueden obtener sus nutrientes de tejidos muertos de organismos vivos o bien extraer sus nutrientes de materia orgánica muerta.

#### 4.3.1. Infección de plantas de Arabidopsis.

Para proceder con la infección de plantas de Arabidopsis empleando esporas de *B. cinerea* se siguió el protocolo detallado a continuación:

1. Diluir en medio Gamborg's B5 una suspensión en agua de esporas de *B. cinerea* ( $6 \times 10^6$  esporas/ml) previamente crecido en medio PDB, hasta una concentración final de 350.000 esporas/ml.
  2. Marcar con un rotulador el peciolo de 3-4 hojas no consecutivas de las plantas a infectar.
  3. Depositar una gota de 10  $\mu$ l sobre la superficie de cada hoja marcada.
  4. Colocar los alvéolos con las plantas infectadas en una bandeja e incubar a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas para permitir que se sequen las gotas.
  5. Tapar las bandejas con una cubierta transparente y sellar con plástico parafilm para mantener un alto grado de humedad en el interior, favoreciendo de este modo la acción infectiva del hongo.
  6. Incubar a 22°C en condiciones de día largo durante 5-6 días.
- **Medio Gamborg's B5:** medio mínimo Gamborg's B5 (Applichem) (3.17 g/l), sacarosa 10 mM, K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8.5 mM.
  - **PDB:** medio *Potato Dextrose Broth* 24 g/l.

La infección con *P. ultimum* se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento:

1. Crecer el oomiceto en placas de patata-dextrosa-agar (PDA).
  2. Marcar con un rotulador el peciolo de 3-4 hojas no consecutivas de las plantas a infectar.
  3. Depositar sobre la superficie de cada hoja marcada un disco de medio PDA en el que se ha crecido el oomiceto.
  4. Colocar los alvéolos con las plantas infectadas en una bandeja y taparlas con una cubierta transparente para mantener un alto grado de humedad en el interior, favoreciendo de este modo la acción infectiva del oomiceto.
  5. Incubar a 22°C en condiciones de día largo durante 5-6 días.
- **PDA:** medio *Potato Dextrose Agar* 39 g/l.

#### 4.3.2. Tinción de hifas fúngicas.

Para una mejor visualización de la zona de necrosis en las hojas infectadas, se realizó su tinción con una solución alcohólica de lactofenol y azul de tripano (*trypan blue*):

1. Cortar las hojas sobre las que se realizó la infección y sumergirlas en una solución alcohólica de lactofenol-*trypan blue* (1 parte de lactofenol-*trypan blue*/2 partes de etanol al 95%).
  2. Introducir el tejido en un baño de agua hirviendo durante 1 minuto.
  3. Dejar las muestras a temperatura ambiente durante 30 segundos y sumergirlas de nuevo en un baño de agua hirviendo durante 30 segundos adicionales.
  4. Incubar las muestras en la solución alcohólica a temperatura ambiente durante 4-48 horas.
  5. Retirar la solución y cubrir el tejido con una solución de cloralhidrato. Desteñir hasta que el tejido quede transparente.
  6. Visualizar en el microscopio colocando el tejido en un portaobjetos añadiendo cloralhidrato y cubrir con un cubreobjetos.
- **Lactofenol-*trypan blue*:** 10 ml de fenol, 10 ml de glicerol, 10 ml de ácido láctico, 10 ml de agua destilada, 0.02 g de *trypan blue* (Sigma).
  - **Solución desteñir:** 250 g de cloralhidrato, 100 ml de agua destilada.

## 5. ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

### 5.1. Extracción y purificación de DNA genómico.

Para la extracción de DNA genómico de *A. thaliana* se utilizó una adaptación de la técnica de Aitchitt et al. (1993). Se partió de una cantidad aproximada de tejido verde (hojas de la roseta basal y hojas caulinares) de 50 mg, previamente congelado en nitrógeno líquido. Seguidamente, se procedió con los siguientes pasos:

1. Disgregar el tejido utilizando bolas de vidrio de 425-600 microns (Sigma) empleando el homogenizador Silamat S5 (Ivoclar Vivadent, Madrid) durante 15 segundos.
  2. Homogeneizar la muestra con 500 µl de tampón CTAB 3X, agitando en el Silamat S5 durante 5 segundos.
  3. Incubar a 65°C durante 30 minutos.
  4. Añadir 500 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y agitar en vórtex.
  5. Centrifugar 10 minutos a 14.000 rpm y recoger el sobrenadante.
  6. Añadir 500 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1).
  7. Centrifugar 10 minutos a 14.000 rpm y recoger el sobrenadante.
  8. Añadir 1 ml de etanol 100% y 150 µl de acetato de sodio 3 M, pH 5.2 para precipitar el DNA. Dejar precipitando al menos 1 hora a temperatura ambiente.
  9. Centrifugar 10 minutos a 14.000 rpm.
  10. Descartar el sobrenadante y secar el precipitado durante 3 minutos a temperatura ambiente.
  11. Resuspender el precipitado en 50 µl de agua estéril, a una temperatura de 4°C durante toda la noche.
  12. Tratar con 0.5 µl de RNasa pancreática libre de DNasa (10 µg/ml) para eliminar restos de RNA e incubar 30 minutos a 37°C.
  13. Verificar la calidad y estimar la cantidad de DNA obtenida por electroforesis.
  14. Almacenar la muestra a -20°C.
- **Tampón CTAB 3X:** CTAB 3% (w/v), Tris-HCl 100 mM pH 8.0, EDTA 20 mM, NaCl 1.4 M y β- mercaptoetanol 1% (v/v).

## 5.2. Extracción y purificación de DNA plasmídico.

El aislamiento de DNA plasmídico a partir de células de *E.coli* se realizó con el kit QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante y los pasos descritos a continuación:

1. Inocular 10 ml de medio LB, suplementado con el antibiótico adecuado, con una colonia bacteriana procedente de placa o conservada en glicerol.
  2. Incubar a 37°C con agitación (200-250 rpm) durante toda la noche.
  3. Centrifugar 5 ml del cultivo a 3.000 rpm durante 15 minutos y descartar el sobrenadante.
  4. Resuspender en 250 µl del tampón P1.
  5. Añadir 250µl de tampón de lisis P2.
  6. Incubar a temperatura ambiente 5 minutos.
  7. Añadir 350 µl del tampón N3 y mezclar.
  8. Centrifugar a 13.000 rpm durante 10 minutos.
  9. Decantar el sobrenadante en una columna de afinidad y centrifugar a 13.000 rpm durante 60 segundos.
  10. Añadir 500 µl del tampón de lavado PB y centrifugar a 13.000 rpm durante 60 segundos.
  11. Repetir el lavado con 750 µl de tampón PE y centrifugar a 13.000 rpm durante 60 segundos.
  12. Centrifugar de nuevo la columna a 13.000 rpm durante 60 segundos para eliminar los restos de etanol.
  13. Eluir el DNA plasmídico añadiendo 50 µl de agua autoclavada estéril.
  14. Centrifugar 1 minuto a 13.000 rpm.
  15. Conservar a -20°C.
- **Tampones:** P1, P2, N3, PB y PE, formulación del fabricante.

### 5.3. Extracción y purificación de RNA total.

#### 5.3.1. Extracción y purificación de RNA total de tejido verde

Como material de partida para la extracción de RNA de Arabidopsis, se utilizó una cantidad aproximada de 100 mg de tejido verde previamente congelado en nitrógeno líquido. Los pasos seguidos para la extracción de RNA fueron los siguientes:

1. Introducir en un tubo eppendorf de 1.5 ml una cantidad aproximada de 100 mg de material vegetal junto con 100  $\mu$ l de bolas de vidrio de 425-600 microns (Sigma). Disgregar el tejido durante 20 segundos en el Silamat S5 con la precaución de que el material de partida no se descongele.
2. Añadir 1 ml de Tri-Reagent (Ambion) por cada 100 mg de tejido. Agitar durante 10 segundos en el Silamat S5.
3. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir la disociación de los complejos nucleoproteicos.
4. Centrifugar 15 minutos a 13.400 rpm a una temperatura de 4°C. Pasar el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo.
5. Añadir 200  $\mu$ l de cloroformo e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Centrifugar 15 minutos a 13.400 rpm a una temperatura de 4°C. Transferir la fase acuosa (que contendrá el RNA) a un tubo eppendorf nuevo. La interfase y la fase orgánica presentarán DNA y proteínas.
7. Añadir 500  $\mu$ l de isopropanol (2-propanol) por cada ml de Tri-Reagent. Mezclar 10 segundos en vórtex y dejar incubando al menos 1 hora a temperatura ambiente.
8. Centrifugar 8 minutos a 13.400 rpm a una temperatura de 4°C. Descartar el sobrenadante.
9. Añadir 1 ml de etanol al 75% conservado a -20°C. Agitar en vórtex para lavar el precipitado.
10. Centrifugar 5 minutos a 9.000 rpm a una temperatura de 4°C. Descartar el sobrenadante.
11. Centrifugar a máxima velocidad y eliminar el etanol restante pipeteando. Secar el precipitado durante 5 minutos a temperatura ambiente.
12. Resuspender el precipitado en 40  $\mu$ l de agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato) (0.4 ml/l), incubando 10 minutos a 60°C y a 4°C durante al menos 5 horas.
13. Centrifugar durante 10 minutos a 13.400 rpm y transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo.
14. Conservar la muestra a -80°C.

### 5.3.2. Extracción y purificación de RNA total de semillas.

La obtención de RNA de semillas de Arabidopsis, se llevó a cabo siguiendo una adaptación de la técnica de Oñate-Sánchez y Vicente-Carbajosa (2008):

1. Triturar aproximadamente 20-25 mg de semillas congeladas en nitrógeno líquido, con ayuda de un mortero y evitando que el material de partida se descongele.
2. Transferir el polvo con una espátula a un tubo eppendorf de 1.5 ml y añadir 550 µl de tampón de extracción y 550 µl de cloroformo.
3. Mezclar en vórtex y centrifugar 3 minutos a 13.000 rpm.
4. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo, añadir 500 µl de fenol saturado en agua, mezclar en vórtex y añadir 200 µl de cloroformo.
5. Mezclar en vórtex y centrifugar 3 minutos a 13.000 rpm.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo y añadir 150 µl de una solución 8 M de cloruro de litio. Mezclar el contenido e incubar a 4°C durante al menos 2 horas.
7. Centrifugar 30 minutos a 13.000 rpm a una temperatura de 4°C. Descartar el sobrenadante.
8. Resuspender el precipitado en 470 µl de agua tratada con DEPC y 7 µl de acetato de sodio 3 M, pH 5.2. Añadir 250 µl de etanol.
9. Centrifugar 10 minutos a máxima velocidad y a una temperatura de 4°C.
10. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo y mezclar con 43 µl de acetato de sodio 3 M, pH 5.2. Posteriormente, añadir 750 µl de etanol e incubar a -20°C durante al menos 1 hora.
11. Centrifugar a máxima velocidad durante 20 minutos y lavar el precipitado con 500 µl de etanol al 70%
12. Centrifugar a máxima velocidad y eliminar el etanol restante pipeteando. Secar el precipitado 5 minutos a temperatura ambiente.
13. Resuspender el precipitado en 30 µl de agua tratada con DEPC.

- **Tampón de extracción:** LiCl 0.4 M, Tris base 0.2 M pH 8, EDTA 25 mM, 1% SDS.

### 5.4. Cuantificación de ácidos nucleicos.

La determinación de la concentración de DNA y RNA se realizó midiendo la absorbancia de los extractos a una longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1603). Los cálculos se llevaron a cabo considerando que una unidad de

densidad óptica (D.O.)  $A_{260}$  equivale a 50  $\mu\text{g/ml}$  de DNA y a 40  $\mu\text{g/ml}$  de RNA. Para determinar la pureza de la muestra y el grado de contaminación en azúcares y proteínas, se midió la D.O. a 235 nm y 280 nm, respectivamente. También se empleó el espectrofotómetro ultrasensible de medición de ácidos nucleicos (Nanodrop *Technologies* Inc), que a través de un programa informático proporciona la concentración de DNA o RNA ( $\mu\text{g}/1\mu\text{l}$ ) presente en la muestra.

## 5.5. Tratamiento y modificación de ácidos nucleicos.

### 5.5.1. Digestión del DNA con enzimas de restricción.

La caracterización física de fragmentos de DNA y la separación de insertos de cDNA plasmídico se llevó a cabo mediante la realización de tratamientos con endonucleasas de restricción. Las enzimas empleadas y la temperatura óptima de actuación, además de las secuencias nucleotídicas concretas sobre las que actúan, aparecen en la tabla M.5. Los tiempos de incubación oscilaron desde las 3 horas a toda la noche. Para llevar a cabo la digestión se siguieron las especificaciones del fabricante (Roche) añadiendo los siguientes componentes:

DNA plasmídico:	3 $\mu\text{l}$
Enzima de restricción:	1 $\mu\text{l}$
Tampón 10X:	1.5 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O destilada:	9.5 $\mu\text{l}$

- **Tampón 10X:** composición variable según la enzima utilizada.

**Tabla M.5.** Enzimas de restricción empleadas para la digestión de DNA. Las barras (/) indican el lugar de corte de la enzima dentro de la secuencia nucleotídica.

ENZIMA	TEMPERATURA	SECUENCIA
<i>Acc</i> I	37°C	GT/(A,C)(T,G)AC
<i>Apa</i> I	30°C	GGGCC/C
<i>Bam</i> H I	37°C	G/GATCC
<i>Eco</i> R I	37°C	G/AATTC
<i>Hind</i> III	37°C	A/AGCTT
<i>Nde</i> I	37°C	CA/TATG
<i>Sac</i> I	37°C	GAGCT/C
<i>Sma</i> I	25°C	CCC/GGG
<i>Spe</i> I	37°C	A/CTAGT
<i>Xba</i> I	37°C	T/CTAGA

### 5.5.2. Reacción de ligación y recombinación por tecnología *GATEWAY*.

La construcción de moléculas recombinantes obtenidas por inserción en vectores plasmídicos de fragmentos de DNA vegetal (procedentes de la purificación de fragmentos de DNA obtenidos por PCR, apartados 5.6 y 5.8), se llevó a cabo en el vector plasmídico de entrada pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen):

1. Añadir 4 µl del inserto purificado en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
2. Añadir 1 µl de *Salt Solution*.
3. Incluir 0.7 µl del plásmido pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup>.
4. Mezclar todos los componentes de la reacción e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
5. Conservar a -20°C.

- ***Salt Solution***: NaCl 1.2 M , MgCl<sub>2</sub> 0.06 M.

La reacción de recombinación entre 2 vectores plasmídicos diferentes se realizó haciendo uso de la tecnología *GATEWAY*. En este tipo de reacciones, se transfiere una secuencia nucleotídica desde un vector de entrada (pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup>) a un vector de destino. En el primero de los vectores, la secuencia de interés está flanqueada por dos sitios de recombinación (*attL1* y *attL2*). Por su parte, el vector de destino también presenta dos sitios de recombinación (*attR1* y *attR2*) a ambos lados de otra secuencia nucleotídica (generalmente el gen de selección negativa *CCDB*). Al combinar ambos plásmidos en presencia de la mezcla de enzimas *LR Clonase*<sup>TM</sup> *II* (que contiene excisionasas e integrasas del bacteriófago λ y la proteína IHF de *E. coli*), se producen dos reacciones de recombinación específicas, una entre *attL1* y *attR1* y otra entre *attL2* y *attR2*. Como resultado, se generan dos moléculas recombinantes, quedando integrada la secuencia de interés en el vector de destino. Para llevar a cabo esta reacción, se siguieron las instrucciones del fabricante (Invitrogen):

1. Añadir los siguientes componentes :
  - Vector de entrada (50-100 ng)                      1-7 µl
  - Vector de destino (50-100 ng)                      1 µl
  - Tampón TE, pH 8                                      hasta 8 µl
2. Añadir 2 µl del mix de enzimas *LR Clonase*<sup>TM</sup> *II* (Invitrogen) a la reacción y agitar en vórtex.
3. Incubar la reacción a 25°C durante 1 hora.

4. Añadir 1 µl de Proteínasa K para terminar la reacción.
5. Incubar la muestra a 37°C durante 10 minutos.
6. Conservar a -20°C.

- **Tampón TE:** Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM.

Con el producto de las reacciones de ligación o de recombinación, se transformaron células competentes de *E. coli* (DH5α y DB3.1) (apartado 4.1.3) en medio selectivo (suplementado con antibiótico) para identificar las colonias portadoras de los plásmidos recombinantes deseados.

### 5.5.3. Reacción de retrotranscripción del RNA.

Para llevar a cabo la síntesis de DNA copia (cDNA) tomando como material de partida RNA se siguieron las instrucciones del fabricante (*1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR*, Roche):

1. Partir de 1 µg de RNA obtenido de *A. thaliana* (apartado 5.3) y desnaturalizar calentando a 65°C durante 15 minutos, seguidos de 5 minutos en hielo.
2. Añadir los siguientes componentes al RNA en un volumen final de 20 µl:

Tampón 10X	2µl
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	4µl
dNTPs (10 mM)	2µl
Oligo-p(dT) <sub>15</sub> (0.8 µg/µl)	2µl
Inhibidor de RNasa (50 U/µl)	1µl
Transcriptasa reversa (AMV, Roche)	0.8µl
H <sub>2</sub> O	hasta 20µl

3. Incubar la reacción a 25°C durante 10 minutos para permitir el anillamiento del Oligo-p (dT)<sub>15</sub>.
4. Incubar la reacción a 42°C durante 1 hora para que se produzca la elongación de la cadena.
5. Desnaturalizar incubando a 99°C durante 5 minutos, seguidos de 5 minutos en hielo.
6. Conservar a -20°C.

- **Tampón 10X:** Tris-HCl 100 mM, KCl 500 mM, pH 8.3.

### 5.6. Amplificación de DNA: reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que permite amplificar clones o fragmentos de DNA 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. Las reacciones rutinarias se llevaron a cabo empleando los termocicladores *Mastercycler gradient* (Eppendorf) y *Gene Amp PCR System 9700* (Perkin-Elmer), en un volumen final de 50 µl que contiene:

DNA ( $\leq 1 \mu\text{g}$ ):	2 µl
Oligonucleótido sentido (100 µM):	1 µl
Oligonucleótido antisentido (100 µM)	1 µl
dNTPs (Roche) (10 mM):	1 µl
Tampón 10X:	5 µl
<i>Taq</i> polimerasa (Roche) (5U/µl):	1 µl
Expand High Fidelity (Roche) (5U/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O destilada estéril:	39 µl

- **Tampón 10X:** Tris-HCl 10 mM, pH 8.3, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM.

Las condiciones de temperatura y tiempos se detallan a continuación. La temperatura de anillamiento se calculó con el programa Oligo 4.05, dependiendo de la longitud y composición de los oligonucleótidos empleados en la reacción de PCR, siguiendo la fórmula  $2(A+T)+4(G+C)$  (Tabla M.6). El tiempo de extensión aproximado fue de 1 minuto por cada kb de longitud del fragmento de DNA a amplificar:

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

**Tabla M.6.** Oligonucleótidos utilizados para la amplificación y secuenciación de fragmentos de DNA por PCR.

SECUENCIA	GEN	ORIENTACIÓN	CARACTERÍSTICAS
5'-CAA ACC CTA TCT GTC CGT AC -3'	ABI3	SENTIDO	57.3°C 20 pb
5'-CGG ATG GCG AGA CAG AGG A -3'	ABI3	SENTIDO	61.0°C 19 pb
5'-GGG TAC GCT GCC ATT TTT TC -3'	ABI3	ANTISENTIDO	57.3°C 20 pb
5'-AAC CTC CTC TGT CTC GCC A -3'	ABI3	ANTISENTIDO	58.8°C 19 pb
5'-GAC CCT TTA GCT TCC CAA CAT -3'	ABI4	SENTIDO	57.9°C 21 pb
5'-CAA TAA AAT CCC AAA TAC TCC -3'	ABI4	ANTISENTIDO	52.0°C 21 pb
5'-ATG GAA GAG ATT TCA CCT GC -3'	HAB2	SENTIDO	55.3°C 20 pb
5'-AAG AGC TCG AGC ATA CAC TG -3'	HAB2	ANTISENTIDO	57.3°C 20 pb
5'-GAG TGT GCC TTT GTA TGG TT -3'	ABI1	SENTIDO	55.3°C 20 pb
5'-AAG AGC TCG AGC ATA CAC TG -3'	ABI1	ANTISENTIDO	57.3°C 20 pb
5'-ATG GAC ACG AAG GCG GTT GG -3'	ANAC089	SENTIDO	55.3°C 20 pb
5'-AAG AGC TCG AGC ATA CAC TG -3'	ANAC089	ANTISENTIDO	57.3°C 20 pb
5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT -3'	M13	SENTIDO	54.0°C 18 pb
5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'	T7	SENTIDO	56.0°C 20 pb

## 5.7. Electroforesis de DNA.

El análisis de los fragmentos de DNA obtenidos (genómico, plasmídico o amplificado por PCR), se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 1.2 % (w/v). En la preparación de los geles y el desarrollo de las electroforesis se siguieron los procedimientos convencionales descritos por Sambrook et al. (1989):

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

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

1. Añadir a las muestras el tampón de carga (*Loading Buffer*) LB 10X.
2. Centrifugar 5 segundos a máxima velocidad.
3. Cubrir el gel completamente con tampón de electroforesis TBE 1X.
4. Cargar las muestras en los pocillos del gel con ayuda de una micropipeta.
5. Aplicar una diferencia de potencial de 70-90 V durante 40 minutos.
6. Visualizar los fragmentos de DNA en un transiluminador con luz ultravioleta (*UVP BioDoc-It™ Imaging System*).

Como marcador de peso molecular se empleó DNA del fago  $\lambda$  digerido con las enzimas de restricción *EcoR1* y *HindIII* (Sigma), que permite la diferenciación de fragmentos de DNA con pesos moleculares que oscilan entre 21 y 0.5 kb.

- **LB 10X:** Tris-HCl 1 M pH 8.0, glicerol 60%, azul de bromofenol 0.25%, xylene cyanol 0.25%.
- **Tampón TBE 1X:** Tris/ácido bórico 1 M, EDTA 20 mM.

### 5.8. Purificación de fragmentos de DNA.

La purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa para su posterior uso y caracterización (obtención de sondas, secuenciación,...) se realizó utilizando el kit *GeneClean Turbo Nucleic Acid Purification* (Bio 101 Systems, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras la separación de los fragmentos por electroforesis, se procedió de la siguiente forma:

1. Cortar el fragmento de interés del gel de agarosa con un bisturí estéril bajo luz UV.
2. Introducir el trozo de agarosa en un tubo eppendorf de 1.5 ml y añadir 100  $\mu$ l de *GeneClean Turbo Salt* por cada 0.1 g de gel de agarosa.
3. Incubar a 55°C durante 5 minutos, mezclando el contenido cada 2 minutos para disolver la agarosa.
4. Transferir a una columna *GeneClean Turbo Cartridge* y centrifugar 5 segundos a 13.300 rpm.
5. Descartar el sobrenadante y lavar el precipitado con 500  $\mu$ l de la solución de lavado *Turbo Wash*.
6. Centrifugar a 13.300 rpm durante 5 segundos y descartar el sobrenadante.
7. Repetir el lavado y centrifugar a 13.300 rpm durante 4 minutos para eliminar cualquier resto de solución de lavado.
8. Colocar la columna en un tubo eppendorf nuevo, añadir 30  $\mu$ l de la solución *Turbo Elution* y dejar 5 minutos a temperatura ambiente.
9. Centrifugar a 13.300 rpm durante 1 minuto y obtener el eluido que contiene el DNA.
10. Conservar el DNA a -20°C.

### 5.9. Secuenciación de DNA.

La determinación de la secuencia de nucleótidos de los clones de DNA obtenidos, se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca, que cuenta con un secuenciador automático ABI 377 (*Perkin Elmer Applied Biosystems, Inc.*) y emplea el *dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* con la enzima *Ampli Taq DNA polimerase FS* (Perkin Elmer). Las muestras se prepararon del siguiente modo:

1. Introducir en un tubo eppendorf de 1.5 ml al menos 100 ng de DNA de doble cadena contenidos en un volumen de 6  $\mu$ l.
2. Añadir al tubo eppendorf 2-4 pmol del oligonucleótido correspondiente hasta alcanzar un volumen final de 8  $\mu$ l. Los iniciadores empleados fueron M13 universal y promotor T7, además de los específicos para cada clon (tabla M.6).

### 5.10. Electroforesis de RNA.

La electroforesis de RNA se llevó a cabo en geles desnaturalizantes de agarosa al 1.6% (w/v) que se elaboraron de la siguiente manera:

1. Mezclar 1.8 g de agarosa en 112.5 ml de agua milli Q.
2. Llevar la mezcla hasta ebullición en el microondas.
3. Añadir 15 ml de tampón MEN 10X y 28 ml de formaldehído al 37% (v/v).
4. Distribuir la mezcla en el molde para geles y solidificar a temperatura ambiente.

Las muestras se prepararon del modo que se indica a continuación:

1. Tomar el volumen de muestra necesario para obtener una cantidad de 10  $\mu$ g de RNA y completar hasta alcanzar un volumen final de 20  $\mu$ l con agua destilada estéril en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
2. Añadir 31.3  $\mu$ l de tampón de carga (LB Northern).
3. Desnaturalizar la muestra incubando a 55°C durante 15 minutos, seguidos de otros 5 minutos en hielo.
4. Bajar la condensación por centrifugación a máxima velocidad.

Para cargar la muestra en el gel se siguieron los pasos que se indican a continuación:

1. Añadir a la cubeta tampón de electroforesis MEN 1X, sin llegar a cubrir totalmente el gel.
  2. Cargar 10  $\mu$ l de LB 1:10 en uno de los pocillos del gel, para visualizar el frente de corrido.
  3. Cargar las muestras en los pocillos del gel y llenarlos con el propio tampón de electroforesis MEN 1X.
  4. Aplicar una diferencia de potencial de 55V durante 5 minutos para que la muestra penetre en el gel.
  5. Cubrir el gel completamente con tampón de electroforesis MEN 1X.
  6. Aplicar una diferencia de potencial de 70V durante 2 horas.
- **MEN 10X:** MOPS 200 mM, acetato de sodio 50 mM, EDTA 10 mM pH 7.
  - **LB Northern:** Formamida 20  $\mu$ l, MEN 10X 5  $\mu$ l, formaldehído 6  $\mu$ l, bromuro de etidio 0.3  $\mu$ l.

#### 5.11. Transferencia de RNA a membrana: Northern Blot.

Esta técnica permite detectar moléculas de RNA de una secuencia específica dentro de una mezcla compleja. Incluye la transferencia de RNAs separados por electroforesis, a una membrana de nylon y su hibridación con una secuencia de cDNA marcada radiactivamente, que reconoce específicamente la secuencia de RNA inmovilizada en la membrana.

Después de la electroforesis, el gel de RNA se visualizó en el transiluminador *UVP BioDoc-It™ Imaging System* para obtener un control de carga y se procedió a la transferencia en membrana de nylon como se describe a continuación:

1. Añadir el tampón de transferencia SSC 20X a la cubeta.
2. Depositar en la cubeta una plancha de cristal como soporte del gel.
3. Colocar una mecha de papel de filtro (Whatman 3MM) encima de la plancha de cristal y empaparla con tampón SSC 20X. Eliminar las burbujas que hayan quedado atrapadas con la ayuda de una pipeta de vidrio estéril.
4. Disponer el gel con la cara de la transferencia en contacto con la mecha evitando la formación de burbujas.
5. Depositar una membrana de nylon (Hybond-N, Amersham) de las mismas dimensiones que el gel y eliminar las burbujas que hayan quedado atrapadas entre la membrana y el gel.

6. Colocar tres papeles Whatman 3MM sobre el gel.
  7. Emplear servilletas como material absorbente.
  8. Disponer en la parte superior una plancha de vidrio y un peso (300-500g) para compactar el sistema y facilitar la transferencia.
  9. Mantener la transferencia durante 16-18 horas, cambiando las servilletas a intervalos de 8 horas.
  10. Una vez finalizada la transferencia, fijar durante 2 minutos el RNA al filtro utilizando un *Stratalinker* (UV) 1800 (Stratagene).
- **SSC 20X:** NaCl 3 M, citrato sódico 0.3 M pH 7-8.

### 5.12. Marcaje radiactivo de DNA, hibridación y autorradiografía.

El marcaje radiactivo de los fragmentos de DNA se realizó empleando el kit *Rediprime II Random Prime Labelling System* (Amersham Biosciences).

Como isótopo radiactivo para marcar el DNA se utilizó  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ . El nucleótido marcado radiactivamente fue la citosina y para la síntesis de la cadena complementaria del DNA se empleó el fragmento *Klenow* de la enzima DNA polimerasa I.

1. Diluir el DNA (2.5-25 ng) que queremos marcar en un volumen final de 45  $\mu\text{l}$  de tampón TE.
2. Desnaturalizar el DNA en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos seguido de 5 minutos en hielo.
3. Centrifugar 5-10 segundos a máxima velocidad.
4. Añadir el DNA desnaturalizado al tubo con la reacción de marcaje que contiene dATP, dGTP, dTTP, tampón, enzima *Klenow* carente de actividad exonucleasa 5'-3' y oligonucleótidos al azar.
5. Añadir 5  $\mu\text{l}$  de citosina marcada radiactivamente [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] dCTP (3000 Ci/mmol) (Amersham) al tubo que contiene la reacción de marcaje y mezclar pipeteando.
6. Incubar a 37°C durante 1 hora.
7. Parar la reacción añadiendo 0.5  $\mu\text{l}$  de EDTA 0.5 M y 50  $\mu\text{l}$  de tampón TE.
8. Eliminar el exceso de nucleótidos marcados radiactivamente antes de utilizar la sonda en las reacciones de hibridación, usando las columnas *Mini Quick Spin DNA* (Roche) para su purificación. Para ello, se resuspende la resina de la columna por vórtex y tras romper la parte inferior de la misma, se coloca en un tubo eppendorf y se centrifuga 1 minuto a 3.000 rpm para eliminar el exceso de tampón.

9. Aplicar la muestra en el centro de la columna y centrifugar a 3.000 rpm durante 2 minutos. Recoger el eluido en un eppendorf que contiene la sonda purificada sin los nucleótidos no incorporados. Medir la relación de radiactividad sonda:columna ( $\geq 2:1$ ).
  10. Desnaturalizar la sonda someténdola a un baño de agua hirviendo durante 5 minutos, seguido de otros 5 minutos en hielo.
- **Tampón TE:** Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM.

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

1. Precalentar el horno de hibridación a 65°C.
2. En una botella de hibridación mezclar 4 ml de tampón fosfato 1 M pH 7.2, 9 ml de agua milli Q estéril y 7 ml de SDS 20%.
3. Calentar a 65°C durante 15 minutos en el horno de hibridación.
4. Añadir a la botella de hibridación 40  $\mu$ l de EDTA 0.5 M pH 8.
5. Prehibridar el filtro durante 1-2 horas a 65°C.
6. Añadir la sonda radiactiva desnaturalizada al líquido de prehibridación evitando que toque la membrana.
7. Hibridar durante 16 horas a una temperatura de 65°C.

Una vez finalizada la hibridación, se procedió a eliminar el exceso de radiactividad de la membrana:

1. Precalentar a 65°C las soluciones de lavado SSC 2X; SDS 0,1% y SSC 0.5X; SDS 0,1%.
2. Recoger la sonda en un tubo de 50 ml para su posible reutilización y conservar a -20°C en una urna de metacrilato.
3. Realizar un primer lavado de la membrana con la solución SSC 2X; SDS 0,1% a 65°C durante 15 minutos.
4. Realizar un segundo lavado del filtro con la solución SSC 0.5X; SDS 0,1% a 65°C durante 10 minutos.
5. Comprobar el nivel de radiactividad del filtro y repetir el último lavado en caso de ser necesario.
6. Cubrir el filtro con una película plástica y exponer en una placa de imagen Bas-IP 2040S (20x40 cm) Fujifilm durante 24-48 horas.

7. Revelar la placa de imagen en un analizador de bioimágenes (*Bio-imagin analyzer* Bas 1500, Fujifilm).

### 5.13. RT-PCR cuantitativa (Q RT-PCR).

Esta técnica, fundamentada en la PCR convencional, se basa en la detección y cuantificación simultánea de la fluorescencia emitida por los productos de PCR acumulados durante el proceso de amplificación. La fluorescencia se cuantifica mediante el valor *ct* (*cycle threshold*) definido como el número de ciclos requeridos para que la señal de fluorescencia sobrepase el nivel umbral. Permite analizar cambios en la expresión de un gen en una muestra en relación a otra muestra de referencia, que generalmente contiene genes de expresión invariable (denominados genes *housekeeping*), tales como el gen *ACTINA8*, utilizado en el presente trabajo. Esta modificación del proceso tradicional de PCR, amplifica secuencias de RNA que previamente son convertidos a cDNA por acción de la enzima transcriptasa reversa (apartado 5.5.3). Paralelamente, se ha de realizar una curva patrón en las mismas condiciones, empleando la sonda de un gen de expresión invariable para conocer la cantidad total de cDNA que se está amplificando.

Los análisis de expresión génica realizados mediante Q RT-PCR se llevaron a cabo empleando cDNA sintetizado a partir de 1 µg de RNA (apartado 5.5.3). Los oligonucleótidos se diseñaron en el programa *Primer Express 1.0* (*Applied Biosystems*), usando como control cebadores específicos del gen *ACTINA8* (las secuencias de todos ellos se detallan en la Tabla M.7). La reacción de amplificación se llevó a cabo en el termociclador ABI PRISM 7000 *Sequence Detection System* (*Applied Biosystems*, USA), empleando el kit *Brilliant<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green PCR MasterMix* (Stratagene), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

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

1. Añadir la combinación óptima de oligonucleótidos para que queden a una concentración final de 0.2 µM.
2. Añadir 5 µl de una dilución 1:25 de las muestras de cDNA a cada pocillo.
3. Preparar la mezcla de reacción y añadir 20 µl a cada pocillo.
4. Centrifugar 10 segundos a máxima velocidad.

- **Mezcla de reacción 20 µl:** *Brilliant™ SYBR® Green I QPCR master mix* 12 µl (*Sure Start Taq DNA* polimerasa, tampón, mezcla de nucleótidos y *SYBR Green*), oligonucleótidos sentido y antisentido (0.2 µM), 0.375 µl ROX 300 nM, H<sub>2</sub>O estéril hasta 20 µl.

Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

50°C 2 minutos  
 95°C 10 minutos  
 95°C 15 segundos } 40 ciclos  
 60°C 1 minuto  
 72°C 50 segundos  
 4°C ∞

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

**Tabla M.7.** Oligonucleótidos empleados para los análisis de expresión mediante Q RT-PCR.

SECUENCIA	GEN	ORIENTACIÓN	CARACTERÍSTICAS
5' -AGT GGT CGT ACA ACC GGT ATT GT -3'	<i>β-ACTINA8</i>	SENTIDO	60°C 23 pb
5' -GAG GAT AGC ATG TGG AAG TGA GAA -3'	<i>β-ACTINA8</i>	ANTISENTIDO	61°C 24 pb
5' -ATG GCG TCT TAC CAG AAC CGT -3'	<i>RAB18</i>	SENTIDO	60°C 21 pb
5' -CCA GAT CCG GAG CGG TGA AGC -3'	<i>RAB18</i>	ANTISENTIDO	60°C 21 pb
5' -AAG GCT TGT GAT ACG GAT ATG G -3'	<i>P5CS1</i>	SENTIDO	60°C 22 pb
5' -ATG GAC AAG AAG GGT TTC CA -3'	<i>P5CS1</i>	ANTISENTIDO	60°C 20 pb
5' -ACG CTG AGA CCC CGA TAA C -3'	<i>RD29A</i>	SENTIDO	59°C 19 pb
5' -CAA TCT CCG GTA CTC CTC CA -3'	<i>RD29A</i>	ANTISENTIDO	60°C 20 pb
5' -ACT GAT CCC ACG CAT AAA GG -3'	<i>RD29B</i>	SENTIDO	59°C 20 pb
5' -TCA TTC TAC CAA GAG ACT CAG CA -3'	<i>RD29B</i>	ANTISENTIDO	59°C 23 pb
5' -TGC CTT TAT CAG TTG ATC ACA AAC -3'	<i>HAB2</i>	SENTIDO	60°C 24 pb
5' -GCG CCT TAT TGC CAT TGT ATA AC -3'	<i>HAB2</i>	ANTISENTIDO	60°C 20 pb

#### 5.14. Análisis transcriptómico mediante micromatrices de oligonucleótidos.

La caracterización molecular del mutante *anac089-2* en respuesta a ABA durante el proceso germinativo, se realizó mediante análisis transcriptómico utilizando semillas del mutante *anac089-2* y del ecotipo Col-0. Las semillas de ambas líneas fueron estratificadas a 4°C en oscuridad durante 72 h y posteriormente tratadas con ABA 5 µM durante 3 horas, en presencia de luz y a una temperatura de 21°C. Para dicho experimento se realizaron 3 réplicas biológicas independientes, cada una de las cuales consistía de varias réplicas técnicas. A

continuación, se procedió a la extracción de RNA total (apartado 5.3.2) y su calidad se analizó empleando el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent *Technologies*, Palo Alto, CA).

#### 5.14.1. Síntesis de cRNA biotinilado.

La síntesis de cDNA se llevó a cabo a partir de 4 µg de RNA y tras una transcripción *in vitro*, paso en el que es biotinilado, se procedió a su posterior fragmentación mediante incubación a 94°C durante 35 minutos dando lugar a fragmentos de 35-200 pares de bases (Affymetrix, Santa Clara, Ca).

#### 5.14.2. Hibridación, lavado y escaneado.

La hibridación del microarray se realizó en la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Madrid. Se hibridaron 10 µg de cRNA fragmentado en la micromatriz del genoma completo de *Arabidopsis* ATH1 *Genome* array (Affymetrix, Santa Clara, CA) que contenía 22.500 juegos de sondas que representan 24.000 genes no redundantes del genoma de *A. thaliana*. Para llevar a cabo la hibridación, tinción y escaneado se realizaron los siguientes pasos:

1. Añadir cada muestra a la solución de hibridación, siendo la concentración final de cRNA 0.05 µg/ml.
  2. Hibridar durante 16 horas a 45°C.
  3. Lavar y teñir con estreptavidina-ficoeritrina en el equipo *Fluidics station 450* (Affymetrix).
  4. Escanear a una resolución de 2.5 µm en un escáner *GeneChip® Scanner 3000 7G System* (Affymetrix) y analizar los datos utilizando el *GeneChip Operating Software* (GCOS).
- **Solución de hibridación:** Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico 100 mM, Na<sup>+</sup> 1 M, EDTA 20 mM y Tween-20 0.01% (v/v).

#### 5.14.3. Análisis de datos.

Los datos se analizaron utilizando el paquete informático affyImaGUI R (Wettenhall et al., 2006). Para la corrección del fondo, transformación a log<sub>2</sub> y normalización por cuantiles se utilizó el algoritmo *Robust Multi-array Average* (RMA) (Irizarry et al., 2003). Para el análisis

de expresión diferencial se utilizó el test estadístico de Bayes para modelos lineales de datos de microarrays (Limma) (Smyth, 2004) incluido en el paquete affyImaGUI. El *p-value* fue corregido utilizando el método de Benjamini y Hochberg (*False Discovery Rate*) (Benjamini y Hochberg, 1995; Reiner et al., 2003).

Se consideró que un gen se expresaba diferencialmente cuando su *p-value* corregido (FDR) era menor de 0.05, y sólo fueron considerados para posteriores análisis aquellos genes cuyo log<sub>2</sub>ratio era  $\geq 1$  para genes inducidos y  $\leq -1$  para genes reprimidos (*anac089-2* versus Col-0).

El cluster jerárquico se calculó y diseñó usando la aplicación TIGR MeV (*Multiarray experiment viewer*, versión 4.4) (Saeed et al., 2003). Los CEL. files de los diferentes tratamientos hormonales se obtuvieron del proyecto *AtGenExpress* (<http://arabidopsis.org/portal/expression/microarray/ATGenExpress.jsp>) y todos los datos seleccionados fueron normalizados utilizando el software RMAExpress, que utiliza el algoritmo RMA.

La categorización funcional de los genes se realizó empleando la base de datos MIPS ([http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funecatDB/search\\_main\\_frame.html](http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funecatDB/search_main_frame.html)) y la aplicación BAR ([http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools\\_classification\\_superviewer.cgi](http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_classification_superviewer.cgi)).

## 6. CONDICIONES DE LA BÚSQUEDA DE MUTANTES *cra* (*coi1-16* *resistant* to *ABA*).

### 6.1. Mutagénesis de semillas con EMS.

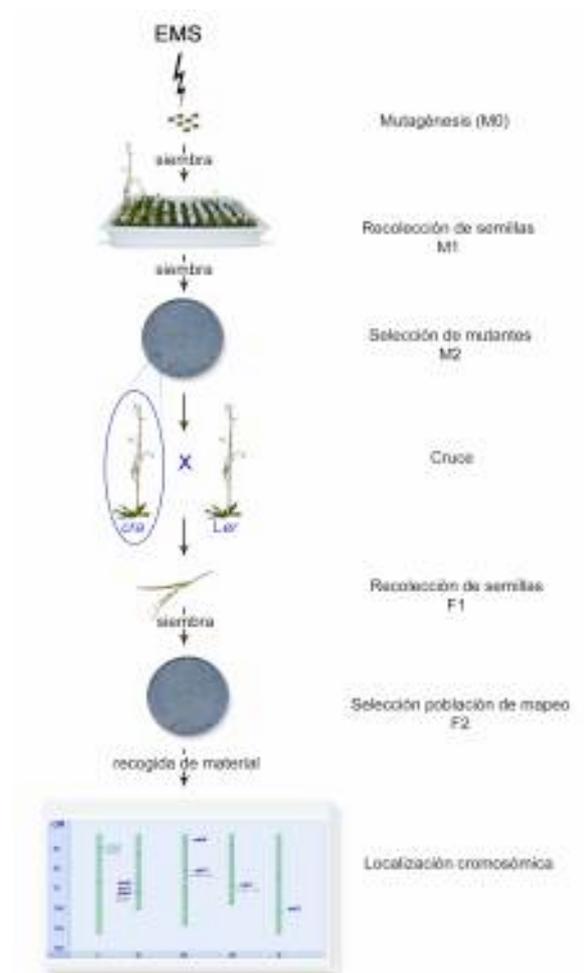
Aproximadamente 80.000 semillas de Arabidopsis fueron mutagenizadas con etil metano sulfonato (EMS, Sigma) siguiendo el siguiente protocolo:

1. Pesar 2.5 g de semillas secas de Arabidopsis (aproximadamente 80.000 semillas) y colocar en un matraz de vidrio estéril.
2. Añadir al matraz 40 ml de tampón fosfato 100 mM y dejar que las semillas se imbiban durante toda la noche a una temperatura de 4°C.
3. Descartar el tampón fosfato 100 mM sobrante.
4. Añadir 40 ml de tampón fosfato 100 mM fresco.
5. Añadir EMS, como agente mutagenizador, a una concentración final de 0.4%.
6. Incubar la mezcla durante 8 horas a temperatura ambiente.
7. Lavar las semillas 8-10 veces con 40 ml de agua.
8. Sembrar las semillas en tierra una vez completada la mutagénesis con EMS.

- **Tampón fosfato 100 mM:**  $K_2HPO_4$ . 1 M,  $KH_2PO_4$ . 1 M pH 7.5.

## 6.2. Selección de mutantes.

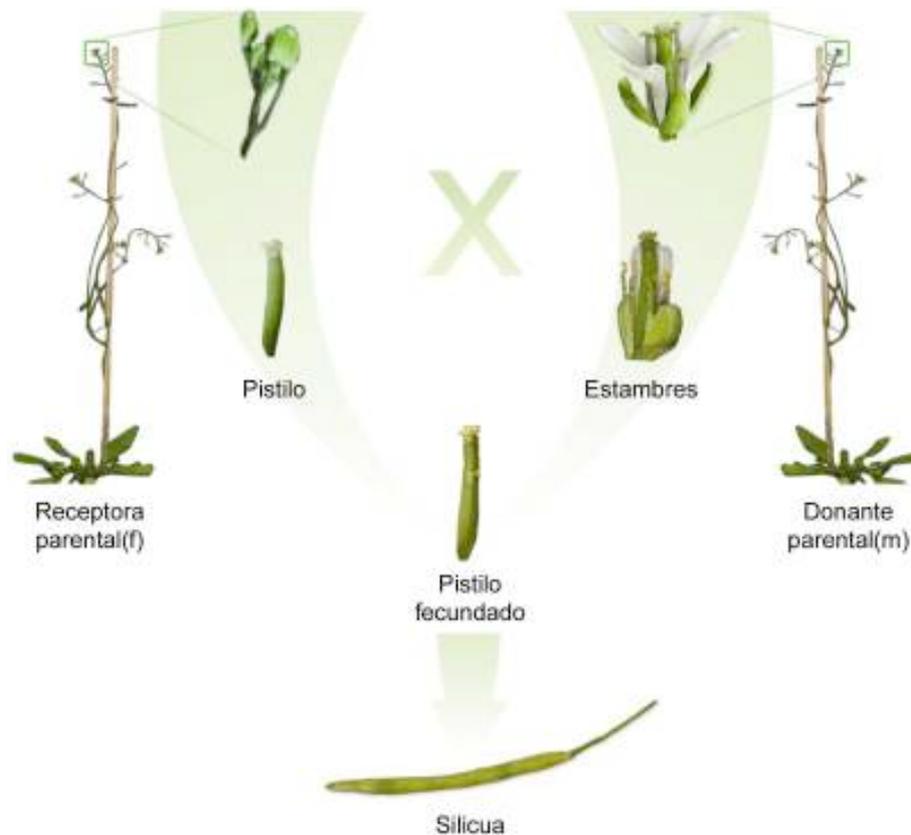
Las 80.000 semillas mutagenizadas (M0) fueron sembradas en tierra agrupadas en 17 familias M1 y se incubaron en un fitotrón hasta la producción de semillas en las condiciones ya descritas (apartado 2.2). Las semillas obtenidas en la generación M2 se recolectaron, se secaron a temperatura ambiente durante 3-5 días y fueron empleadas para la búsqueda de mutantes (Figura M.3). Después de esterilizar la superficie de las semillas y eliminar la dormición por estratificación (apartado 2.1), se sembraron en placas de MS suplementadas con ABA a una concentración  $0.5 \mu M$  (apartado 2.3). Estas placas se incubaron en cámaras de cultivo a una temperatura de 21-24°C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad y una humedad del 60%. A los 6 días se seleccionaron aquellas plántulas que fueron capaces de desarrollar cotiledones verdes y/o emergencia radicular.



**Figura M.3.** Resumen esquemático de la obtención de mutantes resistentes a ABA en Arabidopsis.

### 6.3. Cruzamiento de plantas.

Para la obtención de la población de mapeo se cruzaron dos estirpes de *Arabidopsis*, usando los mutantes *cra* (*coi1-16* *resistant to ABA*) como plantas receptoras (fondo genético Col-0) y empleando el otro ecotipo (*Ler*) como planta donadora de polen (Figura M.4).



**Figura M.4.** Pasos seguidos para la realización de los cruces con plantas de *Arabidopsis*.

Se eliminaron las flores maduras presuntamente autofecundadas del parental femenino (planta receptora), así como los capullos ya formados. Se eligieron los capullos cuyos pétalos no eran aún visibles, se extirparon los pétalos y sépalos y se emascularon los estambres inmaduros, de modo que quedó una flor cuya única estructura funcional era el pistilo. Para ello, se emplearon pinzas de microcirugía, previamente esterilizadas con etanol y secadas al aire para eliminar cualquier traza de polen, realizando todas las manipulaciones bajo una lupa. Por otro lado, se eligió una flor madura de la planta donadora de polen, con pétalos ya abiertos y estambres con polen bien visible en sus anteras. Presionando con las pinzas a la altura de los sépalos, se pusieron en contacto varias de las anteras con el pistilo de la planta receptora del

polen. El cruce se señaló adhiriendo junto al tallo una cinta adhesiva, en la que se indicó en primer lugar, el ecotipo de la planta receptora de polen y en segundo lugar, el ecotipo de la planta donadora de polen. Finalmente, se devolvió la planta a la cámara de cultivo y se mantuvo en ella hasta que maduró la silicua, momento en el cual se recogió en un tubo eppendorf de 1.5 ml debidamente etiquetado y al que se le aplicó un orificio en la parte superior para evitar la proliferación de hongos en el interior.

Este procedimiento se realizó también en los correspondientes tests de alelismo y complementación, así como para el cruzamiento de los mutantes *cra* con el ecotipo silvestre Col-0 con el objetivo de eliminar las posibles mutaciones adicionales provocadas por el EMS.

#### **6.4. Localización de la mutación.**

La localización de las mutaciones *cra* se llevó a cabo en el Servicio de Cartografía de Mutaciones de Arabidopsis (Departamento de Biología Aplicada, Universidad Miguel Hernández, Elche) empleando la técnica de paseo cromosómico. Para ello, se congeló individualmente en tubos eppendorf de 1.5 ml, aproximadamente 100 mg de material vegetal (hojas de la roseta basal y hojas caulinares) de 50 plantas de la población cartográfica F2, que manifestaban inequívocamente el fenotipo mutante. Se recogió también material vegetal (aproximadamente 100 mg) de la planta parental *cra* y de la otra planta parental *Ler* con los que se realizó el cruce (apartado 6.3) y de una planta de la generación F1, para comprobar que los parentales eran líneas puras y que el ejemplar F1 era heterocigoto.

El material vegetal se congeló en nitrógeno líquido y se envió al citado Servicio en nieve carbónica para la localización cromosómica de la mutación.

### **7. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE PLANTAS TRANSGÉNICAS.**

#### **7.1. Transformación de *A. thaliana* por *Agrobacterium tumefaciens*.**

*A. tumefaciens* es una bacteria gram negativa capaz de infectar plantas a través de heridas e inducir la formación de tumores en las plantas infectadas. La cepa empleada para la generación de plantas transgénicas fue la C58C1 (tabla M.2), que contiene el plásmido Ti desarmado pGV2260 (Deblaere et al., 1985). El mecanismo de infección implica la transferencia e integración de una región del plásmido Ti denominada T-DNA que contiene el fragmento de interés, en el genoma de la planta y para lo que se requieren los genes de virulencia (*VIR*) presentes en el plásmido pGV2260.

### 7.1.1. Construcciones para la transformación de plantas de *A. thaliana*.

Los genes empleados para la generación de plantas transgénicas fueron *HAB2* y la versión mutada *hab2*. Ambos fueron insertados en el vector plasmídico de entrada pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> y, empleando la tecnología *GATEWAY*, se llevó a cabo una reacción de recombinación con el vector binario de destino pMDC43, generando los plásmidos recombinantes pMDC43-HAB2 y pMDC43-hab2G245E (apartado 5.5.2). Todas las construcciones generadas fueron confirmadas por secuenciación, empleando oligonucleótidos específicos (tabla M.6). Posteriormente, se transformaron células competentes de *A. tumefaciens* con ambas construcciones (apartado 4.2.3), seleccionando los transformantes en placas con medio LB suplementado con Kan (50 µg/ml) y Rif (50 µg/ml). Finalmente, se llevó a cabo con ellos la transformación de plantas del ecotipo silvestre Col-0 de *A. thaliana*.

### 7.1.2. Infiltración de plantas de *A. thaliana* con *A. tumefaciens*.

La transformación de plantas del ecotipo silvestre Col-0 de *A. thaliana* por medio de *A. tumefaciens*, se realizó por el método de infiltración *in planta* (Clough y Bent, 1998). Este sistema no requiere regeneración de tejidos *in vitro*, lo que evita la variación somaclonal, y además, se reduce el tiempo requerido para la obtención de individuos transformados. Para llevar a cabo la transformación de plantas de Arabidopsis por infiltración, se siguieron las siguientes pautas:

1. Realizar un preinóculo de *A. tumefaciens* con el DNA transformante en un volumen final de 10 ml de LB, suplementado con Rif 50 µg/µl y con el antibiótico frente al que presente resistencia el DNA transformante (Kan) hasta alcanzar una concentración final de 50 µg/µl. Incubar durante toda la noche a 28°C en agitación (250 rpm).
2. Inocular con 5 ml del preinóculo, 500 ml de medio LB suplementado con Rif 50 µg/µl y con el antibiótico frente al que presente resistencia el DNA transformante (Kan) hasta una concentración final de 50 µg/µl. Incubar durante toda la noche a 28°C en agitación (250 rpm).
3. Centrifugar 10 minutos a 6.000 rpm y a una temperatura de 4°C.
4. Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 200 ml de solución de infiltración.
5. Introducir la planta por inmersión en el medio con *A. tumefaciens* transformado, evitando que la tierra entre en contacto con el medio.

6. Aplicar vacío durante 5 minutos y repetir el proceso.
  7. Secar las plantas con papel de filtro y cubrir con una bolsa durante 2 días en una cámara de cultivo.
  8. Retirar la bolsa a los dos días y mantener las plantas en las condiciones de crecimiento descritas en el apartado 2.2.
- **Solución de infiltración (200 ml):** medio MS, 5% sacarosa, 4.4  $\mu\text{l}$  BAP (500  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), 60  $\mu\text{l}$  Silwet L-77.

## 7.2. Selección de plantas transgénicas.

La selección de plantas transgénicas procedentes de semillas de las plantas infiltradas (T0), una vez recolectadas y secadas a temperatura ambiente, se realizó siguiendo las siguientes pautas:

1. Esterilizar la superficie de las semillas (apartado 2.1).
  2. Estratificar a 4°C durante 72 horas para eliminar la dormición.
  3. Sembrar en placas de MS-Phytigel suplementadas Hig hasta alcanzar una concentración final de 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .
  4. Incubar a 22°C en condiciones de día largo durante 10-12 días.
  5. Seleccionar las plantas que presenten desarrollo radicular y emergencia de cotiledones (generación T1).
- **Medio MS-Phytigel-Hig:** MS 4.915 g/l pH 5.7, sacarosa 1%, phytigel 0.3%, Hig 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

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

Las plántulas de la generación T1 se transfirieron a bandejas de alvéolos para su crecimiento en tierra, y se dejaron crecer hasta la producción de semillas. Las semillas T2 procedentes de las plantas T1 se sembraron en medio MS suplementado con Hig 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y se analizó la segregación de la resistencia a Hig de dichas semillas.

El análisis estadístico de dicha segregación se realizó calculando el valor  $\chi^2$  con la corrección de Yates mediante el siguiente cálculo:

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

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 (3.841). Si el valor obtenido corresponde a una probabilidad mayor de 0.05, la desviación obtenida no es significativa y los datos se ajustan aceptablemente a la hipótesis (Parker, 1989).

### 7.3. Ensayo histológico de la actividad $\beta$ -glucuronidasa.

En este ensayo histoquímico se analiza la actividad  $\beta$ -glucuronidasa de plantas transformadas con el gen reportador *GUS*, lo que nos ha permitido estudiar la expresión espacio-temporal del gen *ANAC089*. Para ello, se siguió una modificación del protocolo descrito por Jefferson et al. (1987):

1. Sumergir el material de estudio en la solución GUS.
  2. Someter las muestras a vacío durante 5 minutos.
  3. Incubar a 37°C en oscuridad durante 4-6 horas.
  4. Retirar la solución y añadir etanol al 70% para desteñir la muestra.
  5. Observar en lupa o microscopio y conservar las muestras a 4°C.
- **Solución GUS:** NaPO<sub>4</sub> 50 mM pH 7, ferricianida 0.5 mM, ferrocianida 0.5 mM, tritón X-100 0.1%, 1 mg/ml ácido 5-bromo-4-cloro-3-indol  $\beta$ -D-glucurónico (sustrato X-Gluc, Sigma).

## 8. TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA DE TEJIDO VEGETAL.

### 8.1. Transformación transitoria por bombardeo de partículas.

Con el objetivo de analizar la localización subcelular de la proteína HAB2, su versión mutada (hab2G245E) y de la proteína ANAC089 *in vivo*, se utilizó el vector pMCD43 y se realizaron las construcciones pMDC43:GFP-HAB2, pMDC43:GFP-hab2G245E y pMDC43:GFP-ANAC089. Todas las construcciones quiméricas fueron comprobadas por secuenciación.

Con estas construcciones se transformaron, de forma transitoria, células de epidermis de cebolla (*Allium cepa*) mediante la técnica de bombardeo de partículas de oro recubiertas con

el DNA de interés. La transformación transitoria se realizó siguiendo una modificación del protocolo de Klein et al. (1987), como se detalla en los subapartados siguientes.

### 8.1.1. Preparación de microproyectiles de DNA.

La preparación de los microproyectiles de DNA se realizó mediante el siguiente protocolo:

1. Mezclar 60 mg de partículas de oro (Bio-Rad) de 1 $\mu$ m, en un tubo de propileno de 2 ml, con 1 ml de etanol absoluto.
2. Agitar en vórtex a máxima velocidad durante 10 minutos.
3. Centrifugar durante 10 segundos a 14.000 rpm y descartar el sobrenadante.
4. Añadir 1 ml de glicerol estéril al 50% y agitar en vórtex a máxima velocidad durante 30 segundos.
5. Centrifugar durante 10 segundos a 14.000 rpm y descartar el sobrenadante.
6. Repetir el lavado con glicerol al 50% 2 veces.
7. Resuspender el precipitado en 1 ml de glicerol al 50% agitando en vórtex durante 1 minuto.
8. Almacenar la muestra a 4°C.

Para llevar a cabo la precipitación del DNA se procedió del siguiente modo:

1. Hacer alícuotas de 5  $\mu$ g de DNA en un volumen final de 10  $\mu$ l y añadir 100  $\mu$ l de agua Milli Q estéril.
2. Añadir a cada muestra los siguientes componentes agitando en vórtex continuamente:
  - 38  $\mu$ l de partículas de oro a una concentración de 60 mg/ml agitadas en vórtex durante 5 segundos.
  - 150  $\mu$ l de una mezcla de CaCl<sub>2</sub>/espermidina preparada previamente (125  $\mu$ l de CaCl<sub>2</sub> 2.5 M y 25  $\mu$ l de espermidina 0.1 M).
3. Mantener la agitación en vórtex durante 5 minutos.
4. Colocar verticalmente el tubo en hielo durante 15 minutos para que las partículas se depositen por sedimentación.
5. Descartar el sobrenadante y añadir 500  $\mu$ l de etanol absoluto.
6. Agitar en vórtex durante 20 segundos.
7. Repetir la sedimentación y el lavado con etanol dos veces más.

8. Añadir 500 µl de etanol absoluto y mantener las muestras en hielo.

### 8.1.2. Bombardeo de células de epidermis de cebolla.

Antes de realizar el bombardeo, se extrajeron las capas internas de la epidermis de cebolla y se colocaron en placas Petri de gelrite. Una vez que los microproyectiles de DNA estuvieron preparados, se procedió a bombardear las células de epidermis de cebolla de acuerdo con las siguientes pautas:

1. Encender la cámara de flujo laminar, la bomba de vacío y el flujo de helio (a una presión de 1.300 psi).
  2. Esterilizar las membranas portadoras (*Rupture Disk* Bio-Rad 1652329) y las rejillas de parada (*Stopping Screens* Bio-Rad 1652336) con etanol absoluto y secar a continuación sobre papel de filtro.
  3. Descartar el etanol de las partículas de oro con el DNA (apartado 8.1.1) y resuspender en 48 µl de etanol absoluto.
  4. Añadir 8 µl de la suspensión en el centro de cada membrana portadora y dejar que se sequen.
  5. Esterilizar los discos de ruptura de 1.100 psi (Bio-Rad) con etanol y secar a continuación sobre papel de filtro.
  6. Montar la membrana portadora, la rejilla de parada y el disco de ruptura en el aparato de biobalística (Bio-Rad PDS-1000/He), situando las partículas de cara a la rejilla de parada.
  7. Colocar las placas de gelrite con la epidermis de cebolla a la distancia deseada y cerrar la cámara.
  8. Accionar la bomba de vacío hasta 27 in. Hg (0.1 atm) y presionar el botón de disparo hasta romper la membrana. Parar inmediatamente el vacío.
  9. Incubar las placas a 22°C en oscuridad durante 72 horas antes de su observación en el microscopio confocal para permitir la expresión de la construcción.
  10. Observar en el microscopio confocal (Zeiss LSM510) empleando filtros Zeiss de 515-530 nm con una fuente de excitación láser de Argón de 488 nm.
- **Gelrite:** Sacarosa 2%, gelrite 2 g/l, MS 4.9 g/l, pH 5.8.

## 8.2. Transformación transitoria por agroinfiltración.

Para llevar a cabo el análisis de la localización subcelular de la proteína HAB2 y la proteína mutada hab2G245E *in vivo*, empleando plantas de *Nicotiana benthamiana*, se utilizaron las mismas construcciones empleadas para la transformación transitoria de células de epidermis de cebolla (pMDC43:GFP-HAB2 y pMDC43:GFP-hab2G245E) además del supresor p19 que evita el silenciamiento génico. Los pasos seguidos fueron los siguientes:

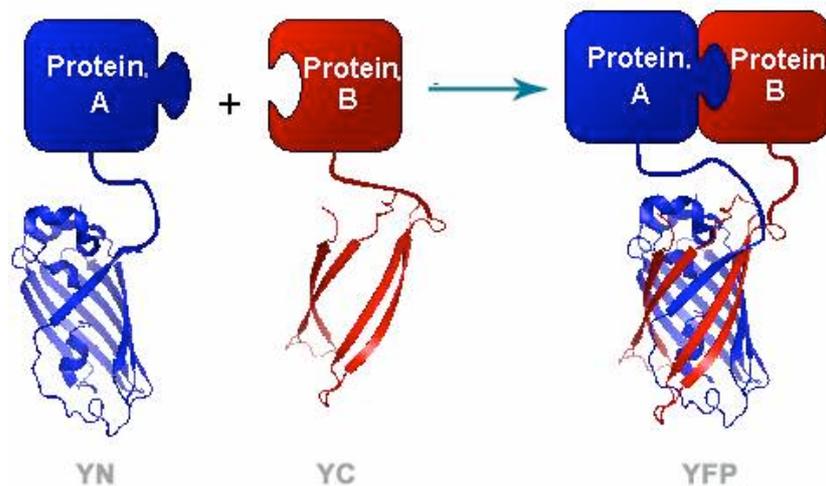
1. Realizar un preinóculo de *A. tumefaciens* con el DNA transformante en un volumen final de 3 ml de LB suplementado con Rif 50 µg/µl y con el antibiótico frente al que presente resistencia el DNA transformante (Kan) hasta alcanzar una concentración final de 50 µg/µl. Incubar durante toda la noche a 28°C en agitación (250 rpm).
2. Inocular con 1 ml del preinóculo, 10 ml de medio LB suplementado con Rif 50 µg/µl y Kan 50 µg/µl. Incubar durante toda la noche a 28°C en agitación (250 rpm).
3. Comprobar el estado de crecimiento del cultivo mediante espectrofotometría. Detener la incubación cuando la D.O a 600 nm sea igual a 0.5.
4. Centrifugar el inóculo durante 10 minutos a 7.000 rpm y descartar el sobrenadante.
5. Resuspender el precipitado en un volumen final de 10 ml de la solución de infiltración.
6. Incubar durante 3 horas en oscuridad y a temperatura ambiente.
7. Mezclar los 10 ml de cada construcción con los 10 ml de la solución de *A. tumefaciens* transformado con el supresor de silenciamiento p19.
8. Agroinfiltrar la mezcla con jeringuilla directamente en las hojas de *N. benthamiana*.
9. Mantener las plantas en cámaras de cultivo durante 72 horas para permitir la expresión de la construcción.
10. Observar en el microscopio confocal (Zeiss LSM510) empleando filtros Zeiss de 515-530 nm con una fuente de excitación láser de Argón de 488nm.

- **Solución de infiltración:** MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MES 10 mM pH 5.6, acetosiringona 200 µM.

## 8.3. Ensayos de Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC).

Esta técnica permite analizar la interacción *in vivo* entre dos proteínas basándose en la reconstrucción de la fluorescencia emitida por la proteína YFP (*Yellow Fluorescence Protein*) (Figura M.5). La proteína YFP se divide en dos fragmentos y se introduce el extremo amino en un plásmido pMDC43 modificado (pYFN43) y el extremo carboxilo en otro plásmido pMDC43 modificado (pYFC43). Cada una de las dos proteínas objeto del estudio, previamente

clonadas en el vector pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup>, se fusionan a cada uno de los fragmentos de la YFP a través de la reacción de recombinación por tecnología *GATEWAY* (apartado 5.5.2). Esta técnica, que también permite visualizar la localización subcelular de la interacción, se empleó para estudiar la interacción de las proteínas HAB2 y su versión mutada (hab2G245E) fusionadas al plásmido pYFC43, con las proteínas receptoras de ABA PYL3 (At1G73000), PYL7 (At4G01026), PYL8 (At5G53160) y PYL9 (At1G01360) fusionadas al plásmido pYFN43, usando plantas de *N. benthamiana*. Para ello, se llevó a cabo el protocolo seguido para realizar la técnica de transformación por agroinfiltración (apartado 8.2), si bien en esta ocasión, la mezcla que se agroinfiltró (pasos 6 y 7) estaba compuesta por los cultivos de *A. tumefaciens* transformados con las dos construcciones objeto del estudio y con el supresor p19.



**Figura M.5.** Modelo esquemático de la reconstrucción de la fluorescencia emitida por la proteína YFP, empleada para la realización del ensayo BiFC.

## 9. ENSAYOS DE TRANSACTIVACIÓN Y HOMODIMERIZACIÓN.

Estas técnicas se fundamentan en el análisis de doble híbrido en levadura, que se emplea para la detección de interacciones entre dos proteínas, basándose en que algunos factores transcripcionales constan de 2 dominios imprescindibles para que se produzca la transcripción del gen al que regulan. Este es el caso del factor transcripcional GAL4 de levadura, que consta de un extremo N-terminal que se une al DNA (*binding domain*, BD) y un extremo C-terminal (*activation domain*, AD) necesario para que se produzca la transcripción del gen reportador *LACZ* (Young, K, 1998). En levaduras, el gen *LACZ* codifica la enzima

$\beta$ -galactosidasa capaz de metabolizar la galactosa produciendo un metabolito de color azul. Para llevar a cabo el análisis de la interacción entre dos proteínas, se fusionó una de ellas al extremo BD presente en el plásmido pGBKT7 y la otra proteína objeto del estudio al extremo AD de la proteína  $\beta$ -galactosidasa presente en el plásmido pGADT7 (Figura M.1). Si ambas proteínas son capaces de interactuar, los dominios BD y AD del factor transcripcional GAL4 serán capaces de activar la transcripción del gen *LACZ*, de modo que finalmente la enzima  $\beta$ -galactosidasa metaboliza su sustrato dando lugar a un compuesto de coloración azul (Figura M.6).



**Figura M.6.** Modelo esquemático de la activación de la transcripción del gen *LACZ* de levadura tras la interacción de dos proteínas.

### 9.1. Transformación de levaduras.

Para llevar a cabo la doble transformación de la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* SFY526 se siguió el siguiente procedimiento:

1. Transferir una colonia independiente desde una placa de medio YPD a un tubo de 50 ml, al que previamente se ha añadido 10 ml de medio YPD líquido suplementado con 500  $\mu$ l de glucosa 40% filtrada. Incubar a 28°C en agitación (250 rpm) durante toda la noche.
2. Centrifugar 1ml del cultivo durante 5 segundos a máxima velocidad y resuspender el precipitado en 1 ml de acetato de litio 100 mM.
3. Incubar a 40°C durante 5 minutos.
4. Dividir el contenido en 2 tubos eppendorf de 1.5 ml.
5. Centrifugar 5 segundos a máxima velocidad y descartar el sobrenadante.
6. Añadir la siguiente mezcla:

240 µl PEG (50% w/v)  
36 µl AcLi 1M  
25 µl DNAss 2 mg/ml (desnaturalizar 10 segundos a 95°C)  
1 µg construcción 1 (pGADT7 o pGADT7:ANAC089)  
1 µg construcción 2 (pGBKT7:ANAC089)  
hasta 350 µl H<sub>2</sub>O estéril

7. Agitar en vórtex durante 1 minuto.
8. Incubar a 42°C durante 20 minutos.
9. Dejar en oscuridad a temperatura ambiente durante toda la noche.
10. Centrifugar 10 segundos a máxima velocidad y eliminar el sobrenadante.
11. Resuspender el precipitado en 200 µl de agua destilada estéril.
12. Sembrar en placas de medio DOB con doble auxotrofia (-leucina, -triptófano).
13. Incubar a 28°C durante 24-48 horas.

- **Medio YPD:** peptona (Difco) 20 g/l, extracto de levadura 10 g/l, agar industrial 18 g/l, glucosa 2%, pH 5.8.
- **Medio DOB:** DOB (MP *Biomedicals*) 27 g/l, agar industrial 18 g/l, mezcla de aminoácidos (-leucina, -triptófano) (MP *Biomedicals*) 0.64 g/l.

## 9.2. Ensayo β-GAL con malla.

Una vez realizada la doble transformación se llevó a cabo la transferencia de las colonias transformadas a una membrana de nylon y se procedió al ensayo β-GAL:

1. Añadir 6 µl de agua destilada estéril a 3 pocillos en una placa de microtítulo y resuspender 3 colonias independientes de la doble transformación.
2. Colocar una membrana de nylon estéril en una placa con medio DOB y doble auxotrofia (-leucina, -triptófano).
3. Transferir 2 µl de cada réplica a las placas con medio DOB y doble auxotrofia (-leucina, -triptófano).
4. Incubar las placas a 28°C durante 24-48 horas.

El análisis de la interacción de las proteínas se llevó a cabo mediante el ensayo β-GAL:

1. Disponer dos papeles de filtro estériles en una placa Petri y añadir 2 ml de la mezcla de revelado.
  2. Extraer la membrana de nylon de la placa con medio DOB y doble auxotrofia (-leucina, -triptófano) y congelar en nitrógeno líquido durante 10 segundos para fijar las colonias.
  3. Descongelar la membrana de nylon en un papel de filtro 20-60 segundos.
  4. Disponer la membrana de nylon en la placa Petri sobre los papeles de filtro.
  5. Incubar a 28°C y visualizar a intervalos de 30 minutos si se produce cambio en la coloración de las colonias.
- **Buffer Z:** Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 60 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 40 mM, KCl 10 mM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 mM.
  - **Mezcla de revelado:** 3 ml Buffer Z, 20 µl 2% β-Gal (Sigma), 8 µl β-mercaptoetanol.

### 9.3. Ensayo con 3-aminotriazol (3-AT).

Con el objetivo de eliminar la capacidad de activación basal del factor transcripcional ANAC089, el medio DOB con doble auxotrofia se suplementó con concentraciones crecientes de 3-aminotriazol (30 mM y 75 mM) (Sigma):

1. Llevar a cabo la doble transformación de levaduras (apartado 9.1).
2. Sembrar el producto de la doble transformación en medio DOB y doble auxotrofia (-leucina, -triptófano) suplementado con 3-AT.
3. Realizar el ensayo β-GAL con malla (apartado 9.2).

## 10. ANÁLISIS Y PRESENTACIÓN DE DATOS.

### 10.1. Fotografía. Autorradiografía.

Los geles de agarosa para la separación de DNA y RNA fueron visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta UVP BioDoc-It™ *Imaging System* y las imágenes se imprimieron en una impresora *Video Graphic Printer UP-895 MD* (Sony).

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

Las imágenes de las plántulas, silicuas, semillas y placas fueron tomadas en un escáner EPSON *Perfection 3590 Photo* y en una lupa LEICA MZ 16 FA acoplada a una cámara

fotográfica digital LEICA DFC 490. Tanto el escáner como la cámara estaban conectados a un ordenador Apple iMac G5.

## 10.2. Análisis informático.

El análisis de restricción de los clones aislados se realizó con la aplicación informática *DNA Strider*<sup>TM</sup> 1.1 (Ch. Marck y C.E.A.).

El diseño de oligonucleótidos para la amplificación de cDNA mediante PCR se llevó a cabo con el programa Oligo<sup>®</sup> 4.05, *Primer Analysis Software* (National Biosciences, Inc.) mientras que para Q RT-PCR los oligonucleótidos se diseñaron en el programa *Primer Express* 1.0 (*Applied Biosystems*). Para comprobar la eficacia de los oligonucleótidos, se realizaron PCRs virtuales mediante el programa *Amplify*.

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

El análisis informático de la información recibida del Departamento de Biología Aplicada de la Universidad Miguel Hernández se llevó a cabo con las aplicaciones *Map Viewer*, que permite el estudio de los BACs que contienen el gen mutado, y *Chromosome Map Tool*, que ofrece información sobre la ubicación cromosómica del gen mutado (<http://www.arabidopsis.org/>).

Las mediciones de longitud de raíz se llevaron a cabo empleando la aplicación informática *Image J*.

El árbol filogenético en el que se representaron las PP2Cs del grupo A de Arabidopsis y otras especies, se realizó con el programa informático MEGA4 (Tamura et al., 2007) y la base de datos Phytozome (<http://www.phytozome.com>).

## 10.3. Presentación de datos.

Para la realización de esta escritura se empleó el procesador de textos *Microsoft*<sup>®</sup> *Word* 6.0 (*Microsoft Corporation*). Las figuras e imágenes fueron realizadas y tratadas con el programa *Photoshop*<sup>®</sup> 6.0 (*Adobe Systems*).

Las gráficas se generaron con la aplicación *Microsoft Excel* y para la elaboración del apartado de bibliografía se usó el programa informático *End note X*.

#### **10.4. Pautas seguidas para la redacción de esta memoria.**

Todos aquellos artículos de los que se extrajo información, así como los autores de los mismos, aparecen recogidos en la sección de bibliografía, ordenando los autores de los trabajos por orden alfabético. En el caso de que varios trabajos revisados sean obra de un mismo autor, aquellos aparecen ordenados cronológicamente. En el texto aparece únicamente el nombre del primer autor de cada trabajo, mientras que en la bibliografía se incluyen todos los autores de cada publicación.

Los términos anglosajones que no tienen un equivalente español se citan en cursiva. Las unidades de medida se corresponden con las del Sistema Internacional. La formulación química y denominaciones de los compuestos se ajustan a lo establecido por la normativa de la IUPAC (*Internacional Union of Pure and Applied Chemistry*).

# Resultados

Resultados



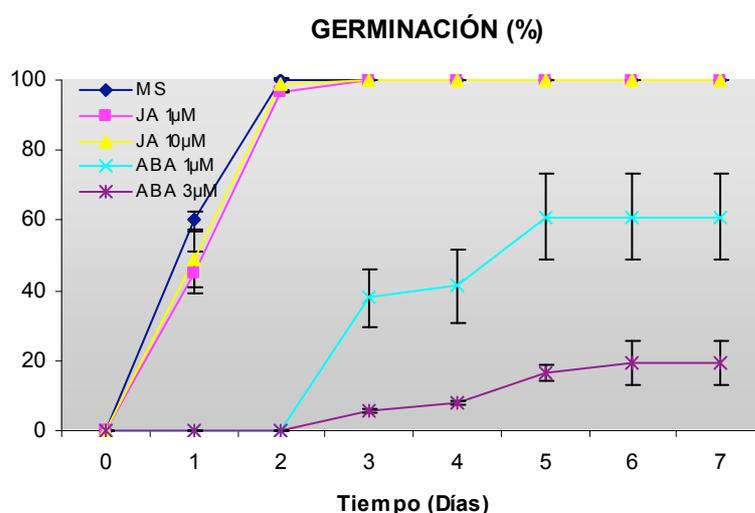


## CAPÍTULO I: BÚSQUEDA DE NUEVOS MUTANTES CON SENSIBILIDAD DISMINUIDA A ABA DURANTE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS EN *Arabidopsis thaliana*.

### 1. CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA A ÁCIDO ABSCÍSICO (ABA) Y JASMONATOS (JAs) DURANTE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS EN *Arabidopsis thaliana*.

#### 1.1. Efecto del ABA y del JA en la inhibición de la germinación.

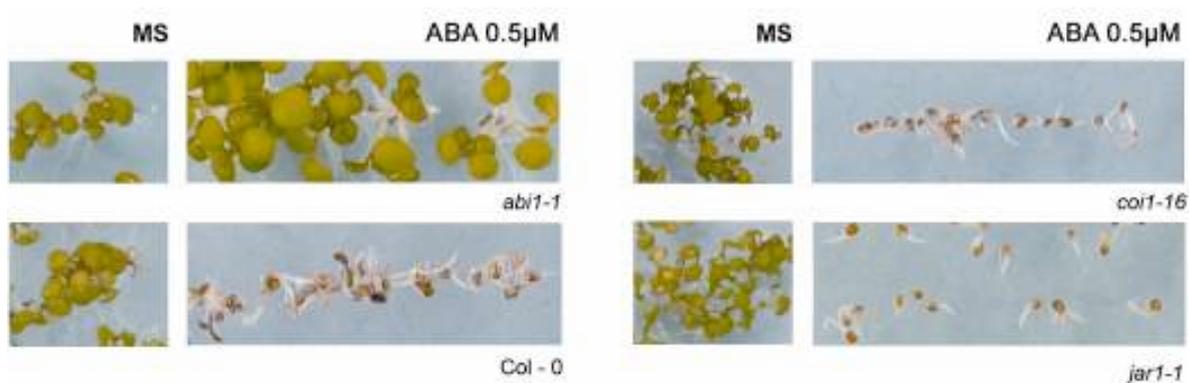
El ácido abscísico (ABA) y los jasmonatos (JAs) participan en la regulación de numerosos procesos del desarrollo, además de controlar un gran número de respuestas a estreses. Mientras que uno de los efectos mejor conocidos del ABA es la inhibición de la germinación, todavía no se conoce en profundidad el papel que juega el JA en su regulación. Para caracterizar cómo se produce el control de esta etapa del desarrollo por ambas hormonas, se sembraron semillas de *Arabidopsis thaliana*, tipo silvestre Col-0, en presencia de diferentes concentraciones de ABA (1  $\mu\text{M}$  y 3  $\mu\text{M}$ ) y JA (1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ ). En la gráfica R.1 se puede apreciar que la adición de bajas concentraciones de JA al medio MS no influyó sobre la germinación de las semillas, alcanzando valores del 100% tras dos días de tratamiento. Por su parte, en presencia de ABA 1  $\mu\text{M}$  y 3  $\mu\text{M}$  la germinación fue claramente inhibida, mostrando porcentajes del 60% y el 20%, respectivamente al final del periodo estudiado. Estos resultados muestran claramente la implicación del ABA en los procesos que dan lugar a la inhibición de la germinación y que el JA a bajas concentraciones o bien de forma independiente, no parece tener un papel esencial en este proceso.



**Figura R.1. Efecto del ABA y del JA sobre la germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana*.** Semillas de Col-0 sembradas en placas de MS suplementadas con diferentes concentraciones de ABA (1  $\mu\text{M}$  y 3  $\mu\text{M}$ ) y de JA (1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ ). El conteo de semillas germinadas se llevó a cabo hasta el séptimo día después de la siembra. La desviación estándar representa el promedio de tres experimentos independientes.

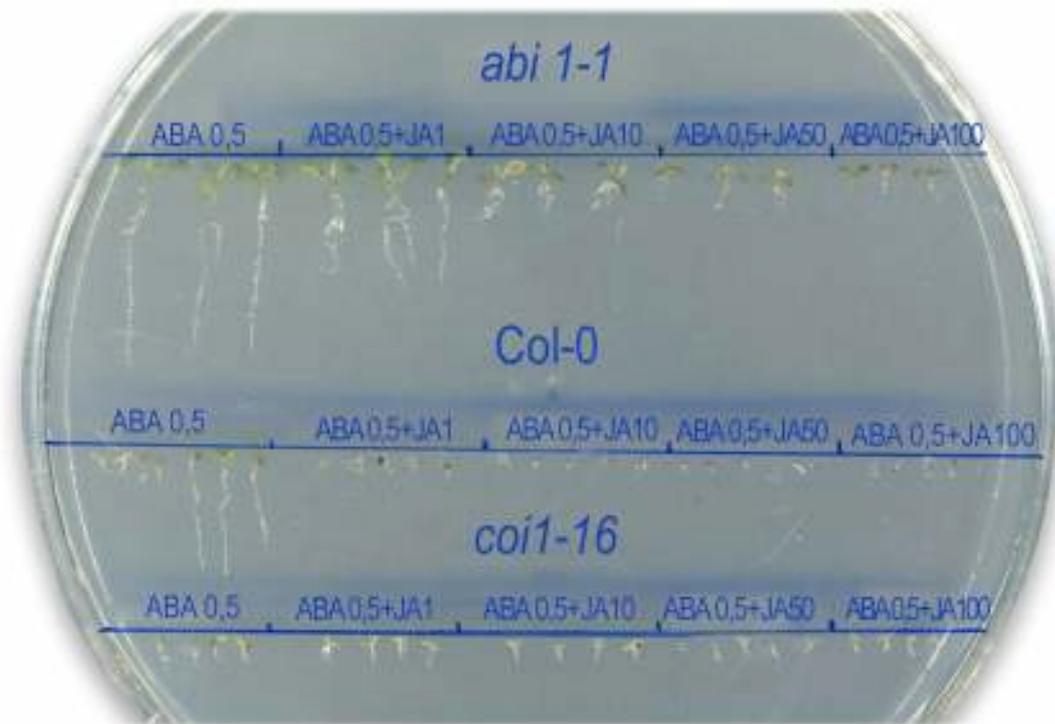
Sin embargo, las plantas requieren de la interacción de varias hormonas para que se produzca la regulación de la gran mayoría de procesos del desarrollo y de las respuestas a las condiciones del medio que las rodea. Así, se ha visto que el ABA y el JA presentan relaciones negativas y positivas durante la germinación de las semillas y los primeros estadios del desarrollo.

En trabajos anteriores (Staswick et al., 1992; Ellis y Turner, 2002) se había demostrado la hipersensibilidad a ABA durante la germinación que presentan los mutantes insensibles a JA, por lo que se procedió a realizar la caracterización de este fenotipo en mayor profundidad. Para ello, se procedió a sembrar semillas de los mutantes insensibles a JA *coil-16* y *jar1-1* (*methyl-jasmonate resistant 1-1*), en medio MS suplementado con bajas concentraciones de hormona (ABA 0.5  $\mu$ M). Como se puede apreciar en la figura R.2, en estas condiciones de crecimiento ambos mutantes presentaban una germinación muy retrasada en comparación con plántulas del tipo silvestre Col-0 y del mutante *abil-1* insensible a ABA, lo que sugiere la existencia de interacciones negativas entre el ABA y los JAs en esta etapa del desarrollo



**Figura R.2. Caracterización de la respuesta a ABA en la germinación de mutantes insensibles a JA.** Las imágenes corresponden a plántulas de 6 días del tipo silvestre Col-0 y de los mutantes *abil-1*, *coil-16* y *jar1-1* sembradas en medio MS y medio MS suplementado con ABA 0.5  $\mu$ M.

Para continuar analizando la naturaleza de tales interacciones en *A. thaliana*, se realizó un ensayo dosis-respuesta en el que se sembraron semillas del ecotipo silvestre Col-0 y de los mutantes *coil-16* (*coronatine insensitive 1-16*) y *abil-1* (*ABA insensitive 1-1*), insensibles a JA y ABA, respectivamente, en placas de MS suplementadas con ABA 0.5  $\mu$ M y diferentes concentraciones de JA (0  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M). En la figura R.3 se pueden observar los fenotipos mostrados por *abil-1*, Col-0 y *coil-16* en cada una de las concentraciones citadas.



**Figura R.3. Ensayo dosis-respuesta en la germinación de semillas en Arabidopsis.** Semillas de *abi-1*, Col-0 y *coi-16* sembradas en placas de MS+ABA 0.5  $\mu$ M y suplementadas con diferentes concentraciones de JA (0, 1, 10, 50 y 100  $\mu$ M). La imagen muestra plántulas de 9 días sometidas a los tratamientos indicados.

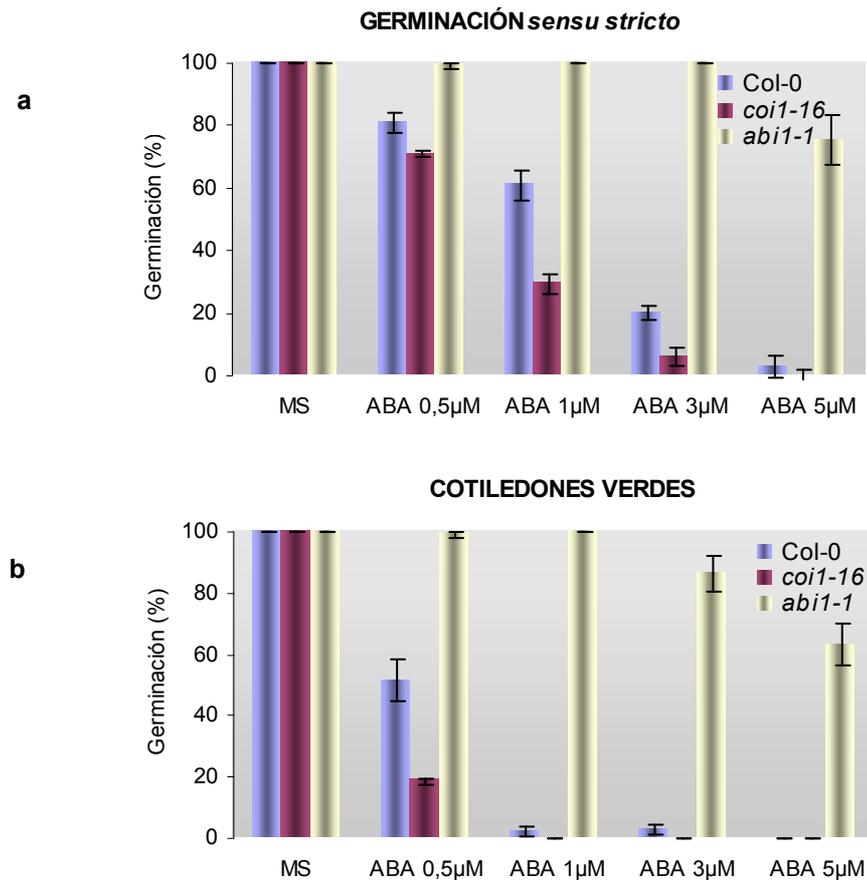
El mutante insensible a JA *coi-16* no lograba desarrollar cotiledones verdes ni elongación radicular en ninguna de las condiciones de germinación, debido a su hipersensibilidad a ABA. Por su parte, el mutante insensible a ABA *abi-1* germinaba con normalidad en presencia de esta hormona pero presentaba una fuerte inhibición de la elongación radicular tras la adición de JA, de modo que en concentraciones altas de JA (50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M) combinado con ABA 0.5  $\mu$ M, experimentaba un retraso en el desarrollo de las plántulas. Por último, en el tipo silvestre Col-0 se pudo observar un efecto sinérgico de ambas hormonas en la inhibición de la germinación y del desarrollo de cotiledones. A los 9 días las plántulas de Col-0 presentaban cotiledones verdes en presencia de ABA 0.5  $\mu$ M, pero a medida que se suplementó el medio con concentraciones crecientes de JA su número disminuía, de modo que en concentraciones superiores a JA 10  $\mu$ M no había ninguna plántula de Col-0 con cotiledones verdes, manifestando un claro retraso en el desarrollo.

Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de interacciones hormonales entre el ABA y el JA en la germinación de semillas y el desarrollo temprano.

## 2. AISLAMIENTO DE MUTANTES AFECTADOS EN LAS RESPUESTAS A ABA DURANTE LA GERMINACIÓN Y EL DESARROLLO TEMPRANO.

Con los datos obtenidos tras la caracterización de las respuestas a ABA y JA durante la germinación de semillas de *Arabidopsis* y basándonos en la relación negativa existente entre ambas hormonas en la regulación de esta etapa del desarrollo, observada en los mutantes *coil-16* y *jar1-1*, se desarrolló una estrategia de búsqueda de nuevos mutantes afectados en la respuesta a ABA durante la germinación y los primeros estadios del desarrollo. Esta estrategia consistía en la mutagénesis de un fondo genético hipersensible a la inhibición de la germinación mediada por esta hormona. De esta forma, se decidió que el fondo genético hipersensible a ABA más adecuado para la realización de este trabajo era el mutante insensible a JA *coil-16*, al presentar bajos índices de germinación, un desarrollo muy retrasado en presencia de ABA y resultados muy reproducibles. La elección de este alelo del mutante *coil* se debió a su capacidad de producir semillas cuando el desarrollo se completaba a una temperatura de 15°C, a diferencia de otros alelos del mismo mutante que son estériles a cualquier temperatura, impidiendo obtener un número de semillas suficiente para desarrollar el trabajo.

Del mismo modo, determinamos la concentración de ABA más adecuada para poder identificar el mayor número de mutantes con fenotipos de resistencia a la hormona durante la germinación. Como ya se ha comentado en la Introducción, la germinación *sensu stricto* comienza con la toma de agua por parte de la semilla y finaliza con la elongación del eje embrionario (Bewley, 1997), resultando la emergencia de la radícula el signo visible de este proceso, mientras que el desarrollo de cotiledones verdes permite distinguir el completo establecimiento de la plántula durante esta etapa del desarrollo. Para comprobar el efecto del ABA sobre ambos procesos, se llevó a cabo un ensayo de germinación en presencia de concentraciones crecientes de la hormona (0, 0.5, 1, 3 y 5  $\mu\text{M}$ ), empleando los dos criterios anteriormente citados para el recuento de semillas germinadas (Figura R.4).



**Figura R.4. Caracterización de la respuesta a ABA en la germinación de semillas.** Las gráficas representan diferencias **a)** en la germinación *sensu stricto* y **b)** en el desarrollo de raíz y de cotiledones verdes en presencia de distintas concentraciones de ABA (0, 0.5, 1, 3 y 5  $\mu\text{M}$ ) entre el tipo silvestre Col-0 y los mutantes *abi1-1* y *coi1-16*, siete días después de la siembra. La desviación estándar representa el promedio de tres experimentos independientes.

Como se puede observar en la figura R.4, se obtuvieron resultados consistentes aplicando uno u otro criterio para el recuento de semillas germinadas. Sin embargo, para detectar diferencias en la germinación *sensu stricto* entre los distintos fondos genéticos se requerían mayores concentraciones de ABA (1  $\mu\text{M}$ ), lo que únicamente permitiría identificar mutantes con fenotipos más fuertes de insensibilidad a ABA. Por otro lado, el análisis simultáneo de la emergencia radicular y del desarrollo de cotiledones verdes, permitía apreciar una clara gradación de los fenotipos de sensibilidad (Col-0), hipersensibilidad (*coi1-16*) e insensibilidad (*abi1-1*), principalmente en presencia de concentraciones bajas de la hormona (0.5  $\mu\text{M}$ ). Por esta razón, se decidió llevar a cabo la búsqueda de mutantes alterados en las respuestas a ABA durante la germinación y los primeros estadios del desarrollo en presencia de concentraciones de ABA 0.5  $\mu\text{M}$ , estableciendo como criterio conjunto de selección la emergencia radicular y el desarrollo de cotiledones verdes.

## 2.1. Mutagénesis de semillas *coi1-16*.

Para iniciar la búsqueda de mutantes, se procedió a realizar en primer lugar una mutagénesis de la población de semillas del mutante *coi1-16*. En este sentido, se pueden seguir varias aproximaciones, entre ellas, se puede seleccionar como agente mutagénico un agente físico como la luz ultravioleta (UV), que provoca la formación de dímeros entre pirimidinas adyacentes, o como las radiaciones ionizantes, que dan lugar a la formación de especies químicas como los radicales libres. También se pueden emplear agentes químicos, entre los que encontramos análogos de bases (2-aminopurina), agentes que reaccionan con el DNA (etil metano sulfonato) y agentes intercalantes (bromuro de etidio). Por otro lado, la mutagénesis por elementos transponibles, consiste en provocar la pérdida de función de un gen por la inserción de un elemento transponible (secuencias de inserción, transposones y algunos virus). Finalmente, la mutagénesis dirigida requiere el uso de la tecnología recombinante para generar mutaciones concretas en genes específicos.

De todas las aproximaciones anteriormente detalladas, se decidió utilizar el etil metano sulfonato (EMS), por permitir la obtención de una amplia colección de mutantes al azar (la mutagénesis dirigida requiere conocer el gen que queremos estudiar y los agentes físicos son más peligrosos y agresivos que el EMS, provocando un gran número de mutaciones letales). Los otros agentes químicos son poco útiles para la investigación básica, porque es muy costoso establecer las condiciones óptimas de mutagénesis. El EMS reacciona directamente con el DNA, provocando la introducción de un grupo metilo en la guanina, evitando de este modo que se aparee con la citosina, dando lugar a la transición GC→AT.

En este trabajo se mutagenizaron más de 80.000 semillas del mutante *coi1-16* y fueron agrupadas en 17 familias M1, tal y como se describe en el apartado 6.1 de Materiales y Técnicas.

## 2.2. Selección de mutantes *cra* (*coi1* *resistant* to *ABA*).

Utilizando el fondo genético mutante *coi1-16* y una vez analizado el efecto de distintas concentraciones de ABA sobre la germinación de semillas en el mutante *coi1-16* y en el tipo silvestre Col-0, se comprobó que empleando medio MS suplementado con ABA 0.5  $\mu$ M las semillas del ecotipo silvestre Col-0 eran capaces de germinar y en ocasiones desarrollar cotiledones verdes, mientras que las semillas del mutante *coi1-16* presentaban un desarrollo muy retrasado respecto a Col-0. En estas condiciones, se pudieron identificar mutantes con fenotipos intermedios, más débiles que *abil-1*, difícilmente detectables en otras búsquedas.

Aproximadamente 105.000 semillas M2 procedentes de 17 familias M1 mutagenizadas con EMS fueron empleadas para la búsqueda de mutantes resistentes a la inhibición de la germinación y el desarrollo temprano experimentada por *coil-16* en presencia de ABA 0.5  $\mu$ M (Materiales y Técnicas, apartado 6.2). En esta primera fase del *screening*, se encontraron 76 posibles mutantes con una sensibilidad reducida a ABA y se propuso el nombre de mutantes *cra* para identificarlos (*coil resistant to ABA*). Únicamente 4 de ellos no fueron viables en tierra. Las semillas M3 procedentes de cada uno de los 72 mutantes viables se sembraron en las mismas condiciones anteriormente citadas, confirmando que tenían una sensibilidad reducida a ABA durante la germinación y los primeros estadios del desarrollo.

En la figura R.5 se muestra una placa de medio MS suplementado con ABA 0.5  $\mu$ M en la que se sembraron aproximadamente 6.000 semillas correspondientes a una de las 17 familias testadas. En la misma figura, aparecen detalladas las imágenes de dos de los primeros mutantes *cra* seleccionados en la M2, en las que se puede apreciar como junto a los mutantes que presentan cotiledones verdes y raíces desarrolladas, aparecen otras plántulas de la misma familia, que si bien presentan germinación *sensu stricto* (emergencia radicular), no completan el desarrollo de raíces y de cotiledones verdes, siendo por tanto incapaces de establecerse como plántulas en esas condiciones.



**Figura R.5. *Screening* de semillas *coil-16* mutagenizadas con EMS.** Aproximadamente 6.000 semillas de cada una de las 17 familias M1 fueron sembradas en medio MS suplementado con ABA 0.5  $\mu$ M. En la figura se muestran en detalle dos de los posibles mutantes *cra* seleccionados en la generación M2.

### 2.3. Clasificación fenotípica de los mutantes *cra*.

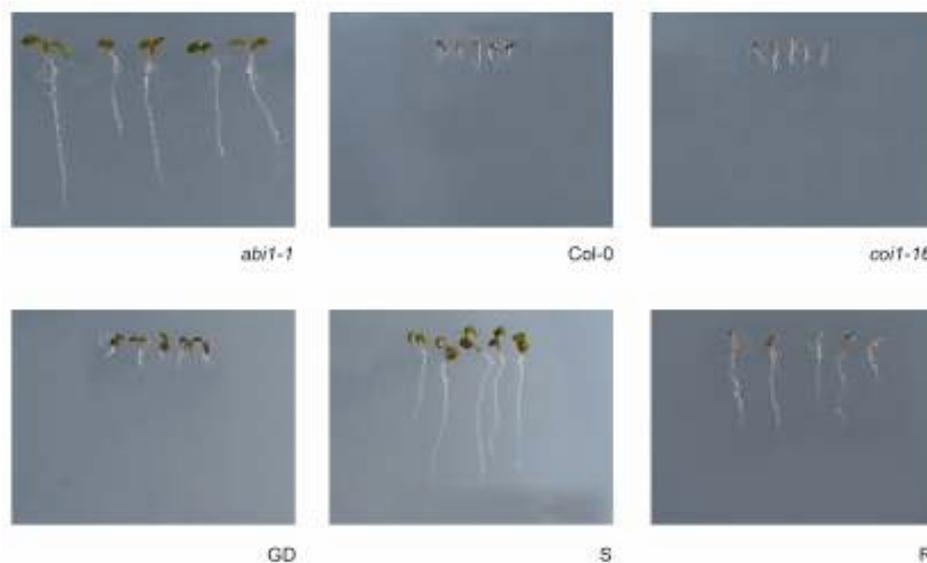
Los posibles mutantes seleccionados en la primera fase del *screening* presentaban distinto grado de resistencia a la inhibición de la germinación y de las primeras fases del desarrollo mediada por ABA, lo que permitió que pudieran ser clasificados en tres clases fenotípicas atendiendo a la emergencia radicular y al desarrollo de cotiledones:

a) Fenotipo “GD” (germinación y retraso en el desarrollo): los mutantes que mostraban este fenotipo presentaban cotiledones perfectamente desarrollados con elevados niveles de antocianinas, aunque no completaban el desarrollo de la radícula.

b) Fenotipo “S” (supresor): los mutantes incluidos en este grupo fenotípico presentaban raíz desarrollada y cotiledones verdes.

c) Fenotipo “R” (raíz): en este grupo fenotípico se incluyeron los mutantes que presentaban una clara emergencia radicular, pero que no mostraban desarrollo de cotiledones.

De los 72 posibles mutantes viables seleccionados en la primera fase de la búsqueda, 40 mostraban fenotipo “GD”, 15 fueron considerados fenotipo “S” y 11 manifestaban fenotipo “R”. En la figura R.6 se pueden observar las diferencias existentes entre las tres clases fenotípicas encontradas, incluyendo los controles *abi1-1*, Col-0 y *coi1-16*.



**Figura R.6. Clases fenotípicas de los mutantes *cra*.** Los posibles mutantes seleccionados en la generación M2 fueron clasificados en tres categorías fenotípicas: “GD” (germinación y retraso en el desarrollo), “S” (supresor) y “R” (raíz). También se incluyen imágenes de plántulas *abi1-1*, Col-0 y *coi1-16*. Las imágenes se tomaron 6 días después de que las semillas germinaran en medio MS suplementado con ABA 0.5  $\mu$ M.

Por otro lado, con el objetivo de identificar los mutantes insensibles a ABA (mutantes *abi*), los 72 posibles mutantes viables fueron sembrados en medio MS suplementado con ABA 3  $\mu$ M, ya que los mutantes capaces de germinar en estas condiciones se consideran mutantes insensibles a ABA (Brady et al., 2003). En este sentido, 7 de ellos (2 GD, 3 S y 2 R) germinaron y presentaban raíces y cotiledones perfectamente desarrollados, por lo que a la espera de ser cartografiados, fueron considerados mutantes *abi*. En la tabla R.1 aparecen detallados los resultados obtenidos en esta primera fase del *screening*, corroborando el nivel de exhaustividad llevado a cabo en la búsqueda.

**Tabla R.1. Mutantes seleccionados en el *screening*.** Los 72 posibles mutantes con una sensibilidad reducida a ABA durante la germinación, se agruparon en 3 clases fenotípicas distintas (GD, S y R). Siete de ellos fueron identificados como mutantes *abi*, por su insensibilidad a ABA 3  $\mu$ M.

Mutantes seleccionados	76	Viables en tierra	72
GD		40	
S		15	
R		10	
<i>abi</i>		7	

### 3. CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES MUTADOS.

De los 72 posibles mutantes aislados, se procedió a realizar la caracterización de los 7 que mostraban una mayor resistencia a la inhibición de la germinación mediada por ABA y que pertenecían a cada uno de los 3 grupos fenotípicos descritos en este *screening* (GD, S y R). A continuación, se detalla como se seleccionó la población de mapeo y se realizó la cartografía de los mutantes *cra1* (fenotipo R), *cra2-1*, *cra2-2*, *cra2-3* y *cra2-4* (fenotipos GD y S), *cra3* (fenotipo S) y *cra4* (fenotipo R), para posteriormente identificar los correspondientes genes mutados.

#### 3.1. Selección de la población de mapeo.

Con el fin de obtener la población de mapeo necesaria para afrontar la localización cromosómica de las mutaciones, se procedió a cruzar los siete mutantes seleccionados (fondo genético Col-0) con plantas de un ecotipo distinto (Landsberg *erecta*, *Ler*) (Materiales y Técnicas, apartado 6.3) y de este modo poder estudiar los polimorfismos existentes entre ambos ecotipos que permiten acotar la mutación. Las semillas de las silicuas obtenidas en el cruce se sembraron en medio MS y una vez germinadas, las plántulas se cultivaron en tierra constituyendo la generación F1. Una vez completado el desarrollo de estas plantas, se recogieron las semillas y se procedió a seleccionar la población de mapeo en la generación F2.

Con este objetivo, se sembraron semillas F2 de cada uno de los siete mutantes en medio MS suplementado con ABA 1  $\mu$ M. Las poblaciones F2 de los mutantes seleccionados

para el mapeo mostraban dos tipos de segregaciones diferentes. Por un lado, los mutantes *cra1* y *cra4* presentaban una segregación 1:3 (ABA sensibles:ABA resistentes), indicando que en ambos casos se trataba de una mutación simple dominante, mientras que en cinco mutantes restantes (*cra2-1*, *cra2-2*, *cra2-3*, *cra2-4* y *cra3*) la segregación observada era 3:1 (ABA sensibles:ABA resistentes), lo que indicaba que se trataba de mutaciones simples recesivas. Para afrontar la cartografía de los genes mutados, se seleccionaron aquellos individuos capaces de germinar en estas condiciones (homocigóticos para la mutación) o bien, en el caso de la mutaciones dominantes, se emplearon los individuos incapaces de germinar (homocigoto recesivo) tras su recuperación en placas de MS.

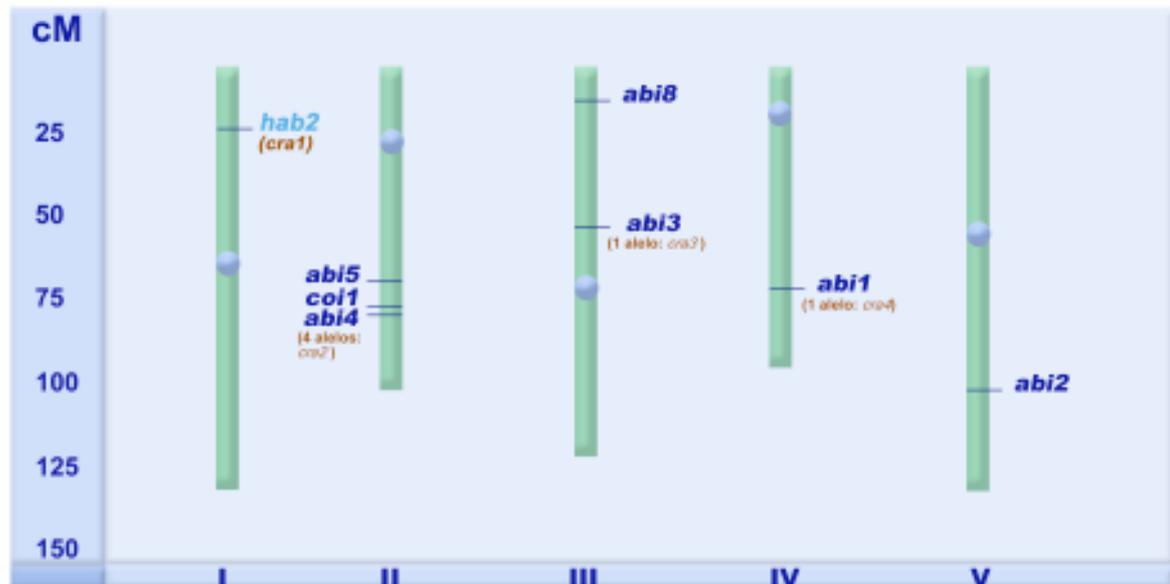
### 3.2. Cartografía de los genes mutados.

La cartografía de los genes mutados se llevó a cabo en el Servicio de Cartografía de mutaciones de Arabidopsis (Departamento de Biología Aplicada de la Universidad Miguel Hernández, Elche, Alicante) bajo la supervisión de los doctores M<sup>a</sup>. R. Ponce y J. L. Micol (Materiales y Técnicas, apartado 6.4). La técnica empleada para la localización de los genes mutados fue la del paseo cromosómico. En una primera fase, se extrae el DNA de los dos individuos parentales empleados en la realización del cruce para la obtención de la población F1 (en este caso *Ler* y el mutante *cra*) y del individuo de la generación F1 y se genotipan con respecto a 34 microsátélites polimórficos, con el fin de comprobar que los individuos parentales son líneas puras (homocigóticos) y que el individuo de la generación F1 es totalmente polimórfico (heterocigótico). Posteriormente, se genotipan 50 plantas de la generación F2, permitiendo delimitar una región de unos 50 cM (aproximadamente 5 Mb, correspondientes a unos 60 clones BAC) candidata a contener el gen de estudio.

En una segunda etapa, que requiere el análisis de aproximadamente 450 plantas de la generación F2, se suelen delimitar uno o dos clones BAC en los que se encontrará el gen mutado.

Utilizando esta aproximación, el gen mutado *CRA3* fue localizado en el brazo superior del cromosoma III, entre los marcadores cer 454777 (BAC K7M2) y cer 456068 (BAC MJL12). Por su parte, los genes mutados *CRA2-1*, *CRA2-2*, *CRA2-3* y *CRA2-4* se situaron en el cromosoma II, entre los marcadores nga1126 y AtBIO2. El gen mutado *CRA4* quedó acotado entre los marcadores cer452834 y cer453183 del cromosoma IV. Por último, la mutación *cra1* se localizó en el cromosoma I entre los marcadores JV18/19 y AthZFPG.

En la figura R.7 se muestran las localizaciones cromosómicas de las siete mutaciones, además de los mutantes *abi* ya conocidos y el mutante *coi1-16*.

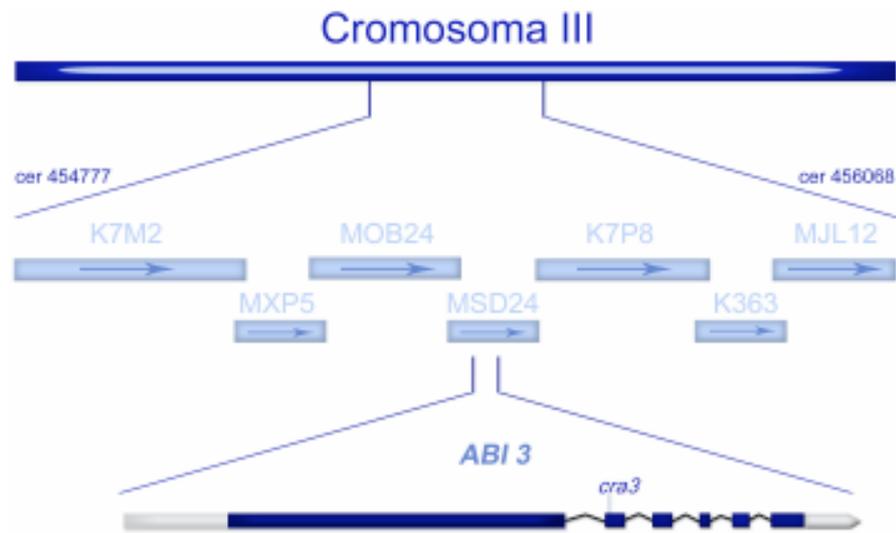


**Figura R.7. Identificación y localización de los siete mutantes *cra*** mediante el uso de marcadores moleculares (SSLPs y CAPS). También aparece representada la localización de *coi1-16* y de los mutantes *abi* descritos hasta el momento.

### 3.3. Identificación de los genes mutados.

#### 3.3.1. Mutante *cra3*.

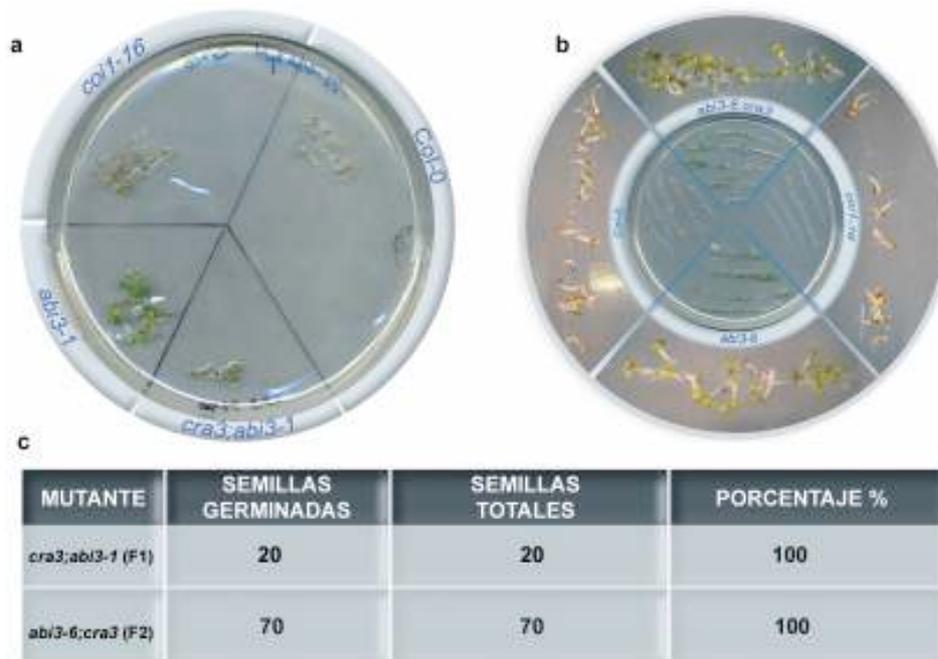
Entre los marcadores *cer 454777* y *cer 456068* del cromosoma III se localizaban los genes *CRA3* y *ABI3* (*ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3*) (Figura R.8), y puesto que los mutantes *cra3* y *abi3* presentaban fenotipos de insensibilidad a ABA semejantes durante la germinación y los primeros estadios del desarrollo, se propuso que *cra3* podía ser un nuevo alelo de *abi3*. Para confirmar esta hipótesis, se procedió a realizar los correspondientes test de alelismo y complementación entre el mutante *cra3* (fondo genético Col-0) y dos mutantes alélicos del gen *ABI3*, *abi3-1* (fondo genético Ler) y *abi3-6* (fondo genético Col-0). Con este fin, se llevaron a cabo sendos cruces entre los mutantes *cra3* (como planta receptora de polen) y *abi3-1* (como planta donadora de polen) y entre los mutantes *abi3-6* (como planta receptora de polen) y *cra3* (como planta donadora de polen), tal y como se detalla en el apartado 6.3 de Materiales y Técnicas.



**Figura R.8. Localización cromosómica del mutante *cra3*.** Detalle del cromosoma III donde está localizada la mutación *cra3*. En la figura aparece representado esquemáticamente el gen *ABI3* y la posición de la mutación *cra3* dentro del gen.

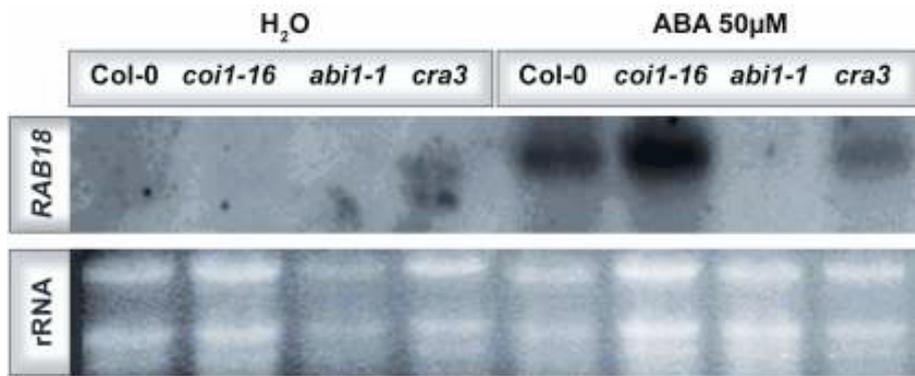
Las semillas de las silicuas obtenidas de ambos cruces se sembraron en medio MS suplementado con ABA 3  $\mu$ M. Como se puede apreciar en la figura R.9, la totalidad de las semillas de la generación F1 del cruce *cra3;abi3-1* y de la generación F2 del cruce *abi3-6;cra3* fueron capaces de germinar y desarrollarse en estas condiciones. Puesto que las mutaciones *abi3-1*, *abi3-6* y *cra3* son recesivas, el resultado obtenido indicaba que *CRA3* es un alelo del gen *ABI3* (de no ser alelos, las semillas obtenidas de sendos cruces no podrían desarrollarse en presencia de ABA y mostrarían fenotipos similares al tipo silvestre Col-0).

Una vez identificado el gen afectado por la mutación *cra3*, se procedió a la localización de la mutación en la secuencia nucleotídica del gen. Con este objetivo, se llevó a cabo la secuenciación mediante PCR del gen *ABI3* en el mutante *cra3*, diseñando para ello oligonucleótidos específicos del gen *ABI3* (Materiales y Técnicas, Tabla M.6). El análisis de las secuencias obtenidas por PCR reveló que los fragmentos amplificados tenían una homología del 100% con *ABI3* (At3g24650), permitiendo la identificación de una única mutación en el nucleótido 2.427 consistente en un cambio G→A, dando lugar a un codón de paro (TGA) prematuro en esa posición, lo que de nuevo confirma que *cra3* afecta al gen *ABI3*, el cual codifica un factor transcripcional (FT) de la familia B3.



**Figura R.9. Test de alelismo y complementación.** Ensayo de complementación entre los mutantes *cra3* y *abi3-1* (a) y entre los mutantes *abi3-6* y *cra3* (b). Las imágenes corresponden a plántulas en presencia de ABA 3  $\mu$ M de la generación F1 y F2, respectivamente, tomadas 10 días después de la estratificación. c) Tabla en la que aparecen recogidos los porcentajes de germinación correspondientes a este ensayo.

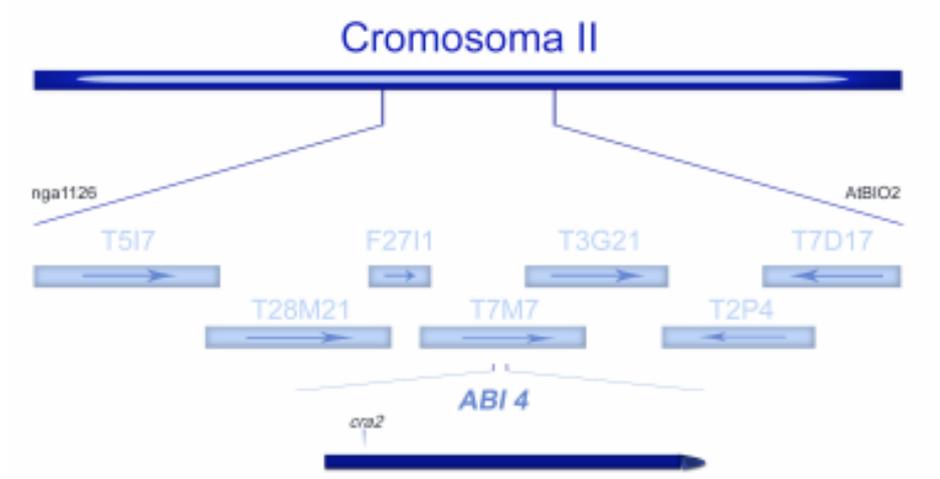
En un análisis molecular del mutante *cra3*, se comprobó si la expresión génica estaba afectada en el mutante, analizando los niveles de transcritos correspondientes a genes marcadores de las respuestas a ABA tras la aplicación exógena de esta hormona. Para ello, se extrajo RNA de plántulas de 12 días tratadas con ABA 50  $\mu$ M y con H<sub>2</sub>O durante 3 horas y se analizaron los niveles de transcritos mediante la técnica de Northern Blot. El RNA fue hibridado con la sonda del gen marcador de respuesta a ABA, *RAB18* (*Responsive to ABA 18*). *RAB18* es un gen fuertemente inducido por ABA, cuya expresión está drásticamente inhibida en los mutantes *abi1-1* y *abi2-1* (Lang y Palva, 1992; Leung et al., 1997). Como se puede apreciar en la figura R.10, en presencia de H<sub>2</sub>O no había acumulación de transcritos del gen *RAB18*, ni en los controles ni en el mutante *cra3*. Sin embargo, la adición de ABA provocó un claro incremento en los niveles de transcritos del gen *RAB18* en el tipo silvestre Col-0 y en el mutante *coi1-16* (hipersensible a ABA), mientras que en el mutante *abi1-1* eran prácticamente indetectables y en el mutante *cra3* la acumulación de transcritos era significativamente menor que en los controles Col-0 y *coi1-16*. Estos resultados indicaban que *cra3* es un mutante insensible a ABA, en el que también se ve afectada la expresión de genes regulados por esta hormona.



**Figura R.10. Análisis molecular en el mutante *cra3*.** Análisis por Northern Blot de los RNAs aislados de plántulas de 12 días de Col-0, *coi1-16*, *abi1-1* y *cra3* tratadas durante 3 horas con H<sub>2</sub>O y ABA 50 μM. Se cargaron 10 μg de RNA por carril y se hibridaron con la sonda del gen *RAB18*. Panel inferior: gel teñido con bromuro de etidio mostrando los rRNAs, utilizados como control de carga.

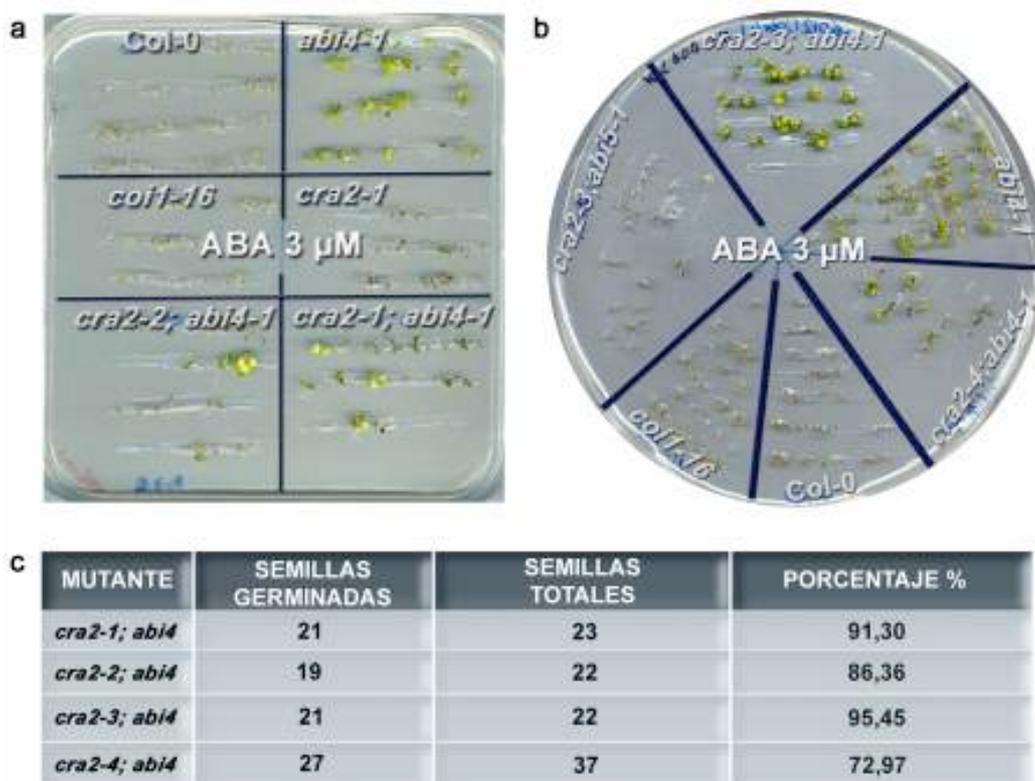
### 3.3.2. Mutante *cra2*.

En la zona del cromosoma II en la que quedaron acotadas las mutaciones *cra2* (marcadores nga1126 y AtBIO2) también se localiza el gen *ABI4* (*ABSCISIC ACID INSENSITIVE 4*), un TF de la familia AP2/EREBP, necesario para que se produzca la respuesta a ABA (Figura R.11), por lo que de nuevo se decidió llevar a cabo los test de alelismo y complementación entre los cuatro mutantes y el mutante *abi4-1*. Las semillas de la generación F1 obtenidas de los cruces correspondientes se sembraron en medio MS suplementado con ABA 3 μM, dando lugar a plántulas que mostraban cotiledones verdes y un completo desarrollo de la radícula (Figura R.12), lo que indicaba que las cuatro mutaciones eran alélicas del gen *ABI4*.



**Figura R.11. Localización cromosómica del mutante *cra2*.** Detalle del cromosoma II donde está localizada la mutación *cra2*. En la figura aparece representado esquemáticamente el gen *ABI4* y la posición de la mutación *cra2* dentro del gen.

Para la localización de la mutación dentro de la secuencia del gen, se procedió a secuenciar *ABI4* en los cuatro mutantes, empleando para ello oligonucleótidos específicos del gen *ABI4*. El análisis de las secuencias obtenidas por PCR reveló que los fragmentos amplificados tenían una homología del 100% con *ABI4* (At2g40220), permitiendo la identificación de una única mutación en los cuatro mutantes en el nucleótido 188 consistente en un cambio G→A, dando lugar a un codón de paro (TAG) prematuro en esa posición, lo que indicaba que todos ellos eran un mismo alelo del mutante *abi4*.

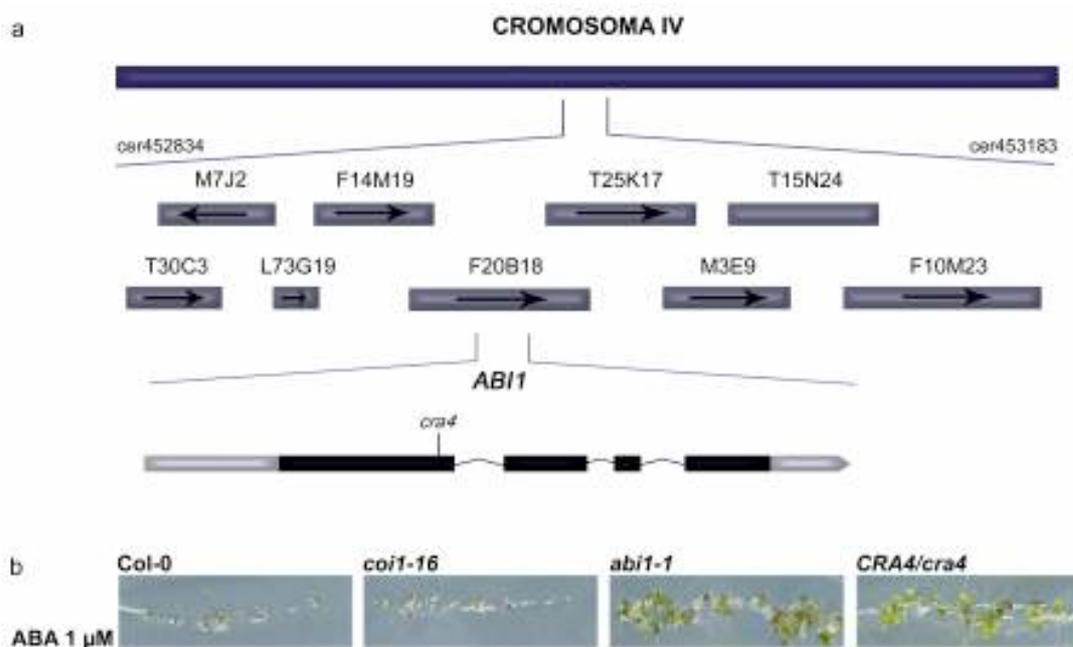


**Figura R.12. Test de alélismo y complementación.** a y b) Ensayo de complementación entre los cuatro mutantes *cra2* y *abi4-1*. Imágenes correspondientes a la generación F1 en presencia de ABA 3  $\mu$ M, tomadas 10 días después de la estratificación. c) Tabla en la que aparecen recogidos los porcentajes de germinación correspondientes a este ensayo.

### 3.3.3. Mutante *cra4*.

El mapeo de baja resolución del mutante *cra4* indicaba que la mutación se encontraba entre los marcadores cer452834 y cer453183 del cromosoma IV (Figura R.13a). En esta zona también se localiza el gen *ABI1* (*ABSCISIC ACID INSENSITIVE 1*), que codifica una proteína-fosfatasa de tipo 2C implicada en las respuestas a ABA, por lo que se procedió a comprobar si

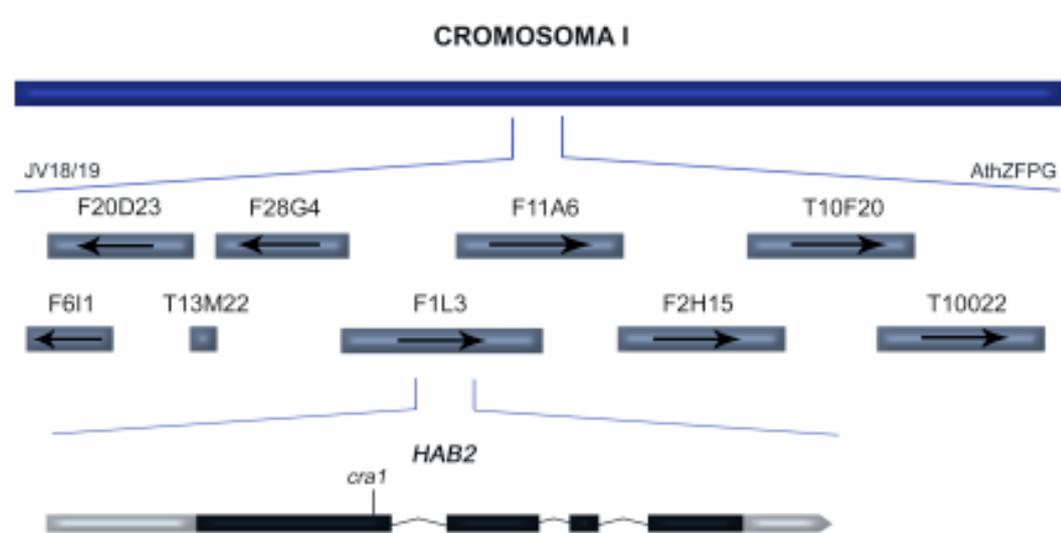
la mutación *cra4* afectaba a este gen. Tal y como se apunta en el apartado 3.3.1 de la Introducción, el único mutante dominante en el gen *ABI1* descrito que muestra un fenotipo de insensibilidad a ABA es *abi1-1* (Koornneef et al., 1984). En este sentido, se comprobó que la mutación *cra4* en heterocigosis generaba insensibilidad a la hormona, mediante un cruce entre plantas *cra4* y plantas de ecotipo silvestre Col-0. Cuando la silicua obtenida de este cruce se sembró en medio MS suplementado con ABA 1  $\mu$ M, se observó que el 100% de las semillas eran capaces de germinar y completar el desarrollo en estas condiciones, mostrando un fenotipo de insensibilidad a ABA semejante al mutante *abi1-1*, resultado que confirmaba el carácter dominante de la mutación *cra4* (Figura R.13b). La mutación *abi1-1* provoca un cambio de G por A en el nucleótido 539 dando lugar a una sustitución del aminoácido glicina (G) por aspártico (D) en la posición 180 del dominio catalítico de la proteína. Para corroborar si la mutación *cra4* provocaba el mismo efecto, se llevó a cabo la secuenciación del gen *ABI1* (At4g26080) en el mutante *cra4* revelando un cambio de G por A en el nucleótido 539, lo que genera en la proteína el cambio de G→D mencionado. Todos estos resultados indicaban que el mutante *cra4* era *abi1-1*.



**Figura R.13. Localización cromosómica del mutante *cra4*.** a) Detalle del cromosoma IV donde está localizada la mutación *cra4*. b) Ensayo de dominancia: la generación F1 del cruce entre el mutante *cra4* y Col-0 se sembró en medio MS suplementado con ABA 1  $\mu$ M. La imagen se tomó 7 días después de la siembra.

### 3.3.4. Mutante *cra1*.

El mapeo de baja resolución realizado con 50 individuos de la generación F2 obtenida del cruce entre el mutante *cra1* y el tipo silvestre *Ler*, situó la mutación en el brazo superior del cromosoma I. Entre los marcadores JV18/19 y AthZFPG (Figura R.14) también se localiza el gen *HAB2* (*HOMOLOGY TO ABI1/2*) (At1g17550), que codifica una PP2C presumiblemente implicada en las respuestas reguladas por ABA.



**Figura R.14. Localización cromosómica del mutante *cra1*.** Detalle del cromosoma I donde está localizada la mutación *cra1*. En la figura aparece representado esquemáticamente el gen *HAB2* y la posición de la mutación *cra1* dentro del gen.

*HAB2* presenta una elevada homología con otras tres PP2Cs, *HAB1*, *ABI1* y *ABI2*. Se conoce que en estas tres PP2Cs la existencia de sustituciones equivalentes de G por un aminoácido con pH ácido (aspartato, D) en sitios análogos de la proteína, genera fenotipos dominantes de insensibilidad a ABA. En *HAB2* ese cambio se produciría en el aminoácido 245 del dominio catalítico de la proteína. La secuenciación de *HAB2* en el mutante *cra1* reveló un cambio de G por A en el nucleótido 734, provocando la transición del triplete GGA a GAA, lo que da lugar al cambio esperado de glicina (G) por ácido glutámico (E) en la posición 245 del dominio catalítico en la proteína mutada.

Estos resultados demuestran la naturaleza dominante de la mutación *hab2* y que el mutante *cra1* está afectado en el gen *HAB2*.

#### 4. CARACTERIZACIÓN DE HAB2, UNA PROTEÍN-FOSFATASA DE TIPO 2C (PP2C) IMPLICADA EN LA REGULACIÓN DE LAS RESPUESTAS A ABA.

Una vez identificados los genes afectados por las mutaciones, se inició el estudio del mutante *cral/hab2* en mayor profundidad, por ser el único de los 7 mutantes aislados y clonados en este *screening* que no había sido caracterizado con anterioridad. Con el objetivo de eliminar posibles mutaciones adicionales que se hubieran producido en el tratamiento con EMS durante la mutagénesis de las semillas, el mutante fue retrocruzado con plantas del tipo silvestre Col-0, seleccionando posteriormente la mutación en medio suplementado con ABA 1  $\mu$ M y comprobando la existencia de la mutación mediante secuenciación nucleotídica. Por otro lado, con el propósito de estudiar una posible interacción entre las rutas de señalización del ABA y de los JAs, se seleccionó tanto la mutación simple *hab2* como la doble mutación *hab2;coi1-16*. Por ello, los ensayos fenotípicos y moleculares que se detallan a continuación están realizados simultáneamente con ambos mutantes.

##### 4.1. Caracterización de la proteína codificada: estudio comparativo y dominios funcionales.

El gen *HAB2* codifica una proteína de 511 aminoácidos, con un peso molecular de 56.06 kDa y un punto isoeléctrico de 4.48.

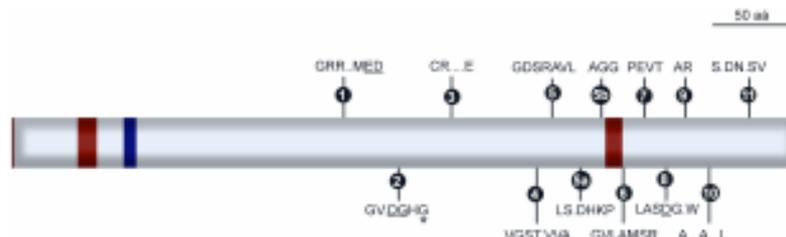
El análisis de la secuencia aminoacídica en la base de datos PlantsP (<http://plantsp.genomics.purdue.edu/html>) reveló los dominios funcionales de la proteína. En el extremo N-terminal, que presenta una longitud mayor que en otras PP2Cs, se observa una posible región transmembrana y un posible dominio de unión a DNA. En el extremo C-terminal se localiza otra posible región transmembrana y el dominio catalítico, necesario para su actividad fosfatasa, con los 11 subdominios altamente conservados característicos de las PP2Cs (Figura R.15a). El subdominio 2 es el sitio activo de las PP2Cs y en él se encuentran los dos residuos de glicina (G) específicos G239 y G245 flanqueando el sitio activo DGH242-244. La secuencia de HAB2 presenta, como en otras PP2Cs, todos los residuos posiblemente implicados en la coordinación del fosfato y los iones metálicos necesarios para su actividad (Das et al., 1996), que aparecen subrayados en la figura R.15a.

HAB2 presenta una gran homología con 8 PP2Cs pertenecientes al grupo A, dentro de las 76 proteínas de este tipo descritas en Arabidopsis. El estudio comparativo de la secuencia aminoacídica de HAB2 con las PP2Cs del grupo A restantes reveló la existencia de una elevada similitud (Figura R.15b). Entre ellas, las que mayor homología tienen con HAB2 son HAB1 (80%), ABI2 (73%) y ABI1 (68%), de modo que sustituciones del aminoácido glicina

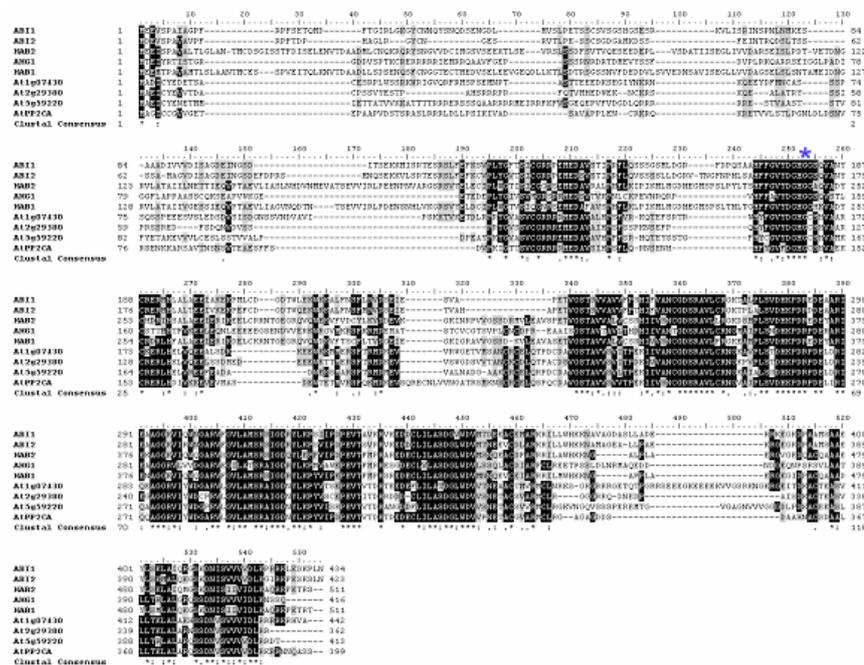
por ácido aspártico en posiciones equivalentes del subdominio 2 dentro del dominio catalítico generan una disminución de la actividad fosfatasa.

Por su parte, la mutación *hab2* provoca a un cambio de glicina (G) por ácido glutámico (E) en el aminoácido 245, afectando al subdominio 2 dentro del dominio catalítico de la proteína y consecuentemente a su actividad fosfatasa (Figura R.15a).

a



b



**Figura R.15. Estudio de la proteína HAB2.** a) Representación esquemática de la proteína con los 11 subdominios típicos de las PP2Cs dentro del dominio catalítico en el extremo C-terminal. En color rojo se indican las 2 posibles regiones transmembrana y en azul un posible dominio de unión a DNA. b) Alineamiento de las 9 PP2Cs del grupo A. En ambas imágenes el residuo de G sustituido por E en la proteína mutada aparece indicado con un asterisco.

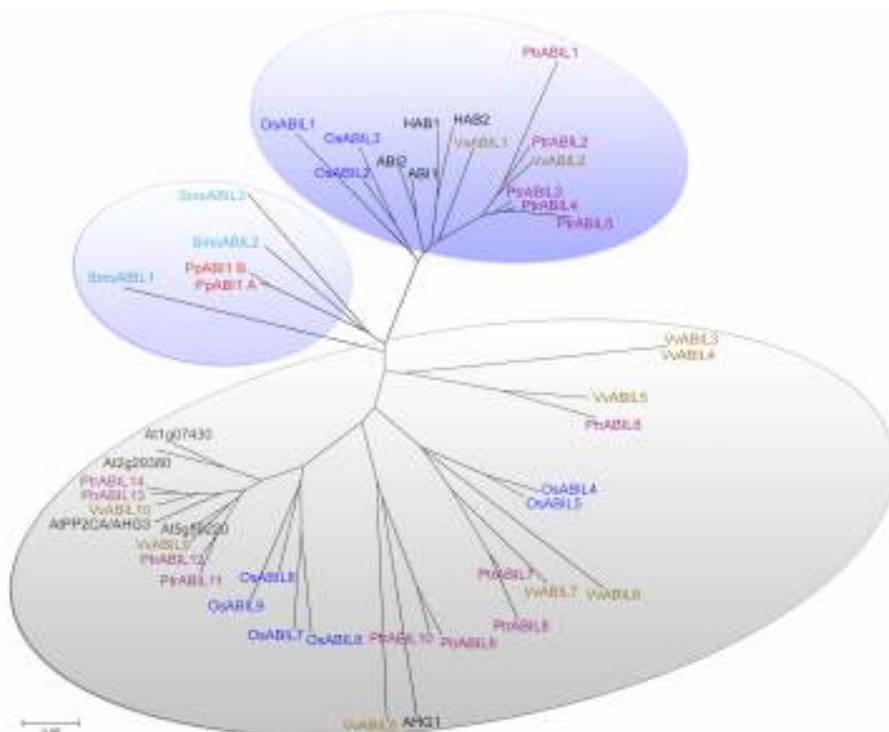
#### 4.2. Evolución filogenética de la familia de proteínas PP2C del grupo A.

Con el objetivo de analizar el grado de conservación de las PP2Cs en el reino vegetal y obtener pruebas de la historia evolutiva de la señalización del ABA, se hizo un estudio comparativo entre las 9 PP2Cs del grupo A de *Arabidopsis* y sus ortólogas en 5 especies de plantas (*Physcomitrella patens*, musgo; *Selaginella moellendorffii*, helecho; *Populus trichocarpa*, chopo; *Vitis vinifera*, vid; y *Oryza sativa*, arroz). Estudios semejantes hechos con anterioridad con otras PP2Cs revelan un alto grado de conservación en estas proteínas dentro

del reino vegetal. Así, ABI1 (Komatsu et al., 2009) presenta la misma función entre especies tan distantes como *A. thaliana* y *P. patens*, lo que sugiere que la ruta de señalización del ABA mediada por PP2Cs está evolutivamente conservada entre angiospermas y briófitos.

El árbol filogenético realizado a partir de este estudio comparativo revela eventos de duplicación génica que preceden la especiación de dicotiledóneas, monocotiledóneas y musgos o helechos, conduciendo a la formación de tres clados diferentes. Como se puede observar en la figura R.16, existen ortólogos de las PP2Cs en todos los genomas analizados correspondientes a las especies empleadas en la realización de este estudio y que se engloban en los tres grupos establecidos. En uno de los clados únicamente se encuentran representadas secuencias de las plantas inferiores *P. patens* y *S. moellendorffii* sugiriendo que este linaje de plantas contiene proteínas con dominio PP2C con función especializada, lo que indica que podrían ser el ancestro común de toda ellas. En los otros dos clados se encuentran representadas las PP2Cs de Arabidopsis y de las plantas superiores. En la tabla A.I del apartado Apéndices se detallan los números de acceso de los genes incluidos en este estudio.

Todo ello muestra que la regulación de la ruta de señalización del ABA por las PP2Cs del grupo A no es específica de Arabidopsis, sino que parece estar altamente conservada a lo largo de la evolución en plantas, desde la conquista del medio terrestre.



**Figura R.16. Árbol filogenético de la familia de proteínas PP2C pertenecientes al grupo A.** El estudio filogenético se llevó a cabo empleando la base de datos [www.phytozome.net](http://www.phytozome.net) con las secuencias aminoacídicas de *A. thaliana* (At, negro), *P. patens* (Pp, rojo), *S. moellendorffii* (Smo, azul claro), *P. trichocarpa* (Ptr, rosa), *V. vinifera* (Vv, marrón) y *O. sativa* (Os, azul oscuro). Los diferentes clados aparecen resaltados en distintos colores. La longitud de las ramas es proporcional a la distancia evolutiva.

### 4.3. Caracterización fenotípica del mutante *hab2*.

En este apartado se hace un estudio exhaustivo del efecto que provoca la mutación *hab2* en semillas y plantas de *Arabidopsis*, analizando el desarrollo embrionario en los mutantes, las respuestas del mutante simple *hab2* y del doble mutante *hab2;coi1-16* en presencia de distintas concentraciones de ABA, dormición, almacenamiento seco así como frente a diferentes estreses abióticos y bióticos.

#### 4.3.1. Análisis fenotípico de la formación de semillas en el doble mutante *hab2;coi1-16*.

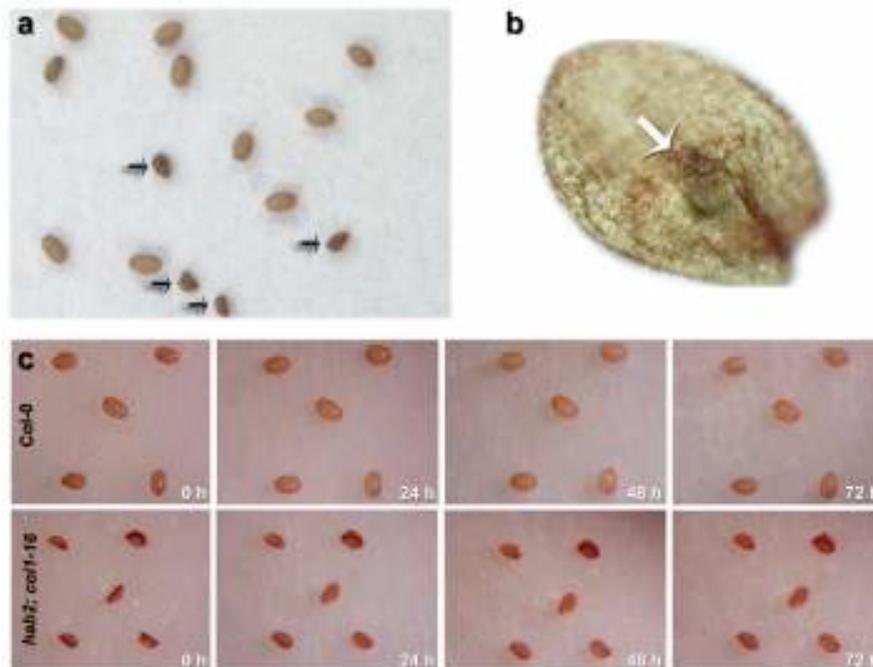
En una primera aproximación, se analizó la formación de las semillas en el interior de las silicuas inmaduras del doble mutante *hab2;coi1-16* (Figura R.17), distinguiéndose dos tipos diferentes de semillas. Por un lado, semillas verdes que eran capaces de completar el desarrollo y superar la fase de desecación transformándose en semillas marrones y por otro, semillas de color pálido que tras la fase de desecación mostraban una morfología aberrante. El porcentaje de semillas que presentaban alteraciones en su desarrollo era del 40%, lo que no se ajustaba a las segregaciones propias de mutaciones dominantes o recesivas.



**Figura R.17. Detalle de la formación de la semilla en silicuas en desarrollo en el tipo silvestre y en el doble mutante *hab2;coi1-16*.** Este último mostraba semillas de color pálido con claros defectos morfológicos.

Una vez alcanzada la fase de desecación, se podían distinguir semillas viables, fenotípicamente semejantes a las del tipo silvestre, y semillas pequeñas de aspecto arrugado (*shrunk*) incapaces de germinar (Figura R.18a), en cuyo interior se podían apreciar estructuras semejantes a un pequeño embrión (Figura R.18b). Para comprobar si presentaban una imbibición retrasada en comparación con las semillas del ecotipo silvestre Col-0, semillas procedentes del doble mutante y de Col-0 fueron mantenidas en imbibición durante 72 horas, a

una temperatura de 22°C bajo condiciones de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad). Como se puede observar en la figura R.18c, las semillas del doble mutante presentaban una imbibición retrasada en comparación con el tipo silvestre, de modo que tras 72 horas, mientras que en las semillas de tipo silvestre comenzaba a producirse la emergencia radicular, las dobles mutantes seguían manteniendo el aspecto arrugado a pesar de la imbibición y no se observaba emergencia de la radícula. Todo ello ponía de manifiesto que el doble mutante *hab2;coil-16* generaba además de semillas viables, semillas que no eran capaces de germinar.



**Figura R.18. Estudio fenotípico de las semillas del doble mutante *hab2;coil-16*.** a) En la imagen se muestran los dos tipos de semillas generadas por el doble mutante (las semillas aberrantes se señalan con una flecha). b) Detalle de una semilla aberrante imbibida del doble mutante. La flecha señala el embrión alojado en el interior de la semilla. c) Diferencias tras la imbibición de 0 a 72 horas entre semillas Col-0 y semillas aberrantes de *hab2;coil-16*.

Con el objetivo de examinar la capacidad germinativa de los embriones procedentes de las semillas del doble mutante, se llevó a cabo un análisis de viabilidad empleando sales de tetrazolium. Estas sales actúan como aceptores de electrones y en las células vivas son reducidas por enzimas deshidrogenasas hasta formazán (un compuesto de color rojizo) a partir de los electrones procedentes de las cadenas respiratorias. Para ello, se extrajeron embriones procedentes de semillas imbibidas durante 48 horas del tipo silvestre, de los mutantes simples *hab2* y *coil-16* y del doble mutante *hab2;coil-16*. Como se puede observar en la figura R.19, tanto los embriones del ecotipo silvestre como los embriones de los mutantes simples mostraban una tinción completa, lo que ponía de manifiesto que las cadenas respiratorias estaban activas y que los embriones eran viables. Sin embargo, los embriones procedentes de

las semillas del doble mutante que no eran capaces de germinar (*hab2;coi1-16 shrunken*) no mostraron tinción con las sales de tetrazolium. Este resultado indicaba que las cadenas respiratorias estaban inactivas y que tales embriones no eran viables tras la desecación durante la etapa de maduración de la semilla.



**Figura R.19. Análisis de la viabilidad de los embriones de *hab2;coi1-16*.** Para analizar la viabilidad de los embriones procedentes de semillas secas de los distintos fondos genéticos y del doble mutante, se extrajeron los embriones procedentes de semillas imbibidas y se sumergieron en una solución de sales de tetrazolium durante 8 horas.

La morfología de los embriones en desarrollo del ecotipo silvestre Col-0 y de las estructuras embrionarias observadas en las semillas inviables del doble mutante *hab2;coi1-16* se estudió llevando a cabo la escisión de embriones procedentes de semillas de Col-0 (Figura R.20) y de semillas inviables del doble mutante (Figura R.21), rehidratadas en agua durante 72 horas, sumergiéndolas en una solución de cloralhidrato y analizándolas mediante microscopía diferencial de contraste de interferencia (D.I.C.). El 91% de los embriones extraídos procedentes de semillas inviables del doble mutante *hab2;coi1-16* presentaban morfología globular (91 de 100 embriones totales), mientras que los embriones restantes mostraban morfologías irregulares (Figura R.21). Esta observación indicaba que se iniciaba la formación del embrión dentro de la semilla, pero que probablemente se detenía en algún momento durante el desarrollo de la misma.

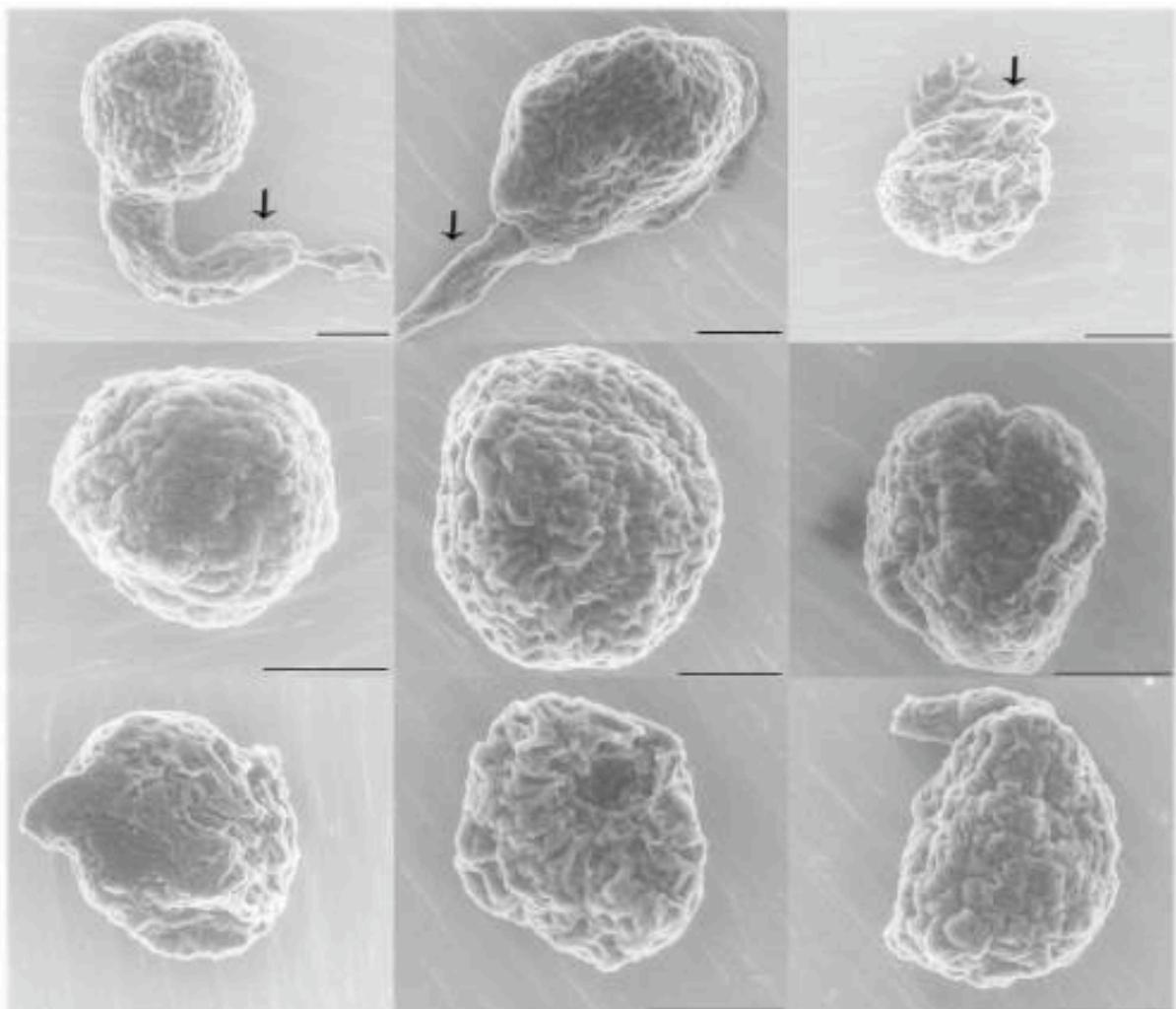


**Figura R.20. Caracterización del desarrollo embrionario en el tipo silvestre Col-0 mediante microscopía diferencial de contraste de interferencia (D.I.C).** Imágenes de la embriogénesis de semillas en desarrollo del ecotipo silvestre Col-0, obtenidas mediante D.I.C. Estadios a) globular; b) transición; c) corazón; d) torpedo; e) maduración.



**Figura R.21. Microscopía diferencial de contraste de interferencia (D.I.C).** Embriones extraídos de semillas inviables del doble mutante *hab2;coi1-16* fueron sumergidos en una solución de cloralhidrato y se analizaron mediante D.I.C. La mayoría de los embriones mostraban morfología esférica y un pequeño porcentaje presentaban una estructura irregular.

Para estudiar más detalladamente la estructura y morfología de los embriones mutantes, se tomaron imágenes en el microscopio electrónico de barrido (S.E.M.) (Figura R.22). Esta técnica, en la que la luz se sustituye por un haz de electrones y las lentes por electroimanes, permite la obtención de imágenes en tres dimensiones de gran resolución. Las imágenes obtenidas revelaron la existencia de embriones de forma esférica, que aparentemente detenían su embriogénesis en la fase globular. Sin embargo, tales embriones presentaban un mayor número de células que los embriones de tipo silvestre en esta misma etapa del desarrollo (Figura R.20a). Por otro lado, mientras que el suspensor de embriones de tipo silvestre cuenta con una sola capa de 6-9 células (Figura R.20a y b), los embriones inviables *hab2;coi1-16* presentaban una estructura semejante al suspensor, si bien estaba formado por un elevado número de células dispuestas en varias capas.

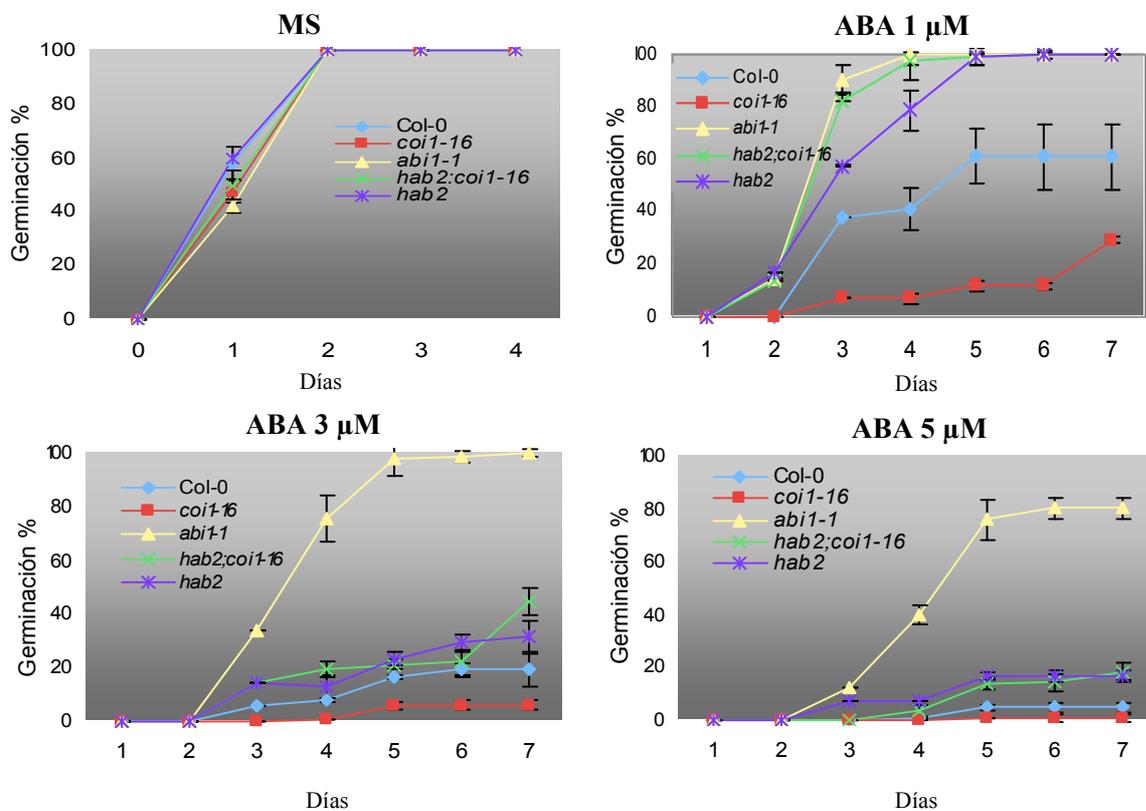


**Figura R.22. Microscopía electrónica de barrido (S.E.M.).** Los embriones inviables del doble mutante *hab2;coi1-16* mostraban un desarrollo aberrante, con un elevado número de células tanto en el embrión verdadero como en el teórico suspensor (indicado con una flecha). Las barras representan una longitud de 0.5 mm.

### 4.3.2. Respuesta del mutante *hab2* a ABA durante la germinación de semillas.

Uno de los fenotipos más importantes provocados por las mutaciones dominantes *abi1-1* y *abi2-1* es la reducida sensibilidad a ABA mostrada por sus semillas durante la germinación, incluso a altas concentraciones (ABA 3  $\mu$ M) (Koornneef et al., 1984).

Para analizar el efecto de la mutación *hab2* en las respuestas a ABA durante esta etapa del desarrollo, se decidió estudiar la germinación de semillas previamente estratificadas del mutante simple *hab2* y del doble mutante *hab2;coi1-16* en medio MS suplementado con diferentes concentraciones de la hormona. En el recuento de semillas germinadas se empleó como único criterio la presencia de emergencia radicular (Figura R.23).



**Figura R.23. Ensayo de germinación en presencia de ABA.** En la imagen se muestran diferencias en los porcentajes de germinación mostradas por semillas estratificadas durante 48 horas de Col-0, *coi1-16*, *abi1-1*, *hab2;coi1-16* y *hab2*, en presencia de distintas concentraciones de ABA (0  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M y 5  $\mu$ M).

El mutante *coi1-16* presentaba una germinación muy inhibida en presencia de ABA 1  $\mu$ M, siendo incapaz de germinar en presencia de concentraciones superiores (ABA 3  $\mu$ M y 5  $\mu$ M). El mutante insensible a ABA, *abi1-1*, únicamente experimentó una ligera reducción en los porcentajes de germinación en presencia de ABA 5  $\mu$ M. Por su parte, el mutante simple *hab2* mostró una germinación plena cuando el medio se suplementaba con ABA 1  $\mu$ M, si bien, experimentaba una reducción en los niveles de germinación en presencia

de altas concentraciones de la hormona (ABA 3  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$ ). El doble mutante *hab2;coi1-16* alcanzó porcentajes de germinación ligeramente superiores al mutante simple (ABA 1  $\mu\text{M}$ ), poniendo de manifiesto la capacidad de la mutación *hab2* para suprimir la hipersensibilidad a ABA durante la germinación de semillas ocasionada por la mutación *coi1-16*.

#### 4.3.3. Estudio de la dormición y del efecto del almacenamiento en seco (*after-ripening*) de las semillas.

El ABA endógeno es una de las principales señales implicadas en el establecimiento y mantenimiento de la dormición de semillas (Wang et al., 1995). En este sentido, mutantes insensibles a la hormona, como *abil-1*, presentan una dormición reducida (Koorneef et al., 1989).

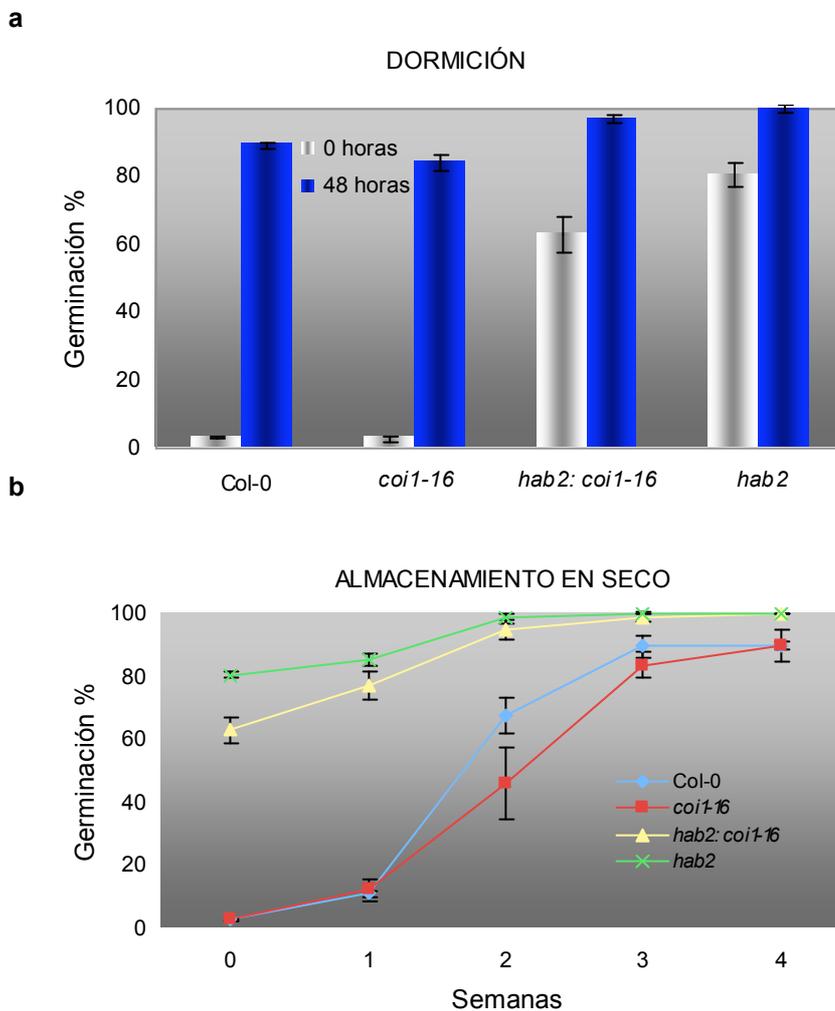
La posible implicación de HAB2 en el mantenimiento de la dormición de semillas de *Arabidopsis*, se estudió analizando los porcentajes de germinación en semillas frescas sometidas a distintos periodos de estratificación en los mutantes *hab2* y *hab2;coi1-16*, así como en los controles Col-0 y *coi1-16*. Para ello, se recogieron semillas de plantas sembradas al mismo tiempo y mantenidas durante su desarrollo bajo idénticas condiciones de humedad y temperatura. Tras la recolección, las semillas se sembraron directamente (tiempo de estratificación 0 horas) o bien, se estratificaron durante 48 horas a 4°C (tratamiento control) en oscuridad y posteriormente fueron mantenidas en una cámara de germinación con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 21°C. En los ensayos de germinación que se exponen a continuación se analizó la germinación *sensu stricto*, estableciendo como único criterio para el recuento de semillas germinadas la emergencia radicular.

Las semillas de tipo silvestre de *Arabidopsis* presentan dormición primaria cuando se recogen de la planta madre, de modo que son incapaces de germinar a menos que sean sometidas a tratamientos adecuados como la aplicación exógena de GAs o la estratificación a 4°C (Koorneef y Karsen, 1994). Así, las semillas del ecotipo silvestre Col-0 y del mutante *coi1-16* únicamente mostraron germinación cuando fueron sometidas a periodos de tratamiento frío, mientras que en ausencia de estratificación apenas presentaron germinación (Figura R.24a). Por su parte, los mutantes *hab2* y *hab2;coi1-16* mostraron porcentajes de germinación cercanos al 80% y 70%, respectivamente en muestras que no habían sido estratificadas, siendo capaces de germinar prácticamente en su totalidad cuando fueron sometidas a periodos de frío iguales o superiores a 48 horas (Figura R.24a).

Todo ello demuestra que el mutante *hab2* presenta una dormición muy reducida, en comparación con el tipo silvestre Col-0, y sugiere que HAB2 participa en la regulación de la

dormición de semillas o en los procesos que determinan la transición de dormición a germinación.

Por otro lado, la capacidad de germinar mostrada por semillas de los mutantes *hab2* y *hab2;coi1-16* recién recogidas de la planta madre, sin necesidad de ser sometidas a ningún tratamiento de estratificación, indica que no son necesarios mecanismos para eliminar la dormición, como por ejemplo el almacenamiento en seco (o *after-ripening*), proceso regulado por el tiempo y el ambiente que se da en las semillas secas y que determina la germinación potencial de las mismas (Carrera et al., 2008). Así, este fenómeno se traduce en un aumento de la sensibilidad a los estímulos ambientales que favorecen la germinación, al mismo tiempo que disminuye la percepción de aquéllos que la reprimen (Finch-Savage y Leubner, 2006).



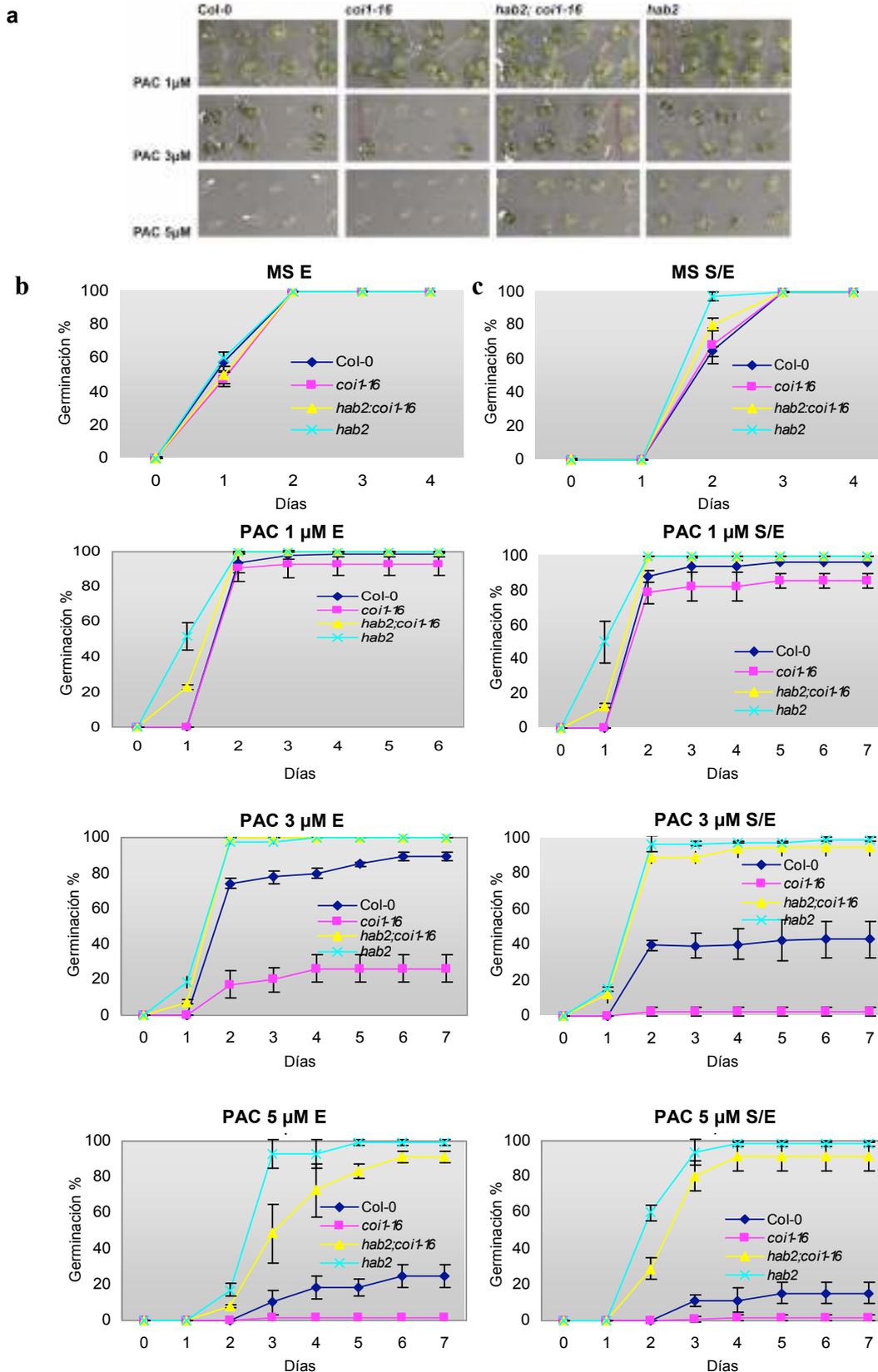
**Figura R.24. a) Ensayo de dormición.** El recuento de semillas germinadas se realizó 5 días después de haber mantenido las semillas en estratificación a 4°C durante 0 h y 48 h. **b) Efecto del almacenamiento en seco.** Semillas recién recogidas se almacenaron en seco y se sembraron semanalmente sin estratificación previa. Los valores de desviación estándar representan el promedio de tres experimentos independientes.

Con el objetivo de estudiar los mecanismos que tienen lugar durante el almacenamiento en seco de las semillas en estos mutantes, se analizó semanalmente a lo largo de un mes la germinación de un mismo lote de semillas almacenadas en ausencia de humedad y a 24°C. Las semillas Col-0 y del mutante *coi1-16* que no fueron capaces de germinar en ausencia de estratificación, mostraron porcentajes de germinación cercanos al 100% cuando fueron sometidas a varias semanas de almacenamiento (Figura R.24b). Por su parte, los mutantes *hab2* y *hab2;coi1-16* presentaron altos porcentajes de germinación en semillas frescas sin estratificar llegando a germinar prácticamente en su totalidad tras sólo una semana de almacenamiento. El incremento en los porcentajes de germinación debido al almacenamiento en seco, indica que en el mutante *hab2* se producen cambios en la expresión génica durante este proceso que favorecen la germinación potencial, a pesar de no ser requeridos para que se reduzcan los niveles de dormición.

En este sentido, debido a que el ABA y las GAs juegan papeles antagónicos en la dormición/germinación de semillas, se llevó a cabo un ensayo de germinación en presencia de paclobutrazol (PAC), un inhibidor de la biosíntesis de GAs. En la figura R.25a se puede observar como el tipo silvestre muestra una germinación muy inhibida en presencia de altas concentraciones del inhibidor (PAC 5  $\mu$ M). El mutante *coi1-16* demostró ser hipersensible a la presencia de PAC, con una germinación retrasada incluso en concentraciones de PAC 3  $\mu$ M. Por su parte, la germinación en *hab2* no se vio alterada por la adición de concentraciones elevadas de PAC. Esta reducción en la necesidad de GAs en el mutante *hab2* sugiere que la expresión de *HAB2* regula positivamente la germinación de semillas a través del bloqueo de la ruta de señalización del ABA.

Por otro lado, tal y como puede observarse en la figura R.25b, la ausencia de estratificación en el tipo silvestre y en *coi1-16* provocó un claro descenso en los porcentajes de germinación en presencia del inhibidor, en comparación con semillas estratificadas sometidas a los mismos tratamientos con PAC. Sin embargo, el mutante *hab2* mostró una germinación plena de las semillas sin estratificar en presencia de concentraciones de PAC 5  $\mu$ M.

Todo ello pone de manifiesto que el mutante *hab2* requiere menores niveles de GAs que el tipo silvestre para germinar y que muestra un bajo grado de dormición, como demuestra su capacidad de germinación en presencia de PAC sin necesidad de estratificación previa.



**Figura R.25. Análisis de la germinación en presencia de paclobutrazol.** a) Diferencias en la germinación mostradas por semillas de Col-0, *coi1-16*, *hab2;coi1-16* y *hab2* estratificadas durante 48 horas en presencia de PAC (0, 1, 3 y 5  $\mu$ M), tras 7 días desarrollándose en estas condiciones. b) Porcentajes de germinación de semillas estratificadas (E) y c) sin estratificar (S/E) en placas control y bajo los tratamientos anteriormente citados. Los valores de desviación estándar representan el promedio de tres experimentos independientes.

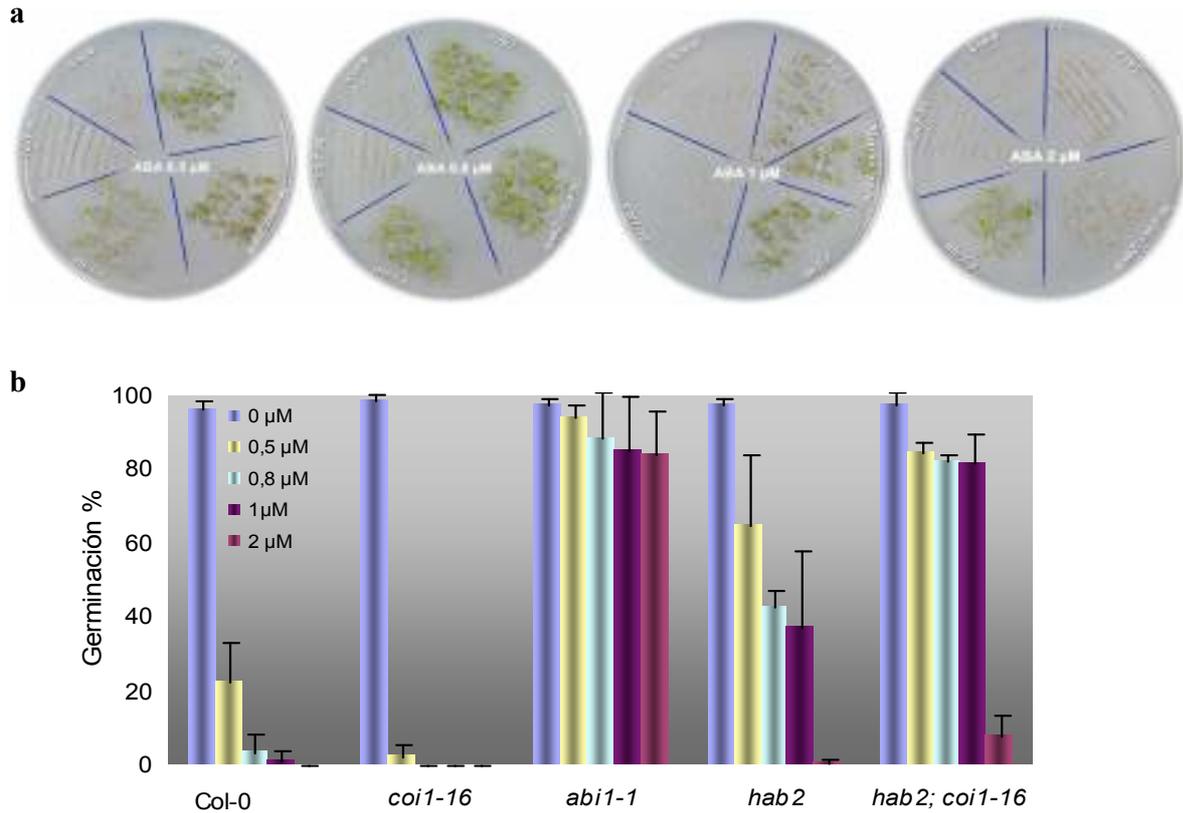
#### 4.3.4. Respuesta del mutante *hab2* a ABA durante el desarrollo temprano.

Otra de las respuestas de los vegetales a ABA es su capacidad para detener el desarrollo temprano bajo condiciones de estrés. Como ya se ha indicado al inicio de este apartado (Figura R.4b) bajas concentraciones de la hormona inhiben la formación de cotiledones verdes y la elongación de la radícula durante el crecimiento post-germinativo.

El efecto de la mutación *hab2* en las respuestas a ABA durante el desarrollo temprano, se analizó estudiando la germinación del mutante simple *hab2* y del doble mutante *hab2;coi1-16* en medio MS suplementado con diferentes concentraciones de la hormona (0.5, 0.8, 1 y 2  $\mu\text{M}$ ). Se consideraron semillas germinadas aquellas en las que se observó emergencia radicular y desarrollo de cotiledones verdes, lo que permitió establecer una clara distinción entre plántulas germinadas y aquellas que habían detenido su desarrollo.

Como se puede observar en la figura R.26a, después de 8 días las semillas del ecotipo silvestre Col-0 eran capaces de germinar en concentraciones de ABA 0.5  $\mu\text{M}$ , aunque la emergencia radicular y el desarrollo de los cotiledones aparecían parcialmente inhibidos, siendo incapaces de completar su desarrollo en presencia de concentraciones más altas de ABA (0.8, 1 y 2  $\mu\text{M}$ ). En el caso del mutante *coi1-16*, la germinación de las semillas estaba totalmente inhibida en concentraciones bajas de la hormona (0.5  $\mu\text{M}$ ), mientras que el mutante *abil-1* era capaz de germinar y desarrollarse en concentraciones altas de ABA (2  $\mu\text{M}$ ). Por su parte, el mutante simple *hab2* presentaba una mayor resistencia que el tipo silvestre a la inhibición de la germinación mediada por ABA, aunque no mostraba los mismos niveles de insensibilidad que *abil-1*, siendo incapaz de completar su desarrollo en presencia de concentraciones de ABA 2  $\mu\text{M}$ . Finalmente, el doble mutante *hab2;coi1-16* mostraba índices de germinación más altos que sus parentales *hab2* y *coi1-16* y muy similares al mutante insensible *abil-1*, si bien exhibía una fuerte inhibición del desarrollo en presencia de ABA 2  $\mu\text{M}$  (Figura R.26b).

Todo ello indica que *hab2* genera fenotipos de insensibilidad a ABA durante los primeros estadios del desarrollo temprano siguientes a la germinación y que es capaz de suprimir la hipersensibilidad a ABA durante esta etapa provocada por la mutación *coi1-16*.



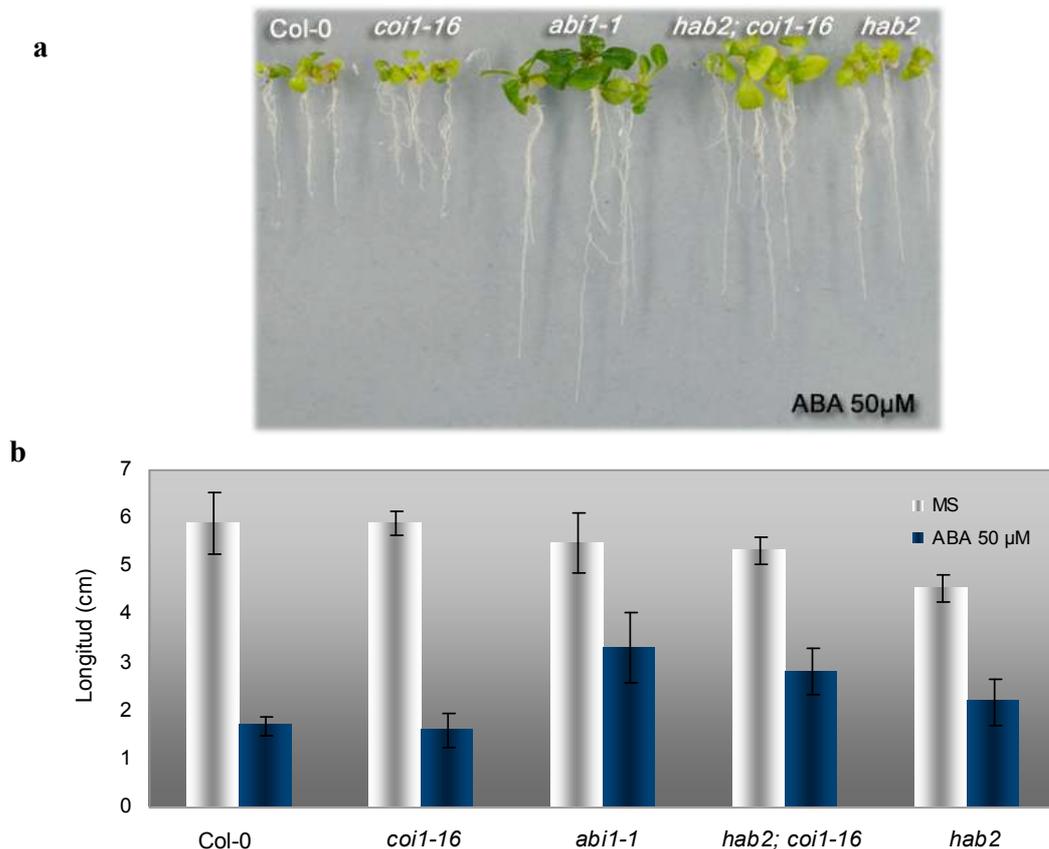
**Figura R.26. Desarrollo de plántulas en presencia de ABA.** a) Diferencias durante los primeros estadios del desarrollo mostradas por plántulas Col-0, *abi1-1*, *coi1-16*, *hab2* y *hab2;coi1-16* en presencia de distintas concentraciones de ABA (0.5  $\mu\text{M}$ , 0.8  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  y 2  $\mu\text{M}$ ) tras 8 días desarrollándose en estas condiciones. b) Porcentaje de plántulas que muestran desarrollo de raíz y de cotiledones verdes en presencia de concentraciones crecientes de ABA, 8 días después de la siembra. Los valores de desviación estándar representan el promedio de tres experimentos independientes.

#### 4.3.5. Ensayo de crecimiento de raíz (*root-growth*).

El ABA, además de regular negativamente la germinación de las semillas, tiene efectos represores sobre el desarrollo de la raíz, de modo que mutantes insensibles a la hormona no muestran alteraciones en el crecimiento de la raíz en presencia de ABA (Himmelbach et al., 1998). Para comprobar si la mutación *hab2* tenía efectos adicionales sobre el desarrollo vegetativo de la planta, se analizó la sensibilidad de las raíces a una concentración elevada de ABA (50  $\mu\text{M}$ ) en placas dispuestas verticalmente. Para ello, plántulas de 5 días crecidas *in vitro*, fueron transferidas a placas de MS y MS suplementadas con ABA 50  $\mu\text{M}$ , midiéndose la longitud de la raíz a los 15 días.

Tal y como puede observarse en la imagen R.27, el tipo silvestre Col-0 muestra una fuerte inhibición del crecimiento radicular en presencia de la hormona. El mutante *coi1-16*

presenta también un desarrollo de la raíz disminuido respecto al observado en MS, si bien tal inhibición era semejante a la mostrada por el tipo silvestre. Por otro lado, en el simple y doble mutante, se comprobó que la longitud de la raíz en estas condiciones era significativamente mayor que en el tipo silvestre Col-0, aproximándose al tamaño de raíz que muestra el mutante *abi1-1*.



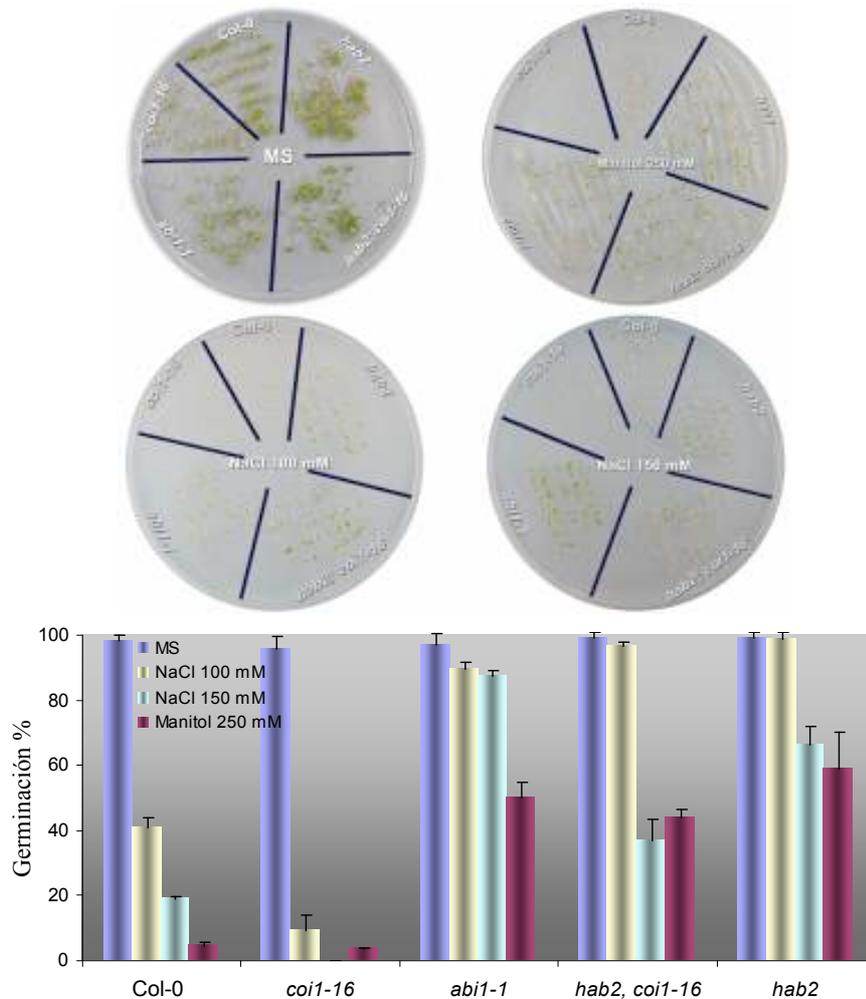
**Figura R.27. Ensayo de crecimiento de raíz para estudiar la sensibilidad a ABA.** a) Plántulas de Col-0, *coi1-16*, *abi1-1*, *hab2;coi1-16* y *hab2* crecidas en MS durante 5 días y posteriormente transferidas a placas de MS+ABA 50  $\mu$ M. La fotografía fue tomada a los 15 días de crecimiento en estas condiciones. b) Longitud de las raíces medidas a los 15 días de ser transferidas. Los valores de desviación estándar representan el promedio de 3 experimentos independientes.

#### 4.3.6. Estrés abióticos: respuesta al estrés salino, osmótico y temperaturas subóptimas de germinación.

Tal y como se indica en el apartado 3.4.4 de la Introducción, una de las principales funciones del ABA durante el crecimiento vegetativo es la de permitir el desarrollo bajo condiciones adversas. Además, se sabe que los mecanismos fisiológicos que gobiernan este tipo de respuestas conducen a la activación de la síntesis de ABA. También se ha comprobado

que el ABA regula negativamente la germinación de las semillas y el desarrollo temprano de las plántulas en presencia de diferentes tipos de estreses abióticos que conducen a un descenso del potencial osmótico, tales como el estrés salino (NaCl) y el tratamiento con manitol (González-Guzmán et al., 2002).

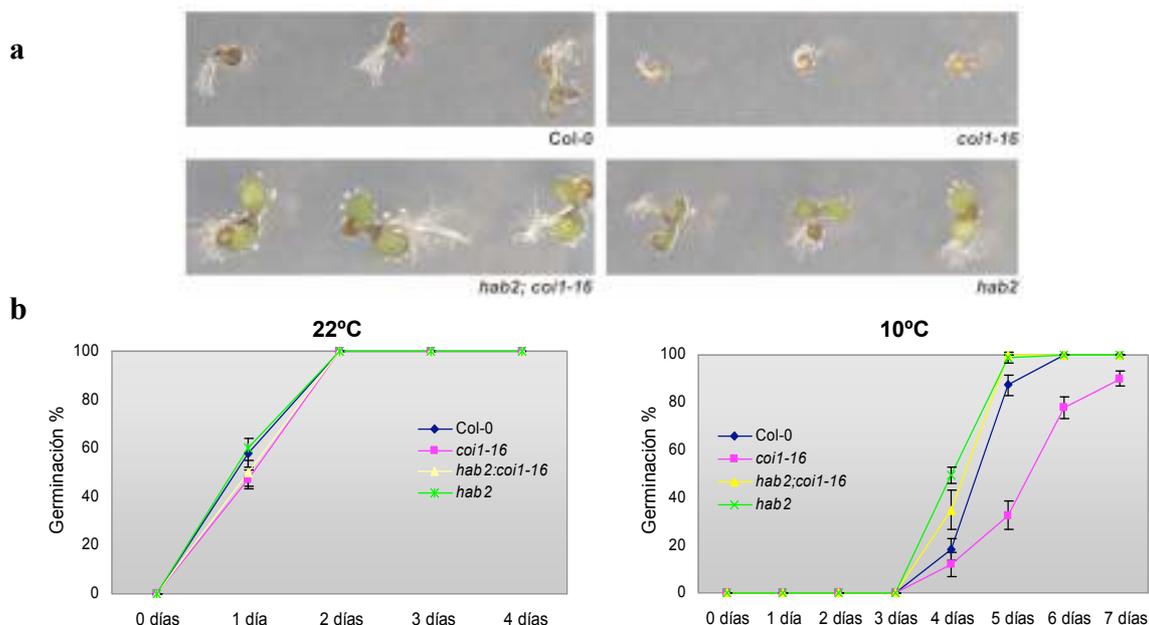
Para estudiar las respuestas del mutante *hab2* a ambos tipos de estreses, se sembraron semillas del tipo silvestre Col-0, del mutante simple *hab2*, el mutante doble *hab2;coil-16* y de los mutantes *abi1-1* y *coil-16* en medio MS suplementado con NaCl (100 mM y 150 mM) y manitol 250 mM. En la figura R.28 se puede comprobar que el tipo silvestre y el mutante *coil-16* presentaban una germinación muy reducida en presencia de ambos tipos de estreses, quedando de nuevo patente la hipersensibilidad del mutante *coil-16* también a estos estreses, fundamentalmente al estrés salino. Por el contrario, los mutantes *abi1-1*, *hab2* y *hab2;coil-16* exhibían altos porcentajes de germinación, mostrando plántulas con raíces y cotiledones verdes perfectamente desarrollados.



**Figura R.28. Ensayo de germinación en presencia de estreses salino y osmótico.** a) Diferencias en la germinación mostradas por semillas Col-0, *coil-16*, *abi1-1*, *hab2;coil-16* y *hab2* en presencia de NaCl 100 mM, 150 mM y manitol 250 mM. b) Porcentajes de germinación en presencia de los diferentes tipos de estreses anteriormente citados. Los valores de desviación estándar indican el promedio de tres experimentos independientes.

La exposición de semillas a temperaturas subóptimas conduce también a una disminución de la tasa de germinación (González-Guzmán et al., 2002). Numerosas evidencias sugieren la implicación del ABA en la aclimatación frente a este tipo de estrés, de modo que los mutantes *aba1-1* (deficientes en la síntesis de ABA) y *abi1-1* (insensibles a la hormona), presentan alteradas las respuestas frente a la exposición a bajas temperaturas (Heino et al., 1990; Lang et al., 1994; Mantyla et al., 1995). También se ha podido demostrar la implicación de las PP2Cs en las respuestas de aclimatación frente a bajas temperaturas (Tähtiharju y Palva, 2001).

Para analizar las respuestas de los mutantes *hab2* y *hab2;coi1-16* a temperaturas subóptimas durante la germinación y el desarrollo temprano, se sembraron semillas de ambos mutantes junto con el tipo silvestre Col-0 y el mutante *coi1-16* en placas de MS y tras 48 horas de estratificación a 4°C se mantuvieron en cámaras de germinación a una temperatura constante de 10°C durante 7 días. En la figura R.29a y b se puede observar como el tipo silvestre es capaz de germinar y desarrollar cotiledones aunque con un alto contenido en antocianinas en estas condiciones. Por su parte, el mutante *coi1-16* experimentó una elevada susceptibilidad frente a la exposición a temperaturas subóptimas, exhibiendo una germinación muy retrasada y ausencia total de cotiledones verdes. Los mutantes *hab2* y *hab2;coi1-16* mostraron una germinación y desarrollo temprano ligeramente más avanzados que el tipo silvestre.



**Figura R.29. Ensayo de germinación en presencia de temperaturas subóptimas. a)** Diferencias en la germinación mostradas por semillas Col-0, *coi1-16*, *hab2;coi1-16* y *hab2* a los 7 días de ser sometidas a una temperatura de 10°C. **b)** Porcentajes de germinación de semillas mantenidas a 22°C y a 10°C. La desviación estándar indica el promedio de tres experimentos.

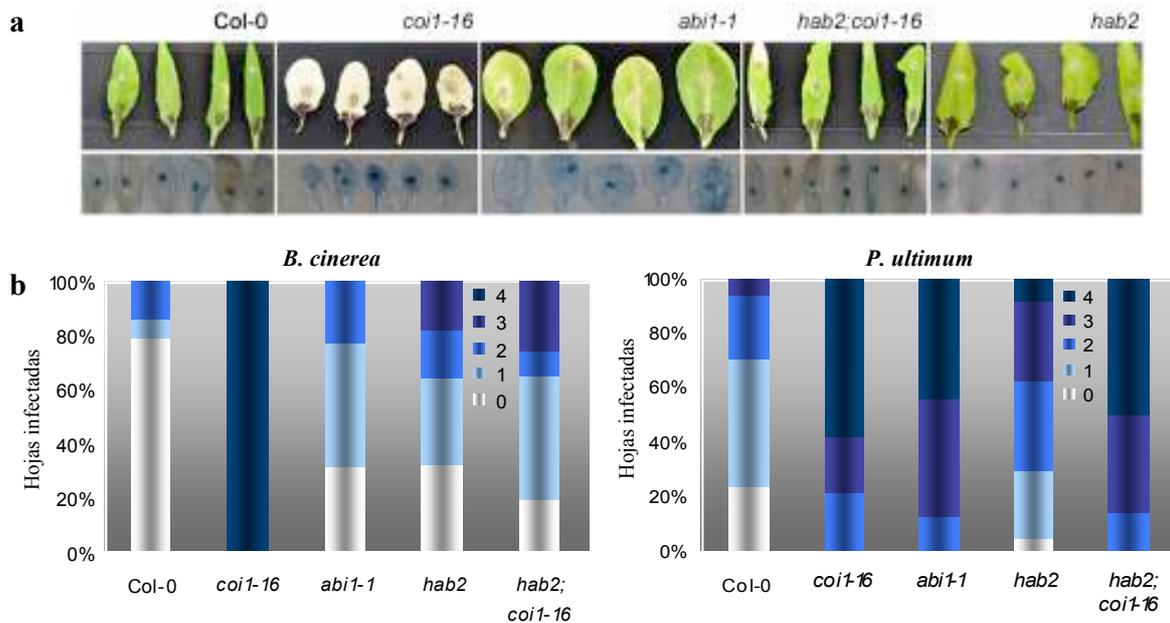
#### 4.3.7. Estrés bióticos.

Uno de los principales mecanismos de defensa de las plantas frente al ataque por hongos fitopatógenos es la activación de distintas rutas de señalización como la de los JAs. Recientemente, se ha establecido que el ABA también participa en la modulación de este tipo de respuestas, si bien su implicación aún no ha sido totalmente dilucidada.

Con el objetivo de comprobar si la mutación *hab2* generaba alteraciones en las respuestas de defensa frente al ataque por hongos fitopatógenos, se inocularon plantas del mutante simple *hab2* y del doble mutante *hab2;coi1-16* con esporas del hongo necrótrofo *Botrytis cinerea*, empleando como controles plantas del tipo silvestre Col-0 y de los mutantes *abi1-1* y *coi1-16*. Se realizaron tres experimentos independientes en los que se llevó a cabo la inoculación de 10 plantas en la parte central de las hojas de la roseta. El crecimiento del patógeno se analizó mediante observación directa a los 6 días de la inoculación y mediante tinción de las hojas infectadas con lactofenol *trypan-blue*. En contraste con lo observado en el tipo silvestre, el mutante *coi1-16* presentaba lesiones necróticas severas en la mayor parte de la superficie de las hojas infectadas. Como se puede observar en la figura R.30a los mutantes *abi1-1*, *hab2* y *hab2;coi1-16* mostraban mayor susceptibilidad al ataque por *B. cinerea* que el tipo silvestre, exhibiendo un área de necrosis en torno a la zona de inoculación ligeramente mayor que Col-0. Sin embargo, en el doble mutante la respuesta a la infección era mucho más reducida que la mostrada por su parental *coi1-16*.

Para comprobar si los cambios en las respuestas de defensa en el mutante simple y en el doble mutante eran específicas al ataque por *B. cinerea*, se llevó a cabo una infección empleando el oomiceto patógeno hemibiótrofo *Pythium ultimum*. De nuevo se observó que el mutante *coi1-16* presentaba una mayor sensibilidad al ataque del patógeno que el tipo silvestre, extendiéndose la infección por gran parte de la superficie de las hojas infectadas, mientras que *hab2* mostraba una susceptibilidad al ataque del patógeno intermedia entre Col-0 y *coi1-16*. En esta ocasión, el mutante *abi1-1* y el doble mutante se comportaron de un modo semejante a *coi1-16*, presentando una elevada sensibilidad al ataque de *P. ultimum* (Figura R.30b).

Estos resultados indican que la mutación *hab2* es capaz de revertir los defectos provocados por la mutación *coi1-16* en las respuestas frente al hongo necrótrofo *B. cinerea* pero no frente al oomiceto hemibiótrofo *P. ultimum*.



**Figura R.30. Susceptibilidad de los mutantes *hab2* y *hab2;coi1-16* al ataque por *B. cinerea* y *P. ultimum*.** a) En la imagen superior se muestran los síntomas tras la inoculación con el hongo *B. cinerea* sobre plantas Col-0, *coi1-16*, *abi1-1*, *hab2* y *hab2;coi1-16*. En la parte inferior, el desarrollo de la infección se determinó mediante tinción con lactofenol *trypan-blue*. b) Representación gráfica de los síntomas causados por la inoculación de esporas de *B. cinerea* y micelio de *P. ultimum* (0-resistencia, 4-máxima susceptibilidad). Los datos expresan los resultados obtenidos en uno de tres experimentos en los que obtuvieron resultados semejantes.

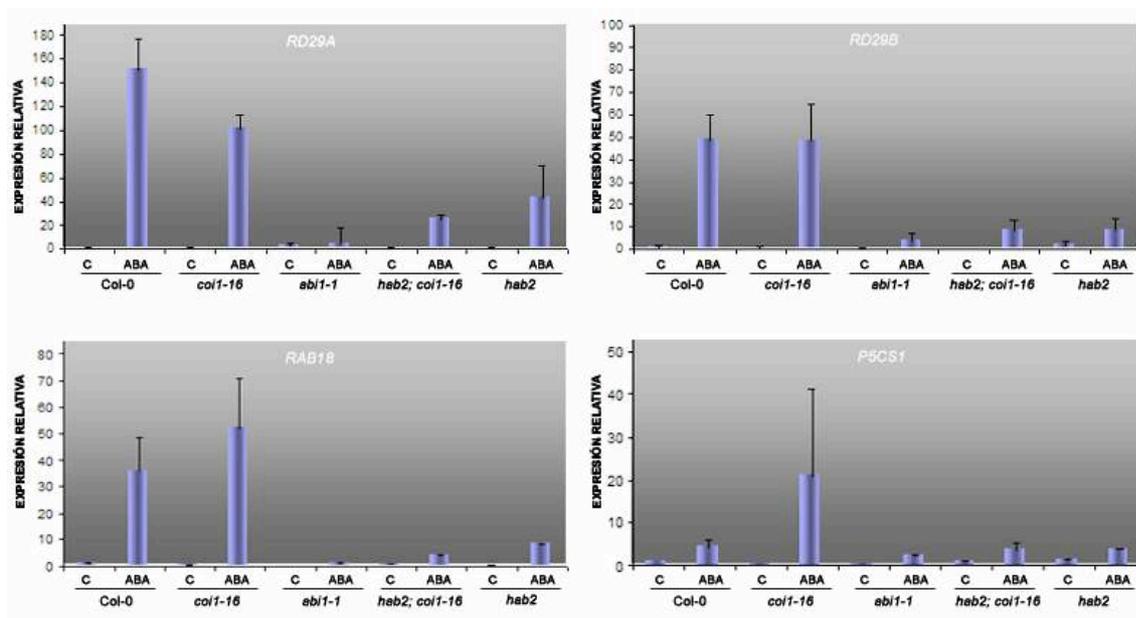
#### 4.4. Estudio de la expresión génica en el mutante *hab2*.

Una vez comprobado que la mutación *hab2* alteraba las respuestas a ABA en diferentes procesos durante el desarrollo de las plantas y las respuestas a estrés, se decidió comprobar si la expresión génica en los mutantes *hab2* y *hab2;coi1-16* estaba afectada tras la aplicación exógena de ABA, para lo cual se analizaron los niveles de transcritos correspondientes a genes marcadores de las respuestas a esta hormona.

Para llevar a cabo el análisis molecular de la respuesta a ABA en estos mutantes, se sembraron semillas del tipo silvestre Col-0 y de los mutantes *coi1-16*, *abi1-1*, *hab2* y *hab2;coi1-16* en placas de MS y se dejaron crecer durante 12 días. Transcurrido este tiempo, las plántulas fueron tratadas con ABA 50  $\mu$ M y con H<sub>2</sub>O como control durante 3 horas. Posteriormente, se extrajo el RNA de las plántulas tratadas y tras la síntesis del cDNA correspondiente, se empleó la técnica de PCR cuantitativa (Q RT-PCR), para estudiar la sensibilidad a ABA en los mutantes mediante el análisis de la inducción de los genes *RD29A*, *RD29B*, *RAB18* y *P5CS1*, implicados en diferentes respuestas a esta hormona. *RD29A* y *RD29B* (*Responsive to Dehydration 29A-B*) son genes inducidos por ABA y por estreses como el frío y la salinidad, que contienen elementos de respuesta a ABA en sus promotores

(Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994). *RAB18* (*Responsive to ABA 18*) es un gen fuertemente inducido por esta hormona cuya expresión está drásticamente inhibida en los mutantes *abi1-1* y *abi2-1* (Lang y Palva, 1992; Leung et al., 1997) y *P5CS1* (*Δ1-pyrroline-5-carboxylate synthase*) es un gen regulado por sequía, salinidad y ABA cuya expresión está reducida en el mutante *abi1-1* (Strizhov et al., 1997). Como ya se había descrito con anterioridad, en presencia de H<sub>2</sub>O no se acumulan los transcritos correspondientes a los cuatro genes marcadores utilizados, ni en los controles ni en los mutantes *hab2* y *hab2;coi1-16* (Figura R.31). Sin embargo, mientras que la adición de ABA provocaba una clara inducción de los genes *RD29A*, *RD29B*, *RAB18* y *P5CS1* en el tipo silvestre Col-0 y en el mutante *coi1-16*, los niveles de transcritos correspondientes a estos genes en los mutantes *abi1-1*, *hab2;coi1-16* y *hab2* eran muy reducidos en respuesta al tratamiento.

Todos ello indica que HAB2 está implicada en la ruta de señalización del ABA regulando negativamente la expresión de estos genes, al igual que se ha descrito para las PP2Cs ABI1 y ABI2.

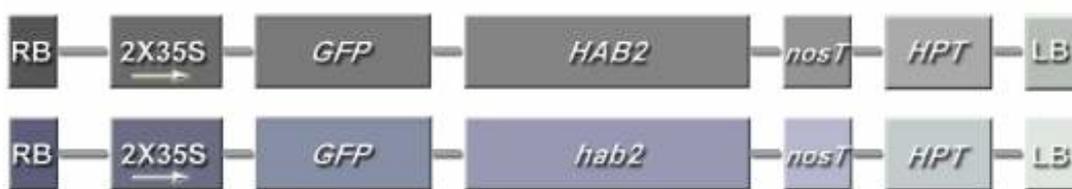


**Figura R.31. Análisis de la expresión mediante Q RT-PCR en los mutantes *hab2* y *hab2;coi1-16*.** La imagen muestra los niveles de expresión de los genes *RD29A* y *B*, *RAB18* y *P5CS1* en los mutantes *hab2* y *hab2;coi1-16* y en los controles Col-0, *coi1-16* y *abi1-1*. Para realizar este ensayo se empleó 1 µg de RNA de plántulas de 12 días tratadas con agua (C) y ABA 50 µM durante 3 horas.

#### 4.5. Localización subcelular de la proteína HAB2.

El siguiente paso fue estudiar la localización subcelular de la proteína HAB2 *in vivo* y para ello se generaron proteínas quiméricas, fusionando el extremo amino terminal de la

proteína HAB2 nativa y su versión mutada hab2G245E a la proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*) (Figura R.32) empleando para ello el vector pMDC43, tal y como se describe en el apartado 5.5.2 de Materiales y Técnicas. Con las construcciones generadas *2X35S:GFP:HAB2* y *2X35S:GFP:hab2* se llevó a cabo la transformación transitoria tanto de células de epidermis de cebolla mediante la técnica de biobalística (Materiales y Técnicas, apartado 8.1) como de células de hoja de tabaco mediante agroinfiltración (Materiales y Técnicas, apartado 8.2). Debido al pequeño tamaño de la proteína GFP, se espera que las proteínas quiméricas GFP-HAB2 y GFP-hab2G245E se comporten igual en cuanto a su localización, que la proteína HAB2 nativa o su versión mutada.

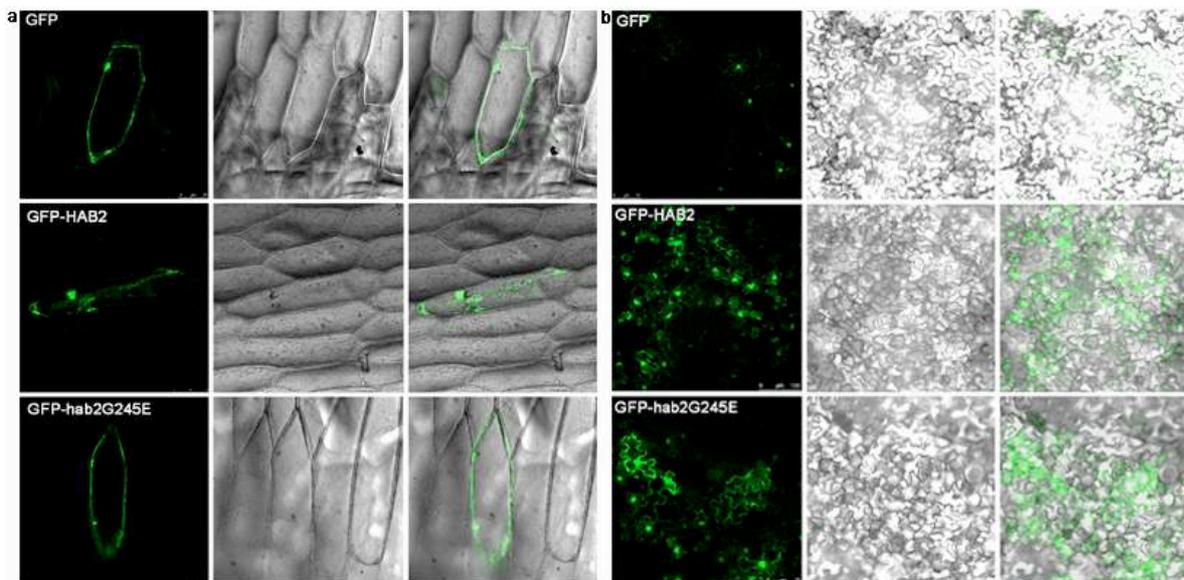


**Figura R.32. Construcciones diseñadas para la transformación transitoria de células de epidermis de cebolla y hojas de tabaco.** Para ello, se clonó la región codificante del cDNA de *HAB2* y *hab2* en el plásmido pMDC43. RB, borde derecho del T-DNA; LB, borde izquierdo del T-DNA; 2X35S, doble promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor; *GFP*, proteína GFP; *nosT*, terminador *NOS*; *HPT*, *Higromicina fosfotransferasa*.

El control realizado con la proteína GFP muestra como, a excepción de la gran vacuola central, se distribuye por toda la célula debido a que su pequeño tamaño le permite difundir a través de la membrana nuclear (Figura R.33a). Por su parte, la proteína HAB2 fusionada a GFP en su extremo amino terminal aparecía tanto en el citoplasma como en el núcleo. En este caso, la localización nuclear de la proteína, a diferencia de la proteína GFP, no se puede producir por difusión pasiva, sino que será debida a señales específicas presentes en la proteína HAB2.

Se ha descrito que la mutación dominante *abi1-1* modifica la distribución subcelular de la proteína ABI1. Así, mientras la proteína nativa se distribuye igualmente por núcleo y citoplasma, la proteína mutada presenta una acumulación preferencial en el núcleo (Moes et al., 2008). Para comprobar si la mutación *hab2* provocaba algún tipo de cambio en la distribución subcelular de la proteína, se llevó a cabo la transformación transitoria de células de epidermis de cebolla con la construcción *2X35S:GFP:hab2* mediante la técnica de biobalística. Tal y como se puede observar en la figura R.33a, el análisis del patrón de distribución de la fluorescencia mediante microscopía confocal confirmó la localización tanto nuclear como citosólica de la proteína GFP-hab2G245E, muy similar a lo que ocurre en las células transformadas con GFP sola y con la proteína quimérica GFP-HAB2.

Para confirmar los datos obtenidos por medio de la técnica de biobalística, se procedió a transformar células de hoja de tabaco mediante agroinfiltración. Esta técnica permite estudiar la localización subcelular de una proteína utilizando para ello la capacidad infectiva de *A. tumefaciens* sobre los tejidos vegetales. Con este fin, se transformaron células competentes de *A. tumefaciens* con las mismas construcciones usadas para el bombardeo de células de epidermis de cebolla, procediendo a realizar con ellas la agroinfiltración de hojas de tabaco. En la figura R.33b, se aprecia como tanto la proteína GFP como las proteínas HAB2 y hab2G245E mostraban una distribución muy similar dentro de la célula, presentando una localización tanto nuclear como citosólica.

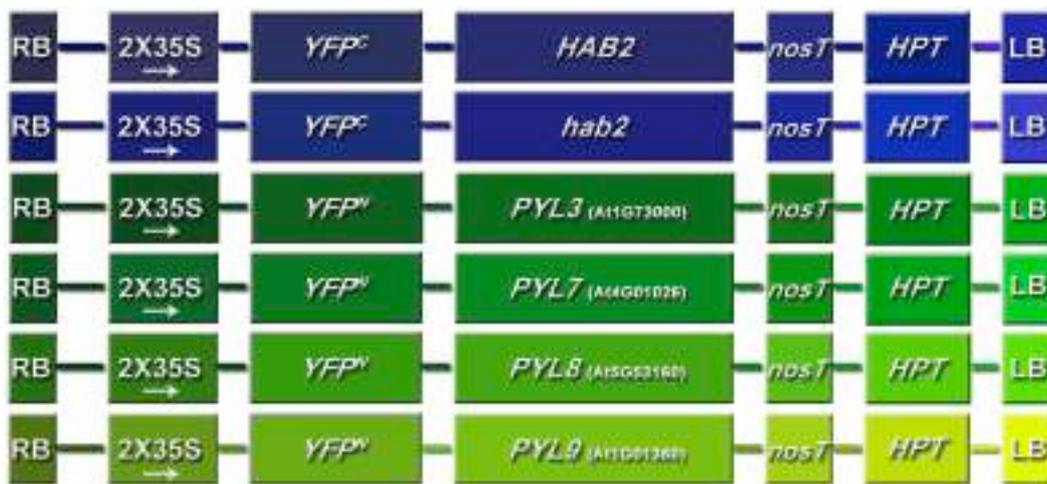


**Figura R.33. Localización subcelular de HAB2.** Imágenes de microscopía confocal de la localización subcelular de las proteínas quiméricas GFP-HAB2 y GFP-hab2G245E. **a)** Células de epidermis de cebolla (*A. cepa*). **b)** Células de tabaco (*N. benthamiana*). **b)** En la primera fotografía de cada serie se muestra la imagen que recoge la fluorescencia, en la segunda imagen se representa la luz transmitida y en la tercera imagen se recogen simultáneamente la fluorescencia y luz transmitida.

#### 4.6. Análisis de la interacción entre HAB2 y proteínas de la familia de receptores de ABA PYR1/PYL-RCAR.

Para analizar la interacción *in planta* entre la proteína HAB2 y las proteínas PYR1/PYL-RCAR, recientemente identificadas como receptores de ABA (Ma et al., 2009; Park et al., 2009; Santiago et al., 2009) se empleó la técnica de complementación bimolecular fluorescente (BiFC). Con este objetivo, HAB2 se fusionó al extremo C-terminal de la proteína fluorescente amarilla (YFP<sup>C</sup>) en el vector pYFP<sup>C</sup> (Figura R.34), un derivado del vector pMDC43, generando la proteína quimérica YFP<sup>C</sup>-HAB2. Por otro lado, las proteínas PYL7

(At4g01026) y PYL8 (At5g53160) fueron fusionadas al extremo N-terminal de la proteína fluorescente amarilla (YFP<sup>N</sup>) en el vector pYFP<sup>C</sup>, derivado del vector pMDC43, generando las proteínas quiméricas YFP<sup>N</sup>-At5g53160 y YFP<sup>N</sup>-At4g01026 (Figura R.34). Estas construcciones se utilizaron para transformar *A. tumefaciens*, junto con el vector p19 que evita el silenciamiento génico y fueron coinfiltradas en hojas de *N. benthamiana*, que fueron analizadas 3 días después mediante microscopía confocal. Como control positivo se empleó la interacción ya descrita entre las proteínas quiméricas YFP<sup>C</sup>-FsPP2C1 y YFP<sup>N</sup>-At5g53160 (PYL8) (Saavedra et al., 2010), mientras que el control negativo se realizó coinfiltrando la proteína quimérica YFP<sup>C</sup>-HAB2 y el extremo N-terminal de la proteína fluorescente amarilla (YFP<sup>N</sup>).

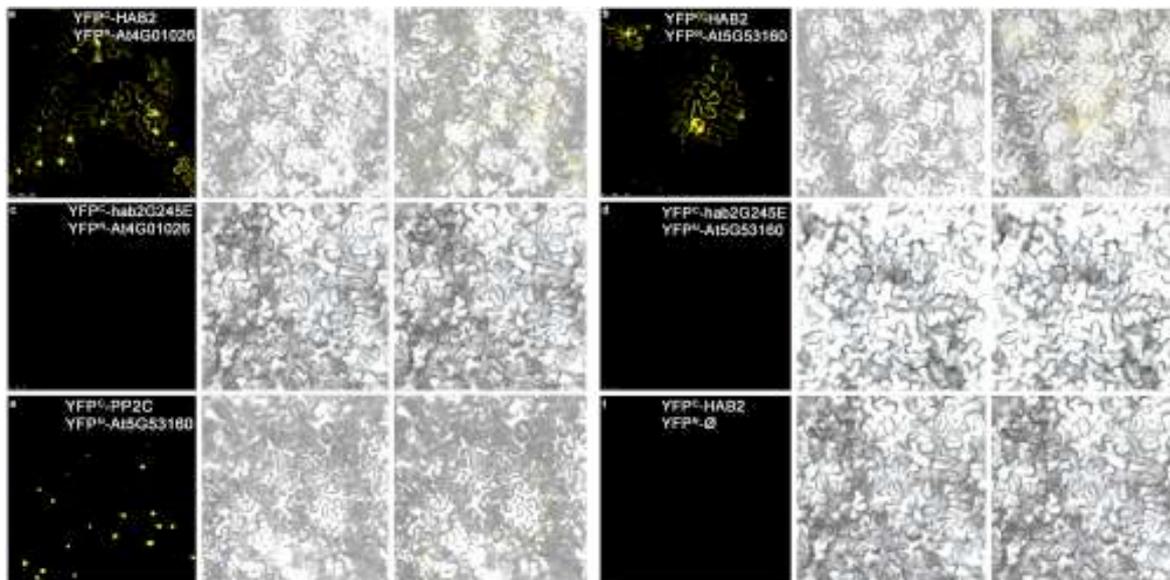


**Figura R.34. Construcciones empleadas para realizar el ensayo BiFC.** RB, borde derecho del T-DNA; LB, borde izquierdo del T-DNA; 2X35S, doble promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor; YFP<sup>C</sup>, extremo C-terminal de la proteína YFP; YFP<sup>N</sup>, extremo N-terminal de la proteína YFP; nosT, terminador NOS; HPT, Higromicina Fosfotransferasa.

Las proteínas FsPP2C1 y PYL8 (At5g53160) eran capaces de interactuar, localizándose tal interacción en el núcleo de la célula (Figura R.35e), coincidiendo este resultado con lo observado en trabajos anteriores (Saavedra et al., 2010). Cuando se realizó la infiltración en hojas de tabaco de las proteínas quiméricas YFP<sup>C</sup>-HAB2 y YFP<sup>N</sup>-At4g01026 por una parte, y YFP<sup>C</sup>-HAB2 y YFP<sup>N</sup>-At5g53160 por otra, se pudo comprobar que existía interacción molecular entre ellas (Figura R.35a y b). Este ensayo también determinó que la interacción mostraba una distribución muy similar por toda la célula, lo que coincide con la localización citosólica y nuclear tanto de la proteína HAB2 (Figura R.33a y b) como de las proteínas PYL/RCAR (Saavedra et al., 2010). Por el contrario, cuando se llevó a cabo la coinfiltración de la proteína quimérica YFP<sup>C</sup>-HAB2 y el extremo N-terminal de la proteína YFP (YFP<sup>N</sup>) no se observó fluorescencia (Figura R.35f).

Recientemente, se ha comprobado que los mutantes *abi1-1* y *abi2-1* no son capaces de unirse a la proteína receptora de ABA PYR1 (Park et al., 2009). Para comprobar si la mutación *hab2* impedía la interacción entre HAB2 y las proteínas PYL7 (At4g01026) y PYL8 (At5g53160), la proteína mutada *hab2G245E* se fusionó al extremo C-terminal de la proteína fluorescente amarilla (YFP<sup>C</sup>) en el vector pYFP<sup>C</sup>, generando la proteína quimérica YFP<sup>C</sup>-*hab2G245E* que junto con las construcciones YFP<sup>N</sup>-At4g01026 y YFP<sup>N</sup>-At5g53160 (Figura R.34) y el vector p19 fueron coinfiltradas en plantas de *N. benthamiana*. El análisis mediante microscopía confocal de las hojas transformadas reveló ausencia de fluorescencia debido a que no se había producido la reconstrucción de la proteína YFP, lo que demostraba que no había interacción entre las proteínas *hab2G245E* y PYL7 (At4g01026) o PYL8 (At5g53160) (Figura R.35c y d).

Este resultado indicaba que la mutación *hab2*, al igual que otras mutaciones dominantes presentes en PP2Cs del grupo A como *abi1-1* y *abi2-1*, impedía la formación del complejo receptor de ABA, PYR1/PYL-RCAR-PP2C.

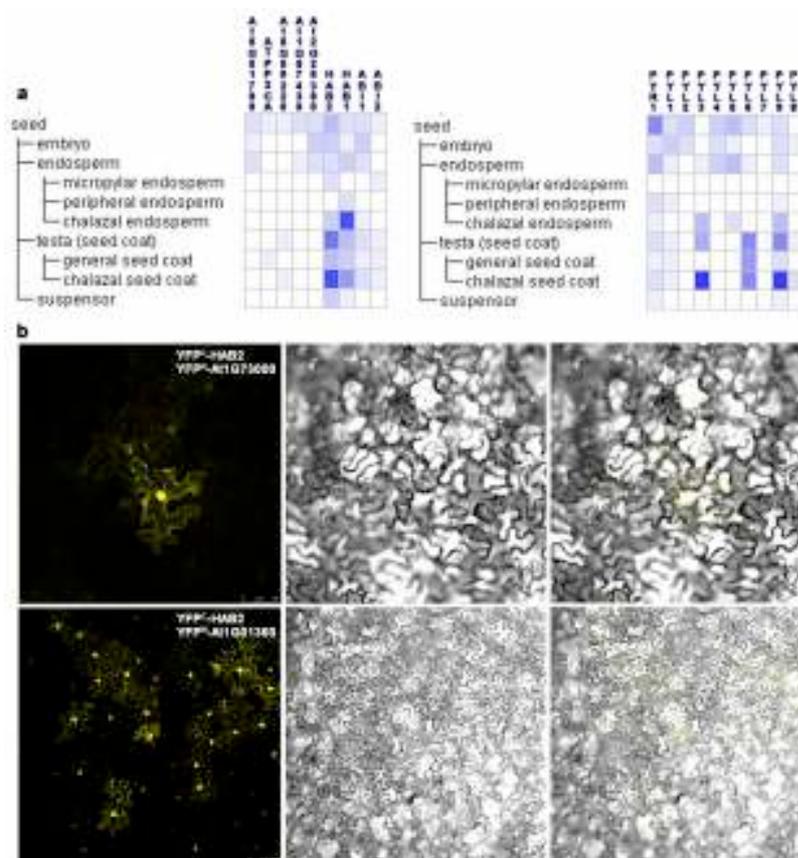


**Figura R.35. Localización subcelular de la interacción mediante BiFC entre a-b) HAB2 y las proteínas PYL7 (At4g01026) o PYL8 (At5g53160) en epidermis de hoja de tabaco, y entre c-d) *hab2G245E* y PYL7 o PYL8, empleando como control positivo la interacción e) FsPP2C1-At5g53160 y como control negativo f) la ausencia de interacción entre la proteína quimérica YFP<sup>C</sup>-HAB2 y el vector vacío pYFP<sup>N</sup>.** En la primera fotografía de cada serie se muestra la imagen que recoge la fluorescencia, en la segunda imagen se representa la luz transmitida y en la tercera imagen se recogen simultáneamente la fluorescencia y luz transmitida.

Como ya se indicó en el apartado 4.3.1 de Resultados, el doble mutante *hab2;coi1-16* produce semillas inviables con claros defectos en el desarrollo embrionario, lo que podría indicar que HAB2 participara en alguna fase de la embriogénesis. Para confirmar esta posible función de HAB2, en primer lugar se analizaron los datos obtenidos de la base de datos

*Genevestigator*, donde se pudieron identificar las proteínas específicas de semilla PYL3 (At1g73000) y PYL9 (At1g01360), cuyo patrón de expresión en la semilla era muy semejante al mostrado por HAB2. En este sentido, se comprobó que PYL9 y HAB2 presentaban niveles de expresión en el suspensor del embrión, siendo muy similares en la testa (Figura R.36a). A continuación, se procedió a realizar el ensayo BiFC con las dos proteínas PYL1/PYL-RCAR que mostraron niveles de expresión mayoritarios en la semilla.

Las proteínas PYL3 y PYL9 fueron fusionadas al extremo N-terminal de la proteína fluorescente amarilla (YFP<sup>N</sup>) en el vector pYFP<sup>N</sup>, generando las proteínas quiméricas YFP<sup>N</sup>-At1g73000 y YFP<sup>N</sup>-At1g01360 (Figura R.34) y ambas fueron coinfiltradas junto con la construcción pYFP<sup>C</sup>-HAB2 y el vector p19 en plantas de *N. benthamiana*. El análisis de las hojas transformadas, mediante microscopía confocal, reveló la existencia de interacción entre HAB2 y ambas proteínas (Figura R.36b). De nuevo, se pudo comprobar que la interacción entre HAB2 y las dos proteínas PYL/RCAR se producía por toda la célula, confirmando una vez más los resultados obtenidos mediante biobalística y agroinfiltración en los que observó que HAB2 se distribuía por núcleo y citoplasma (Figura R.33).



**Figura R.36. a)** Patrón de expresión de las 9 PP2Cs del grupo A y de 10 proteínas PYL1/PYL-RCAR. PYL3 muestra únicamente expresión en la semilla mientras que el patrón de expresión de PYL9 y HAB2 es muy semejante, mostrando ambas expresión en el suspensor del embrión. **b)** Localización subcelular de la interacción mediante BiFC entre HAB2 y las proteínas PYL3 (At1g73000) y PYL9 (At1g01360).

Estos resultados muestran la interacción entre HAB2 y las dos proteínas PYR1/PYL-RCAR con una expresión mayoritaria en semillas (PYL3 y PYL9) y serían una prueba más de la implicación de esta PP2C en el desarrollo de las semillas.

#### 4.7. Generación de las líneas transgénicas 35S:GFP:HAB2 y 35S:GFP:hab2.

A partir de los resultados obtenidos, el siguiente paso fue analizar los efectos que la sobreexpresión del gen *HAB2* y su versión mutada *hab2* podían tener en las distintas respuestas reguladas por ABA, generando plantas transgénicas que sobreexpresaran ambos genes. Para ello, se diseñaron las construcciones que se muestran en la figura R.32 empleando el vector binario pMDC43.

El método de transformación de plantas de *A. thaliana* fue el de infiltración *in planta* (Materiales y Técnicas, apartado 7.1.2). Las semillas transformadas (en las que *A. tumefaciens* ha introducido el plásmido pMDC43) fueron seleccionadas por su resistencia a higromicina (Hig) conferida por el gen *HPT* presente en el T-DNA. En este sentido, las semillas no transformadas presentaron un desarrollo retrasado, mientras que las semillas resistentes mostraban una perfecta formación de raíz y cotiledones verdes.

De las semillas procedentes de las plantas infiltradas (T0) se obtuvieron 3 plantas resistentes a Hig por cada mil, indicando que la eficiencia de transformación había sido de un 0.3%.

##### 4.7.1. Segregación de los transgenes en la progenie.

Las semillas provenientes de las plantas T1 mostraron segregación de la resistencia a Hig, conferida por el gen *HPT* incluido en el T-DNA introducido en las plantas. La tabla R.2 resume la segregación observada en la T2 para cada línea de la generación T1.

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

La transmisión del gen de resistencia a Hyg de la generación T1 a la T2, coincide con la segregación de inserciones del T-DNA como un marcador dominante en hemigogosis. En la generación T2 se analizaron 31 líneas diferentes para el transgén *HAB2* y 55 para el transgén *hab2* y se determinaron las líneas homocigotas en la T3, seleccionándose aquellas que presentaban una única copia de T-DNA. Las líneas 35S:*HAB2*-1 (H1), 35S:*HAB2*-2 (H2),

*35S:hab2-1* (h1) y *35S:hab2-2* (h2) mostraban una distribución de resistencia a Hig que se ajusta a una segregación mendeliana de 1 inserción en un solo locus, mientras que el resto no presentaban este tipo de patrón.

Una vez seleccionadas las líneas homocigotas para los dos transgenes en la generación T3, se llevó a cabo la caracterización fenotípica y molecular de cada una de ellas.

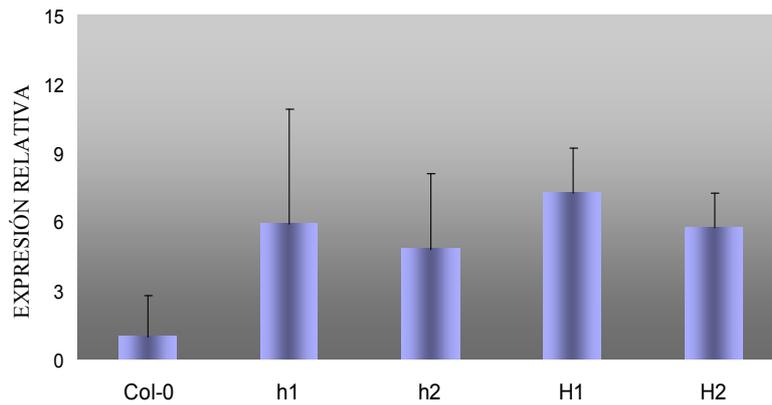
**Tabla R.2. Segregación de la resistencia a higromicina (Hig) de las líneas transgénicas en la generación T2.** Hig<sup>R</sup>: número de plántulas resistentes a Hig. Hig<sup>S</sup>: número de plántulas sensibles a Hig. R: resistentes. S: sensibles.

CONSTRUCCIÓN-LÍNEA	SEGREGACIÓN		VALOR X <sup>2</sup> PARA CADA COCIENTE		
	HIG <sup>R</sup>	HIG <sup>S</sup>	3R:1R (1 INSERTO)	15R:1R (2 INSERTOS)	63R:1R (3 INSERTOS)
<i>pMDC43-HAB2-1</i> (H1)	80	23	0,262	42,750	275,477
<i>pMDC43-HAB2-2</i> (H2)	80	29	0,076	73,465	428,313
<i>pMDC43-HAB2-3</i> (H3)	115	82	28,157	414,704	2029,680
<i>pMDC43-HAB2-4</i> (H4)	107	17	7,839	10,538	111,191
<i>pMDC43-hab2-1</i> (h1)	72	30	0,837	89,477	496,839
<i>pMDC43-hab2-2</i> (h2)	50	25	2,351	89,324	471,456
<i>pMDC43-hab2-3</i> (h3)	77	87	67,325	605,041	2793,107
<i>pMDC43-hab2-4</i> (h4)	160	20	17,785	6,453	100,584

#### 4.7.2. Caracterización molecular de los transgenes *HAB2* y *hab2*.

Para comprobar los niveles de expresión del transgén *HAB2* en las líneas transformadas con las construcciones *35S:GFP:HAB2* y *35S:GFP:hab2*, respectivamente, se analizaron sus niveles de transcritos mediante Q RT-PCR en plántulas de 12 días. Como se puede observar en la figura R.37, en las 2 líneas transgénicas independientes *35S:GFP-hab2* (h1, h2) los niveles de transcrito del transgén *hab2* eran muy superiores al tipo silvestre Col-0. Asimismo, el análisis por Q RT-PCR mostró una alta expresión del transgén *HAB2* en las plantas transformadas con la construcción *35S:GFP-HAB2* (H1, H2).

Por lo tanto, estas cuatro líneas homocigotas que contienen una única inserción y elevados niveles de expresión del transgén se seleccionaron para los posteriores análisis fenotípicos y de expresión génica.

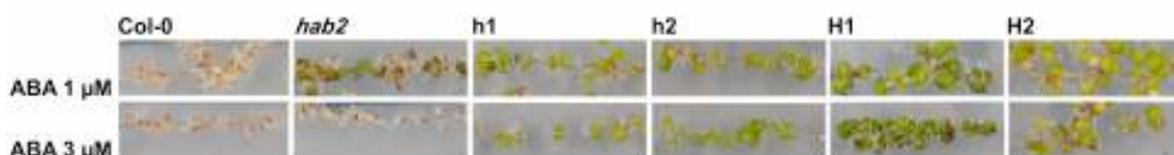


**Figura R.37. Análisis por Q RT-PCR de las líneas que sobreexpresan los transgenes *hab2* y *HAB2*.** La imagen muestra los niveles de expresión del gen *HAB2* en Col-0 y en plantas que portan la construcción *35S:hab2* (h1 y h2) y en plantas transgénicas que sobreexpresan la construcción *35S:HAB2* (H1 y H2).

#### 4.7.3. Caracterización fenotípica de las plantas *35S:GFP:HAB2* y *35S:GFP:hab2*.

Para comprobar cómo afectaba la sobreexpresión de *HAB2* y su versión mutada *hab2* en las respuestas a ABA durante la germinación de semillas, se realizaron estudios de sensibilidad a ABA en las líneas transgénicas *35S:GFP:hab2* y *35S:GFP:HAB2* en esta etapa del desarrollo y se analizó su respuesta en presencia de diferentes tipos de estreses.

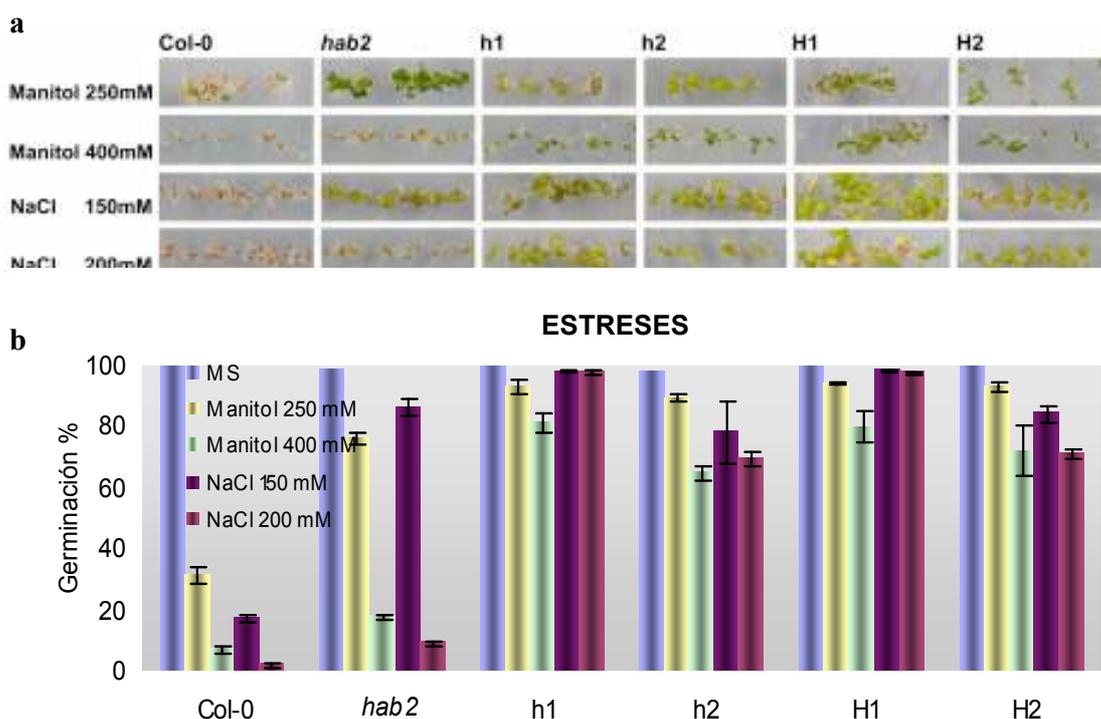
En primer lugar, se sembraron las semillas en presencia de concentraciones de ABA inhibitorias de la germinación (1  $\mu\text{M}$  y 3  $\mu\text{M}$ ). Tal y como puede observarse en la figura R.38, el desarrollo de las plántulas del tipo silvestre Col-0 se encontraba totalmente inhibido en presencia de la hormona. Por su parte, las semillas del mutante *hab2* eran capaces de germinar y completar su desarrollo en concentraciones de ABA 1  $\mu\text{M}$ , si bien en concentraciones superiores la germinación se veía fuertemente inhibida, como ya habíamos observado previamente. En el caso de las semillas transgénicas *35S:GFP:hab2* y *35S:GFP:HAB2*, la germinación no se vio afectada por la presencia de la hormona, siendo capaces de desarrollarse bajo estas condiciones inhibitorias para el tipo silvestre. Estos datos también demuestran el mayor efecto de la sobreexpresión constitutiva comparado con los niveles de expresión del promotor endógeno de *HAB2*.



**Figura R.38. Ensayo de germinación con semillas *35S:hab2* (h1, h2) y *35S:HAB2* (H1, H2) en presencia de ABA.** En la imagen se muestran las diferencias en la germinación mostradas por semillas Col-0, *hab2* y semillas que sobreexpresan *hab2* y *HAB2*, tras 8 días en presencia de ABA 1  $\mu\text{M}$  y 3  $\mu\text{M}$ .

Posteriormente, se analizó si la sobreexpresión de los transgenes *hab2* y *HAB2* tenía algún efecto en la respuesta a estreses osmótico y salino. Para ello, se sembraron semillas de ambos tipos de plantas transgénicas en presencia de manitol (250 mM y 400 mM) y de NaCl (150 mM y 200 mM). En estos ensayos, el tipo silvestre Col-0 mostró inhibición de la germinación en presencia de ambos tipos de estreses. El mutante *hab2*, si bien era capaz de desarrollarse en concentraciones bajas de manitol y de NaCl, mostró inhibida la germinación en presencia de concentraciones más altas (Figura R.39a). Por su parte, las plantas transgénicas *35S:GFP:hab2* (h1, h2) y *35S:GFP:HAB2* (H1, H2) mostraron una alta insensibilidad a la inhibición de la germinación provocada por ambos tipos de estreses, presentando un desarrollo completo de cotiledones y raíz en estas condiciones, con porcentajes del 70-80% (Figura R.39b).

Estos resultados ponen nuevamente de manifiesto el papel como regulador negativo de la PP2C HAB2 en la señalización de ABA y las respuestas a estrés reguladas por esta hormona.

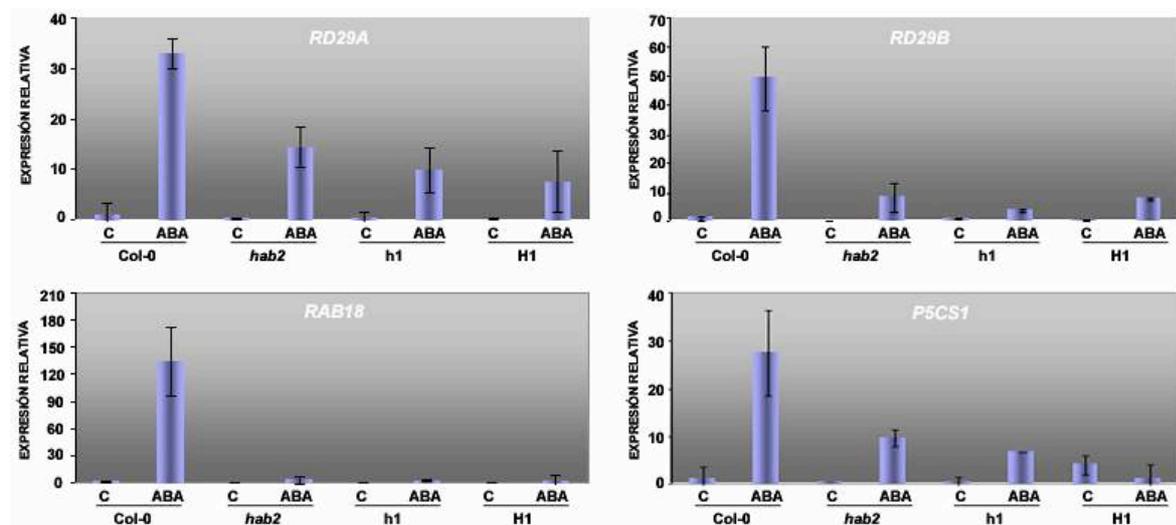


**Figura R.39. Ensayo de germinación con semillas transgénicas *35S:hab2* (h1, h2) y *35S:HAB2* (H1, H2) en presencia de diferentes tipos de estreses.** a) Diferencias en la germinación mostradas por semillas Col-0, *hab2* y semillas que sobreexpresan *hab2* (h1, h2) y *HAB2* (H1, H2) en presencia de manitol (250 mM y 400 mM) y NaCl (150 mM y 200 mM), tras 8 días desarrollándose en estas condiciones. b) Porcentaje de plántulas que muestran desarrollo de raíz y cotiledones verdes en presencia de las condiciones citadas, 8 días después de la siembra. Los valores de desviación estándar representan el promedio de tres experimentos independientes.

#### 4.7.4. Efecto de la expresión constitutiva de *HAB2* y su versión mutada *hab2* en la regulación de genes de respuesta a ABA.

Para examinar en mayor profundidad si la reducción en la sensibilidad a ABA mostrado por las líneas transgénicas que sobreexpresaban los transgenes *HAB2* y *hab2* iba acompañada por una modificación en la expresión de genes de respuesta a ABA, se decidió analizar en ellas los niveles de transcritos correspondientes a los genes marcadores de las respuestas a esta hormona, *RAB18*, *RD29A-B* y *P5CS1*.

El estudio de su expresión, tanto en las plantas de tipo silvestre Col-0 como en el mutante *hab2* y en las distintas líneas transgénicas tratadas con ABA 50  $\mu$ M, mostró una reducción significativa de la inducción de todos los genes en el mutante y en las sobreexpresiones de *hab2* (h1) y *HAB2* (H1), mientras que los niveles de expresión fueron muy elevados en Col-0 (Figura R.40), lo que indica una vez más que *HAB2* regula negativamente la expresión de *RAB18*, *RD29A-B* y *P5CS1*, al igual que se ha descrito para *ABI1* y *ABI2*.



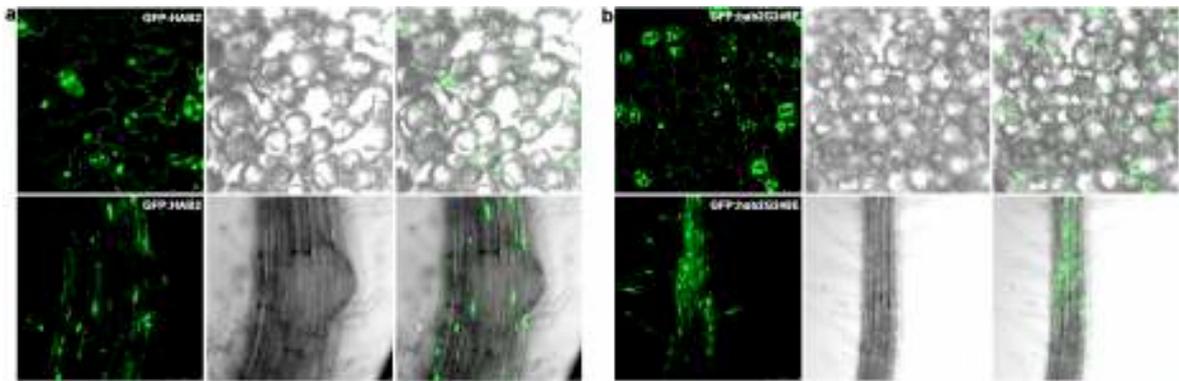
**Figura R.40. Análisis de expresión mediante Q RT-PCR en líneas transgénicas *35S:hab2* (h1) y *35S:HAB2* (H1).** La imagen muestra los niveles de expresión de los genes *RD29A-B*, *RAB18* y *P5CS1* en plántulas del tipo silvestre, del mutante *hab2* y las líneas *35S:hab2* (h1) y *35S:HAB2* (H1). Para realizar este ensayo se empleó 1  $\mu$ g de RNA de plántulas de 12 días tratadas con agua y ABA 50  $\mu$ M durante 3 horas.

#### 4.7.5. Localización subcelular de *HAB2* y *hab2G245E* en las plantas transgénicas.

Finalmente, dado que las plantas transgénicas que sobreexpresaban los transgenes *HAB2* y *hab2G245E*, se habían generado como líneas reportadoras que contenían GFP, sirvieron para analizar la localización subcelular *in vivo* de la proteína *HAB2* y de su versión

mutada *hab2G245E*, utilizando como sistema modelo *A. thaliana*. El análisis mediante microscopía confocal confirmó la localización tanto nuclear como citosólica de la proteína quimérica GFP-HAB2. Por otro lado, la mutación *hab2* no generó ninguna modificación del patrón de distribución en la célula de la proteína, mostrando la proteína quimérica GFP-*hab2G245E* la misma localización subcelular que la proteína fusión GFP-HAB2 (Figura R.41).

Estos datos corroboran los obtenidos mediante expresión transitoria en células epidérmicas de cebolla y hojas de tabaco.



**Figura R.41.** Imágenes de microscopía confocal de las proteínas quiméricas GFP:HAB2 (a) y GFP:*hab2G245E* (b) en células de hoja (panel superior) y de raíz (panel inferior) en *Arabidopsis*.

## CAPÍTULO II: ANÁLISIS FUNCIONAL DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL ANAC089.

### 5. NUEVA ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA DE MUTANTES AFECTADOS EN LAS RESPUESTAS A ABA.

La molécula de ácido abscísico (ABA) presenta isomería óptica debido a que el C-1 es asimétrico, por lo que se puede presentar en forma de dos enantiómeros, (+)-*S*-ABA (forma natural) y (-)-*R*-ABA (forma artificial). Ambas moléculas se metabolizan de modo diferente, causando efectos fisiológicos dispares en diversos procesos del desarrollo vegetal como la germinación de semillas, apertura y cierre estomático y en la expresión génica (Walker-Simmons et al., 1994; Nambara et al., 2002). El uso de uno u otro enantiómero es, por tanto, importante para estudiar el metabolismo y los efectos de esta fitohormona en las plantas, así como para poder identificar componentes moleculares distintos en sus rutas de señalización y diseccionar en mayor profundidad las respuestas a ABA.

En trabajos anteriores llevados a cabo por el grupo de investigación del Dr. E. Nambara, se han intentado aislar mutantes que fueran capaces de diferenciar ambos enantiómeros. De esta forma, se abordó una búsqueda de mutantes afectados en la respuesta a ABA durante la germinación empleando como aproximación experimental en primer lugar la adición exógena del isómero (-)-*R*-ABA (Nambara et al., 2002). En este *screening* se identificaron 11 alelos diferentes del mutante *abi4*, además de dos mutantes, *cho1* y *cho2*, afectados en las respuestas a ABA reguladas por ABI4 (Yamagishi et al., 2009). Todo ello sugería que el uso de (-)-*R*-ABA era útil para identificar mutantes afectados en la ruta de señalización regulada por ABI4, pero resultaba menos efectiva para el estudio de las respuestas a ABA moduladas por otras proteínas como ABI5 (únicamente se pudieron aislar 3 alelos del mutante *abi5*). En una segunda aproximación, se diseñó una nueva búsqueda de mutantes empleando en esta ocasión el enantiómero (+)-*S*-ABA como fuente exógena de ABA. Para ello, se mutagenizaron con EMS y con *fast neutrón* (un agente mutagénico físico que provoca deleciones en los genes afectados) aproximadamente 1.000 semillas de los tipos silvestres Col-0 (en ambos casos) y *Ler* (sólo en la mutagénesis con EMS) y se emplearon 20.000 semillas de la generación M2 para afrontar esta nueva búsqueda de mutantes. Los mutantes se seleccionaron en medio MS suplementado con (+)-*S*-ABA 1  $\mu$ M y así se obtuvieron 19 mutantes insensibles a este enantiómero durante la germinación de semillas (Tabla R.3). Los test de alelismo y complementación permitieron identificar 7 alelos de *abi3*, 4 alelos de *abi4* y 5 alelos de *abi5*. Además, se aislaron dos nuevos mutantes, uno en cada mutagénesis, abordándose su localización cromosómica.

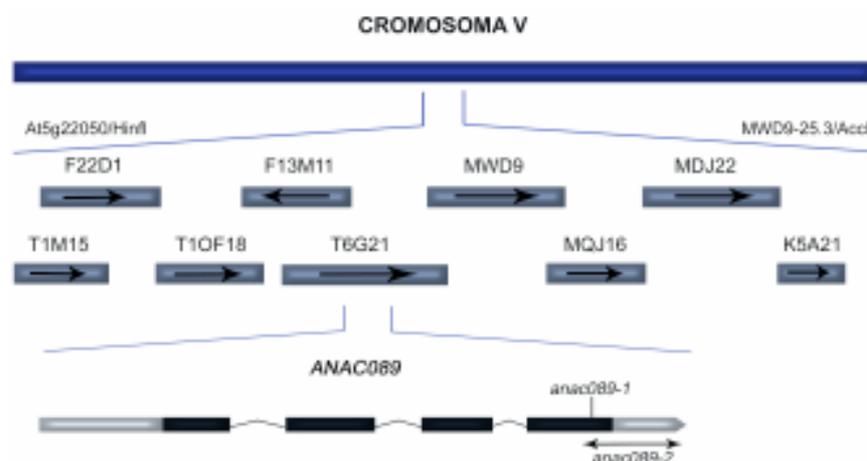
**Tabla R.3. Mutantes seleccionados en el *screening*.** En la búsqueda de mutantes con una sensibilidad reducida a (+)-S-ABA durante la germinación de semillas, se aislaron 7 alelos de *abi3*, 4 alelos de *abi4*, 5 alelos de *abi5*, así como dos mutaciones alélicas.

MUTANTE	AGENTE MUTAGÉNICO	Nº DE ALELOS ENCONTRADOS	GEN MUTADO
<i>abi3</i>	EMS	7	<i>ABI3</i>
<i>abi4</i>	EMS	4	<i>ABI4</i>
<i>abi5</i>	EMS	5	<i>ABI5</i>
<i>mutante1-1</i>	EMS	2	<i>ANAC089</i>
<i>mutante1-2</i>	Fast neutron		

### 5.1. Localización cromosómica de las mutaciones.

La técnica empleada para la localización cromosómica de las dos mutaciones fue la del paseo cromosómico. Para afrontar la cartografía de los genes mutados, se procedió a cruzar ambos mutantes con plantas de un ecotipo distinto (en el caso de la primera mutación se empleó Col-0, mientras que para la segunda se utilizó *Ler*) y de este modo, poder estudiar los polimorfismos existentes entre ambos ecotipos que permitieran acotar la mutación (Materiales y Técnicas, apartado 6.3).

Las dos mutaciones se cartografiaron de modo independiente, empleando respectivamente 376 y 491 plantas de la generación F2 de los cruces correspondientes. Ambas fueron situadas entre los marcadores At5g22050/HinI y MWD9-25.3/AccI y localizadas en el brazo superior del cromosoma V. La secuenciación en los mutantes de los genes candidatos a contener la mutación, reveló que ambas mutaciones afectaban al gen *ANAC089* (At5g22290) (Figura R.42), denominándose a partir de ahora *anac089-1* y *anac089-2*, respectivamente.



**Figura R.42.** Detalle del cromosoma V donde están localizadas las mutaciones *anac089-1* y *anac089-2*. En la figura aparece representado esquemáticamente el gen *ANAC089* y la posición de ambas mutaciones dentro del gen.

## 6. CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA CODIFICADA: ESTUDIO COMPARATIVO Y DOMINIOS FUNCIONALES.

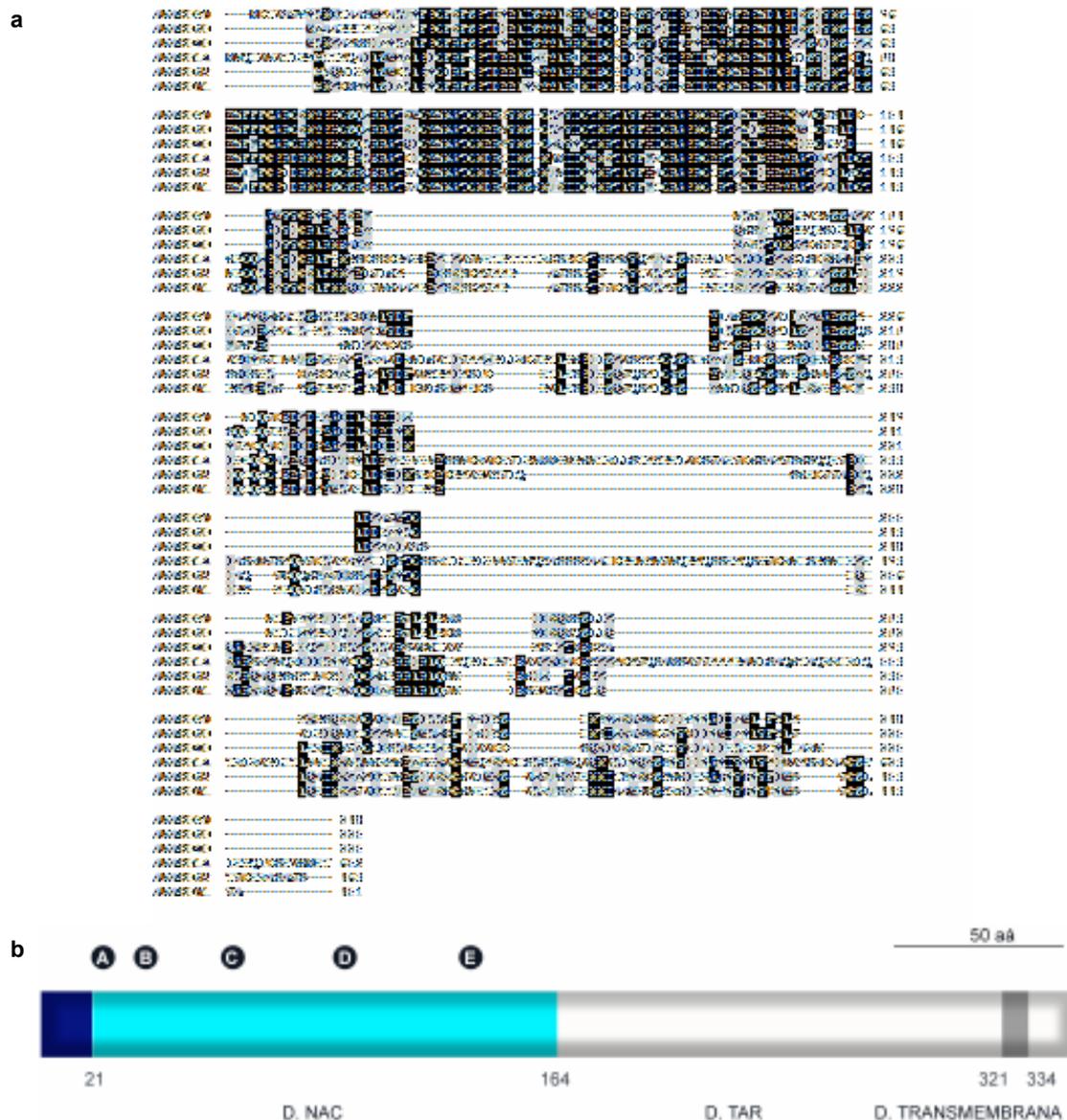
El gen *ANAC089* codifica una proteína de 340 aminoácidos, con un peso molecular de 45.26 kDa y un punto isoeléctrico de 5.2.

*ANAC089* pertenece a una familia de FTs que incluye aproximadamente 105 proteínas cuya característica más importante es la presencia de una secuencia consenso en el extremo N-terminal, denominada dominio NAC (NAM/ATAF/CUC) y que a su vez se subdivide en 5 subdominios (A-E). En el extremo C-terminal se encuentra el dominio de activación transcripcional (TAR), existiendo una gran diversidad en su composición aminoacídica dentro de la familia (Ooka et al., 2003).

El alineamiento de la secuencia aminoacídica de *ANAC089* con otras 5 proteínas de la misma familia (*ANAC060*, *ANAC040*, *ANAC014*, *ANAC062* y *ANAC091*) mostró una elevada homología entre ellas, existiendo una gran similitud dentro del dominio NAC en el extremo N-terminal de las proteínas comparadas (Figura R.43a).

El análisis de la secuencia aminoacídica en la base de datos PlantsP (<http://plantsp.genomics.purdue.edu/html>), reveló la existencia del dominio funcional NAC entre los aminoácidos 21 y 164 del extremo N-terminal de la proteína y una posible región transmembrana entre los aminoácidos 321 y 334 del extremo C-terminal (Figura R.43b). Previamente, mediante ensayos de transactivación se ha podido determinar que el extremo C-terminal de este tipo de FTs es el responsable de la actividad transcripcional de la proteína (Lu et al., 2007; Peng et al., 2009), mientras que ensayos similares realizados en levadura han demostrado que la capacidad de formar dímeros y de unirse al DNA mostrada por estos FTs reside en el dominio NAC (Olsen et al., 2005).

La mutación *anac089-1*, generada por EMS, provocó el cambio del triptófano de la posición 323 por un codón de paro prematuro, mientras que la mutación *anac089-2*, causada por *fast-neutron*, originó una delección en la parte final del gen de unos 700 pb. Por ello, ambas mutaciones pueden potencialmente afectar al dominio TAR en el extremo C-terminal.



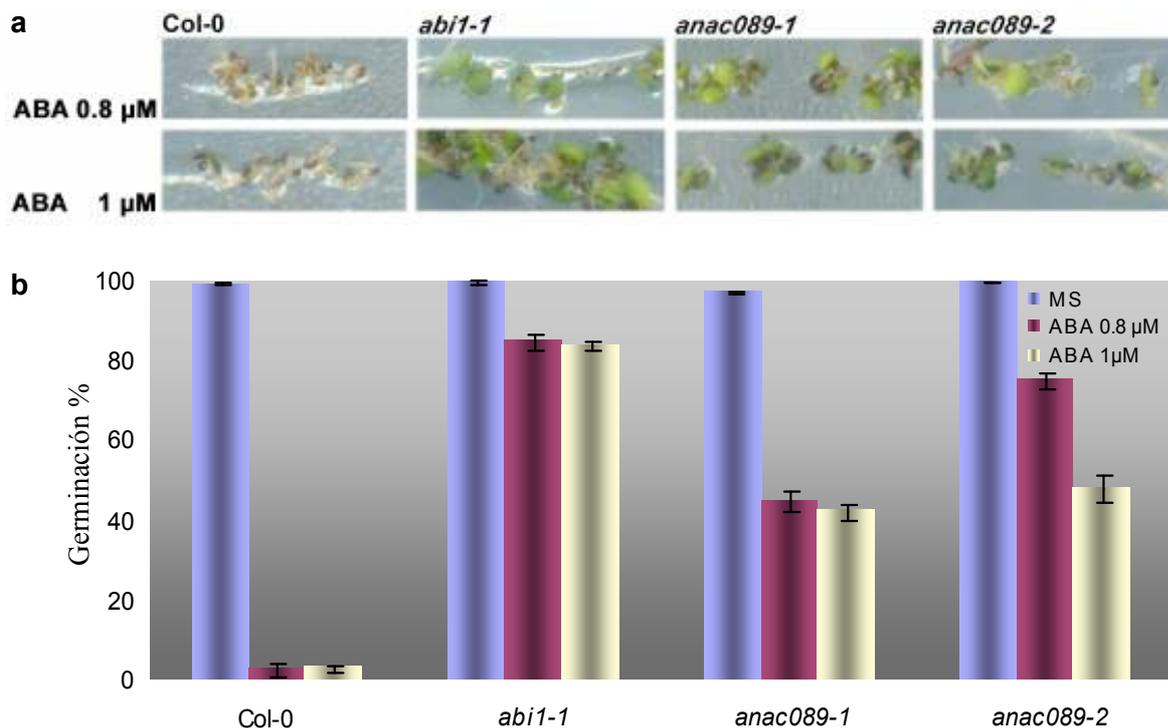
**Figura R.43. Análisis de la proteína ANAC089.** a) Alineamiento de ANAC089 con otras 5 proteínas de la misma familia de FTs de tipo NAC. Los residuos equivalentes entre sí aparecen enmarcados. b) Dominios funcionales de la proteína ANAC089. En la imagen aparece representado el dominio NAC con los 5 subdominios típicos de la familia (A-E). También se muestran el dominio de activación transcripcional (D. TAR) y un potencial dominio transmembrana.

## 7. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL MUTANTE *anac089*.

### 7.1. Análisis de la germinación y el desarrollo temprano en el mutante *anac089*.

Con estos antecedentes, se decidió estudiar el efecto de las mutaciones *anac089-1* y *anac089-2* en las respuestas a ABA durante la germinación y el desarrollo temprano de las plántulas. Para ello se sembraron semillas de ambos mutantes y de los controles Col-0 y *abi1-1* en presencia de concentraciones de ABA inhibitorias de la germinación (ABA 0.8  $\mu$ M y 1  $\mu$ M).

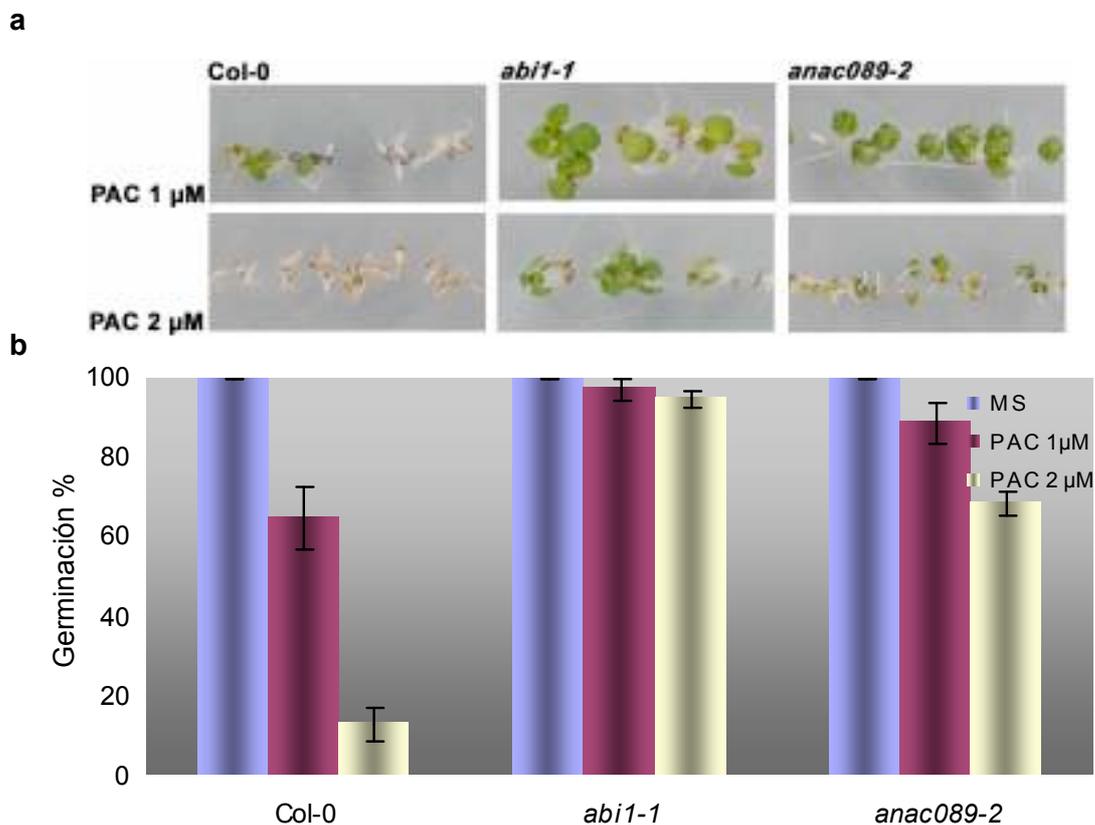
Como se puede observar en la figura R.44, las plántulas del tipo silvestre mostraban la emergencia radicular y el desarrollo de cotiledones verdes parcialmente inhibidos después de 8 días en presencia de ABA 0.8  $\mu\text{M}$ , mientras que en concentraciones de ABA 1  $\mu\text{M}$  la inhibición era total. En el caso del mutante *abi1-1*, la germinación no se vio afectada por la presencia de la hormona. Por su parte, los mutantes *anac089-1* y *anac089-2* eran capaces de germinar en presencia de ambas concentraciones de ABA, mostrando un perfecto desarrollo de raíz y cotiledones verdes muy similar al mutante *abi1-1*.



**Figura R.44. Caracterización de la respuesta a ABA en la germinación de *anac089*.** a) Plántulas de 8 días del tipo silvestre Col-0 y de los mutantes *abi1-1*, *anac089-1* y *anac089-2* sembradas en medio MS y MS suplementado con ABA 0.8  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$ . b) Porcentajes de germinación obtenidos. Los valores de desviación estándar representan el promedio de tres experimentos independientes.

Por otro lado, dada la relación antagonista entre el ABA y las GAs durante la germinación de las semillas, se decidió analizar la germinación del mutante *anac089-2* en presencia de PAC (inhibidor de la síntesis de GAs) con objeto de caracterizar en mayor profundidad el efecto de la mutación durante esta etapa del desarrollo. Para ello, se suplementó medio MS con dos concentraciones de PAC inhibitorias de la germinación y del desarrollo de cotiledones en el tipo silvestre, 1  $\mu\text{M}$  y 2  $\mu\text{M}$ . En la figura R.46 se puede apreciar que el tipo silvestre presentaba un desarrollo muy retrasado en presencia de

PAC 1  $\mu\text{M}$ , mientras que en concentraciones superiores el desarrollo de cotiledones verdes estaba completamente inhibido. Por su parte, los mutantes *abi1-1* y *anac089-2* eran capaces de germinar y desarrollarse en estas condiciones, lo que indica que el mutante *anac089-2* requiere bajos niveles de GAs para germinar.



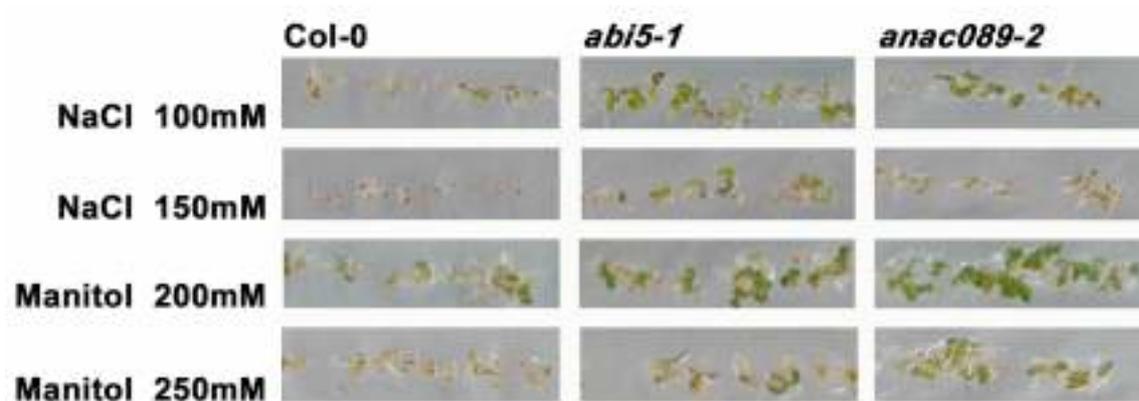
**Figura R.45. Análisis de la germinación en presencia de PAC.** a) Diferencias en la germinación mostradas por semillas Col-0, *abi1-1* y *anac089-2* en placas control (MS) y en presencia de distintas concentraciones de PAC (1  $\mu\text{M}$  y 2  $\mu\text{M}$ ). b) Porcentajes de germinación obtenidos. Los valores de desviación estándar representan el promedio de tres experimentos independientes.

## 7.2. Respuesta a estreses abióticos en el mutante *anac089-2*.

Puesto que el ABA es una de las principales señales implicadas en la regulación frente a estreses abióticos, se decidió comprobar si *anac089-2* presentaba alteraciones en la germinación y los primeros estadios del desarrollo en presencia de altas concentraciones de cloruro sódico (NaCl) y manitol. Para ello, se sembraron semillas del mutante *anac089-2*, Col-0 y en esta ocasión el mutante *abi5-1* como control, en medio MS suplementado con NaCl (100 mM y 150 mM) y manitol (200 mM y 250 mM). En la figura R.46 se aprecia

como las semillas del tipo silvestre Col-0 presentaban inhibida la germinación y el desarrollo temprano de las plántulas en presencia de NaCl y en concentraciones elevadas de manitol, mientras que los mutantes *abi5-1* y *anac089-2* fueron capaces de germinar y de completar el desarrollo en todas estas condiciones de estrés.

Estos resultados ponen de manifiesto la implicación del FT ANAC089 en las respuestas frente a estreses salino y osmótico reguladas por ABA y su posible participación en estas rutas de señalización.



**Figura R.46. Ensayo de germinación en presencia de diferentes tipos de estreses abióticos.** En la imagen se muestran las diferencias en la germinación mostradas por semillas Col-0, *abi5-1* y *anac089-2* en presencia de NaCl (100 mM y 150 mM) y manitol (200 mM y 250 mM) tras 8 días desarrollándose en estas condiciones.

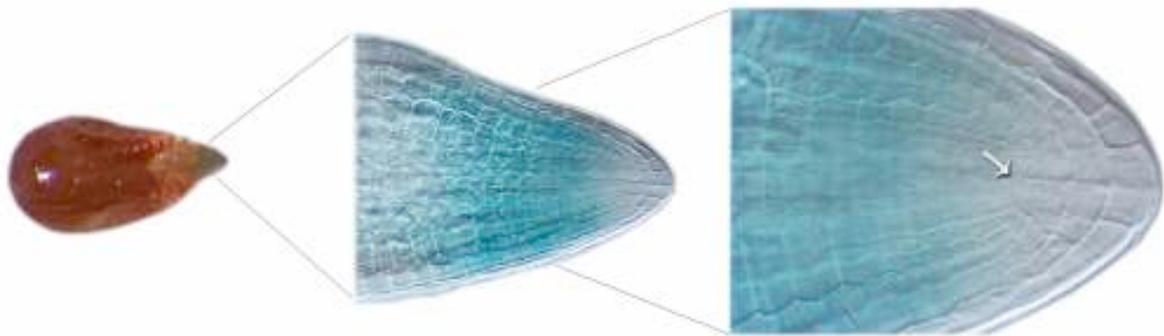
## 8. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ANAC089.

### 8.1. Análisis de la expresión génica de *ANAC089* durante la germinación de semillas.

En primer lugar, se estudió el patrón de expresión génica del gen *ANAC089* durante la germinación de semillas, empleando plantas transgénicas que contenían el promotor del gen *ANAC089* fusionado al gen reportador de la  $\beta$ -glucuronidasa (*proANAC089:GUS*) y realizando el correspondiente ensayo histoquímico de actividad  $\beta$ -glucuronidasa. Para ello, se estratificaron las semillas durante 72 horas y se mantuvieron en imbibición durante 48 horas, tiempo suficiente para que se produzca la emergencia radicular y se llevó a cabo el ensayo de la  $\beta$ -glucuronidasa tal y como se describe en el apartado 7.3 de Materiales y Técnicas.

En la figura R.47 se puede apreciar como en el momento de la emergencia radicular se detectaba expresión del gen reportador en el extremo distal de la raíz. Para llevar a cabo un análisis más detallado de la zona de la raíz en la que se observó expresión GUS, se

sumergieron las semillas germinadas en una solución de cloralhidrato y se analizaron mediante microscopía diferencial de contraste de interferencia (D.I.C.). Los niveles más elevados de expresión del gen *ANAC089* coincidieron con la zona de la raíz donde se produce una mayor tasa de división celular, mientras que apenas se detectó expresión en el centro quiescente, que desempeña un papel fundamental en el desarrollo y organización de los tejidos radiculares y donde la división celular es menos activa.

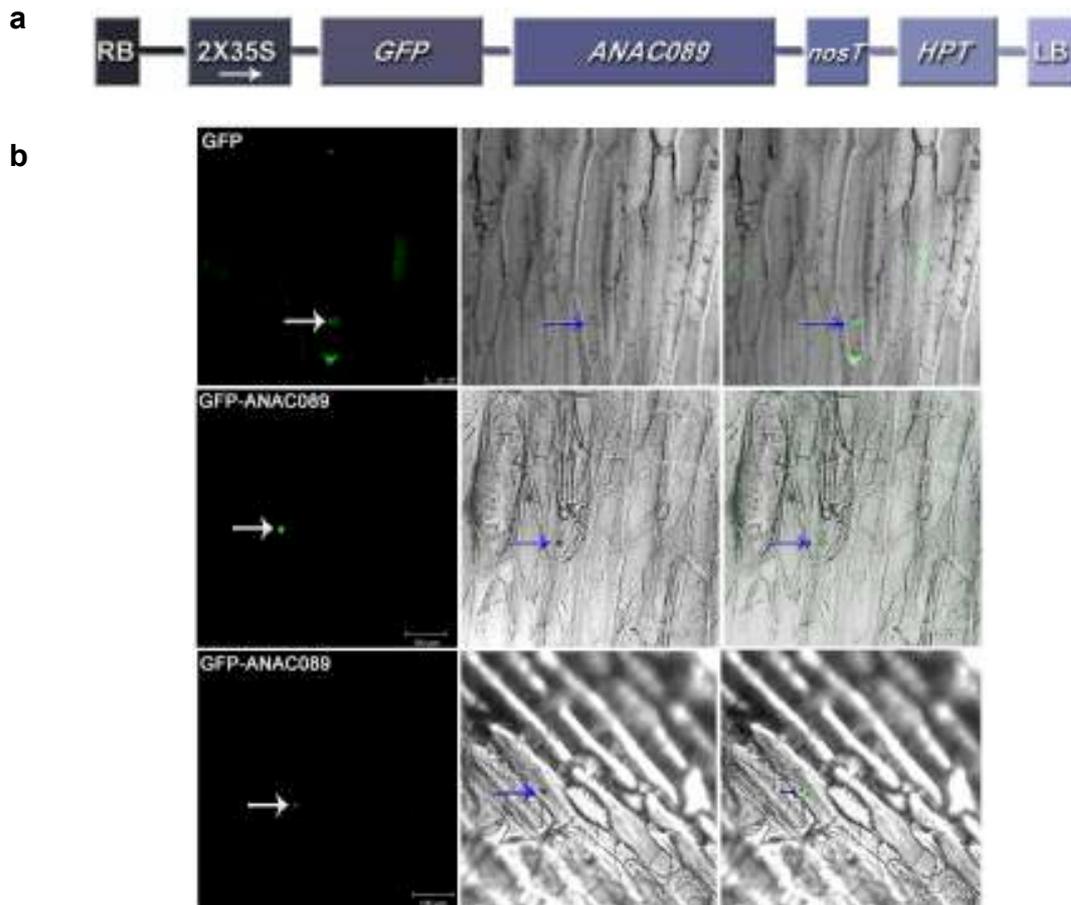


**Figura R.47. Ensayo histoquímico de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa en la línea reportadora *proANAC089:GUS*.** Una vez realizado el ensayo, se eliminaron los pigmentos de los tejidos mediante una solución de cloralhidrato y se visualizaron mediante microscopía D.I.C. La flecha indica ausencia de expresión en el centro quiescente.

## 8.2. Localización subcelular de la proteína ANAC089.

Para demostrar la posible función de la proteína ANAC089 como FT y su correspondiente localización nuclear se estudió la localización subcelular de la proteína ANAC089 *in vivo*, generando proteínas quiméricas mediante fusión de la proteína GFP al extremo amino terminal de la proteína ANAC089 (Figura R.48a), empleando para ello el vector pMDC43, tal y como se describe en el apartado 5.5.2 de Materiales y Técnicas.

Con la construcción *2X35S:GFP:ANAC089* se llevó a cabo la transformación transitoria de células de epidermis de cebolla, empleando la técnica de biobalística (Materiales y Técnicas, apartado 8.1) para analizar la localización subcelular de la proteína ANAC089 (Figura R.48b). El control realizado con la proteína GFP muestra como, a excepción de la gran vacuola central, se distribuye por toda la célula debido a que su pequeño tamaño la permite difundir a través de la membrana nuclear. Por su parte, la proteína ANAC089 fusionada a GFP presenta una localización nuclear exclusivamente, como cabría esperar al tratarse de un FT.



**Figura R.48. Localización subcelular de la proteína ANAC089.** a) Construcción empleada para la transformación transitoria de células de epidermis de cebolla: la región codificante del cDNA de *ANAC089* se fusionó al extremo C-terminal de la proteína GFP empleando el plásmido pMDC43. RB, borde derecho del T-DNA; LB, borde izquierdo del T-DNA; 2X35S, doble promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor; *GFP*, proteína GFP; *nosT*, terminador *NOS*; *HPT*, Higromicina fosfotransferasa. b) Localización subcelular de la proteína ANAC089 mediante biobalística en epidermis de cebolla. El núcleo aparece señalado con una flecha.

### 8.3. Análisis de transactivación y dimerización de ANAC089.

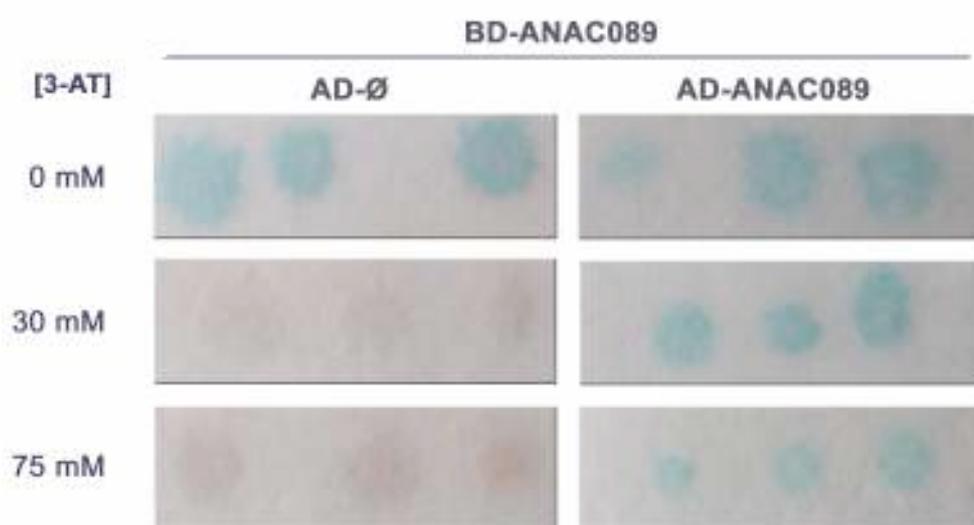
Numerosos procesos biológicos son el resultado de la interacción de varios FTs (revisado en Gilmartin et al., 1990; Weising y Kahl, 1991). En este sentido, un gran número de proteínas de este tipo son capaces de formar homodímeros y heterodímeros para llevar a cabo la regulación de la actividad transcripcional, activándola o reprimiéndola.

Por este motivo, se trató de determinar si el FT ANAC089 era un activador de la transcripción. Para ello, se llevó a cabo un ensayo de transactivación haciendo uso de la técnica de híbrido simple en levadura fusionando la proteína ANAC089 al dominio de unión al DNA (BD) de la proteína GAL4 en el vector pGBKT7. Posteriormente, se llevó a cabo la co-transformación de células de la cepa SFY526 de *S. cerevisiae* con el plásmido BD fusionado a la proteína ANAC089 y el vector vacío que contenía el AD. Una vez seleccionadas

las colonias dobles transformantes, en el medio que presentaba la doble auxotrofia -Leu-Trp, la interacción entre la proteína objeto de estudio y el reportador *LACZ* fue analizada mediante la capacidad de activación de este gen llevando a cabo el ensayo de la  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -Gal) (Materiales y Técnicas, apartado 9.2). De este modo, se pudo detectar actividad  $\beta$ -galactosidasa en las colonias de levadura que habían sido co-transformadas con el plásmido que contenía el BD fusionado a la proteína ANAC089 y con el vector vacío que contenía el AD (Figura R.49), resultado que indicaba que ANAC089 es un activador de la transcripción.

Por otro lado, se ha descrito con anterioridad que algunos FTs tienen la capacidad de formar homodímeros para llevar a cabo la regulación transcripcional. Por ello, se decidió comprobar si ANAC089 era capaz de formar este tipo de complejos para la iniciación de la actividad transcripcional. Con este objetivo, se realizó un ensayo de doble híbrido en levadura mediante transformación de la cepa de *S. cerevisiae* SFY526 con los plásmidos que contenían el BD y el AD fusionados a la proteína. Para suprimir la actividad basal mostrada por ANAC089, se añadieron concentraciones crecientes de 3-aminotriazol (3-AT) al medio con auxotrofías. Así, cuando el medio era suplementado con concentraciones de 3-AT iguales o superiores a 30 mM se suprimía la activación intrínseca de ANAC089. Sin embargo, estas concentraciones resultaron no ser eficientes cuando las colonias de levadura fueron co-transformadas con las fusiones BD-ANAC089 y AD-ANAC089 (Figura R.49).

Estos resultados ponían de manifiesto que la proteína ANAC089 era un potente activador transcripcional con capacidad para formar homodímeros y llevar a cabo la correspondiente regulación transcripcional.



**Figura R.49. Ensayos de transactivación y homodimerización de ANAC089 en levadura.** Las células de levadura fueron co-transformadas con las construcciones BD-ANAC089 y AD-Ø y con BD-ANAC089 y AD-ANAC089 y se crecieron a 28°C. El medio con las auxotrofías -Leu-Trp se suplementó con 3-AT para suprimir la capacidad de activación basal de ANAC089.

#### 8.4. Análisis transcriptómico de la respuesta a aba durante la germinación de semillas en el mutante *anac089-2*.

Para analizar la regulación génica ejercida por este FT en la germinación de semillas, se ha abordado una aproximación genómica basada en el análisis transcriptómico comparado del mutante *anac089-2*, en respuesta a la adición exógena de ABA durante esta etapa del desarrollo, frente a semillas del tipo silvestre Col-0. Para ello, se estratificaron semillas del mutante *anac089-2* y del tipo silvestre Col-0 a 4°C en agua durante 72 horas para eliminar la dormición y posteriormente se añadió ABA 5  $\mu$ M durante 3 horas, manteniéndolas en una cámara de germinación a 22°C. El experimento se realizó por triplicado y se emplearon micromatrices de Arabidopsis ATH1 *GenomeArray* fabricadas por Affymetrix que contienen 22.500 elementos representando a 24.000 loci no redundantes del genoma de Arabidopsis. Los datos fueron analizados como se describe en el apartado 5.14.3 de Materiales y Técnicas.

El conjunto de genes que mostraban una expresión diferencial entre el mutante y el tipo silvestre se clasificó en dos grupos. Por un lado, genes que en el mutante *anac089-2* aparecían reprimidos respecto al tipo silvestre ( $\log_2\text{ratio} \leq -1$ ) y por otro, genes que en el mutante aparecían inducidos en comparación con Col-0 ( $\log_2\text{ratio} \geq 1$ ).

Dentro del primer grupo se incluían 157 genes cuya expresión era, al menos, dos veces menor en el mutante *anac089-2* que en el tipo silvestre Col-0 (Apéndices, tabla A.II), por lo que se trataba de genes cuya expresión en el momento de la imbibición requiere de la función de *ANAC089*. El gen más fuertemente reprimido fue el propio *ANAC089* ( $\log_2\text{ratio} = -5.36$ ), validando de este modo los resultados de este experimento. La mayoría de ellos codificaban proteínas implicadas en diversos aspectos del metabolismo celular (28,3%), entre las que cabe destacar aquellas relacionadas con el almacenamiento de reservas en la semilla, como albúminas (At4g27170) y las codificadas por genes *LEA* (At2g18340, At2g42560). Se sabe que muchos de estos genes están controlados por la acción coordinada de FTs regulados por ABA. En este sentido, muchas de las proteínas incluidas en este grupo participaban en alguna de las respuestas reguladas por ABA (Tabla R.4). Así, apareció representado un gen implicado en la biosíntesis de esta fitohormona (*NCED4*, At4g19170) y proteínas de respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico (temperaturas extremas, elevada salinidad, sequía, etc) como RD29B (*Responsive to Dehydration 29B*, At5g52300), STZ (*Salt Tolerant Zinc Finger*, At1g27730) y ERD5 (*Early Responsive to Dehydration 5*, At3g30775). Se sabe que frente a estas situaciones, la planta responde con un aumento en los niveles de ABA, que a su vez inducen la expresión de estos genes. Además, en el presente estudio transcriptómico se han identificado otros genes implicados en este tipo de respuestas, tales como At2g38905, At3g02480, At2g38340 (gen con dominio DRE2B de respuesta a deshidratación y ABA) y dos

proteínas de respuesta a ABA con función desconocida (At5g13200 y At3g02480).

También aparecían representados genes implicados en las respuestas de defensa frente al ataque de distintos tipos de hongos patógenos, como *PR4* (*Pathogenesis-Related 4*, At3g04720). En este sentido, dos de los genes más fuertemente reprimidos fueron *OPR1* (*OPDA Reductasa 1*, At1g76680) y *OPR4* (*OPDA Reductasa 4*, At1g76680) que participan en la biosíntesis de JA, principal fitohormona reguladora de las respuestas frente a estreses bióticos. En este grupo se incluyeron además genes relacionados con la síntesis (*ACC6*, At4g11280) y la señalización de etileno (At5g25190, At5g65100), hormona también reguladora de este tipo de respuestas. Del mismo modo, se han podido identificar proteínas implicadas en procesos de detoxificación y metabolismo de especies reactivas de oxígeno (ROS) como peroxidases (PER12, At1g71695), glutatión transferasas y nitrilasas como NIT4 (Nitrilasa 4, At5g22300), que mostraba los niveles de expresión más bajos ( $\log_2\text{ratio}=-3.77$ ). La familia de proteínas de las nitrilasas cataliza la hidrólisis de compuestos con grupos nitrilo hasta ácidos carboxílicos y amonios y participa en la síntesis del ácido-3-indolacético (IAA). En este sentido, aparecía representada una proteína que participa en el transporte de auxinas (At2g17500) y diversos genes cuya expresión se induce en presencia de auxinas (At5g50760, At1g4550, At2g22670, At3g16500). Finalmente, se pudo identificar otro FT de la familia de proteínas de tipo NAC (ANAC032, At1g77450) fuertemente reprimido en el mutante, de modo que podría tener un importante papel en la regulación de las respuestas a ABA moduladas por ANAC089.

En el segundo grupo se incluyeron aquellos genes cuya expresión estaba inducida en el mutante al menos dos veces comparada con el tipo silvestre, contabilizándose un total de 169 (Tabla A.III). Se trataba, por lo tanto, de genes regulados negativamente por ANAC089. Un elevado porcentaje (17,2%) participaba en la síntesis de proteínas. La mayoría de estos genes codificaba proteínas ribosomales que participan en la formación y ensamblaje de los ribosomas (At2g40010, At1g27400, At1g60090, At3g56340, At5g16130). También se pudo identificar una histona deacetilasa (At3g44750) con la capacidad de modificar los grupos acetilo de los residuos de lisina de las histonas, neutralizando la carga positiva y aumentando la capacidad de las histonas para unirse al DNA, evitando la expansión de la cromatina y reprimiendo de este modo la transcripción de esa región cromosómica. En el mutante se detectaron altos niveles de expresión de una peroxirredoxina tipo 2 (At1g60740) implicada en procesos de detoxificación de especies de nitrógeno (Rouhier et al., 2005). Por último, aparece representado un número elevado de enzimas implicadas en modificaciones de la pared celular, como pectinoesterasas (At1g11580, At1g47960), diferentes tipos de hidrolasas como glicosil-hidrolasas (At3g18080, At5g20950, At5g61130) y una xiloglucano-endotransglicosilasa (At4g30290).

**Tabla R.4.** Relación de genes de respuesta a ABA identificados en el análisis transcriptómico cuya expresión se encuentra reprimida en el mutante *anac089-2* en comparación con el tipo silvestre Col-0.

AGI ID	<i>anac089-2</i> vs Col-0 (ABA 5 $\mu$ M)	Col-0 vs Mock (ABA 10 $\mu$ M)	DESCRIPCIÓN
At5g22290	-5.36	2.14	ANAC089
At4g39670	-3.32	3.44	Transportador de glicolípidos
At2g44460	-2.38	1.04	Glicosil hidrolasa
At3g22370	-2.19	2.59	AOX1A (Oxidasa Alternativa 1A)
At1g02310	-2.15	2.77	Glicosil hidrolasa
At4g37790	-2.05	1.61	HAT22 (F.P. de malla de lucha)
At5g64310	-1.96	1.17	AGP1 (Arabogalactano 1)
At4g34710	-1.94	1.66	ADC2 (Arginina Descarboxilasa 2)
At2g17500	-1.93	1.73	Transportador de auxinas
At2g46870	-1.93	2.35	CYP76G2 (Citocromo P450)
At3g04010	-1.62	1.65	F.P. glicosilhidrolasa
At1g56600	-1.54	5.45	GOLOS2 (Galectinol sintasa 2)
At5g01600	-1.54	2.18	FER1 (Ferritina 1)
At5g48160	-1.53	1.59	Fundón desaminado
At5g63588	-1.52	1.51	Prot. de respuesta a auxinas
At5g53590	-1.52	1.51	Prot. de respuesta a auxinas
At2g39110	-1.51	3.1	Protein-kinasa
At1g15960	-1.46	1.90	NRAIP6 (Transportador de metales 6)
At3g23920	-1.42	3.58	BAW1 (Beta-amilasa 1)
At4g01070	-1.42	1.25	GTT2B1 (UDP-glucosiltransferasa)
At2g41660	-1.38	2.21	Fundón desaminado
At4g11280	-1.34	1.31	ACS6 (ACC sintasa 6)
At2g38905	-1.33	2.1	Prot. de respuesta a baja T <sup>o</sup> y salinidad
At5g59820	-1.33	1.09	RHL41 (Response to High Light 41)
At1g27730	-1.25	2.02	STE (ET Tolerancia Estrés Salino)
At3g03150	-1.23	1.04	Fundón desaminado
At5g13200	-1.23	3.50	Prot. con dominio GRAV de respuesta a ABA
At5g39520	-1.23	4.02	Fundón desaminado
At4g31550	-1.22	1.08	FWWRKY
At2g36770	-1.2	1.58	FP UDP-glucosil transferasa
At2g36780	-1.2	1.58	FP UDP-glucosil transferasa
At5g62480	-1.19	3.37	GSTU9 (Glutión S-Transferasa 9)
At3g48510	-1.13	3.94	Fundón desaminado
At1g05340	-1.13	4.15	Fundón desaminado
At5g13750	-1.12	1.15	ZIFL1 (Zinc Induced Facilitator-Like 1)
At3g44380	-1.11	1.75	ACD1 (Accelerated Cell Death 1)
At2g22470	-1.1	1.60	AGP2 (Prot. Arabogalactano 2)
At4g21680	-1.1	1.74	ROT (Transportador de Oligopeptidos dependiente de Protones)
At2g28400	-1.09	4.18	Fundón desaminado
At5g52300	-1.09	4.75	RD29B (Prot. de Respuesta a Deshidratación 29B)
At1g77460	-1.09	5.20	ANAC032 (Prot. con dominio NAC 32)
At4g34890	-1.08	1.39	ATXDH1 (Xantina Deshidrogenasa 1)
At4g34900	-1.08	1.39	ATXDH1 (Xantina Deshidrogenasa 1)
At3g02480	-1.08	6.23	Prot. de respuesta a ABA
At4g28580	-1.07	1.15	Prot. de respuesta a estrés
At5g57560	-1.05	2.25	TCH4 (Oligoglucano Endotransglicosilasa 4)
At3g08420	-1.04	1.41	ATG5H (Prot. de unión a microtubulos)
At5g64250	-1.02	1.05	NPO (2-N tripropano Dióxigenasa)
At2g26625	-1.01	3.61	Fundón desaminado
At5g05220	-1.01	3.75	Fundón desaminado
At2g18700	-1	2.35	TRF11 (Trehalosa Fosfatasa/Sintasa 11)

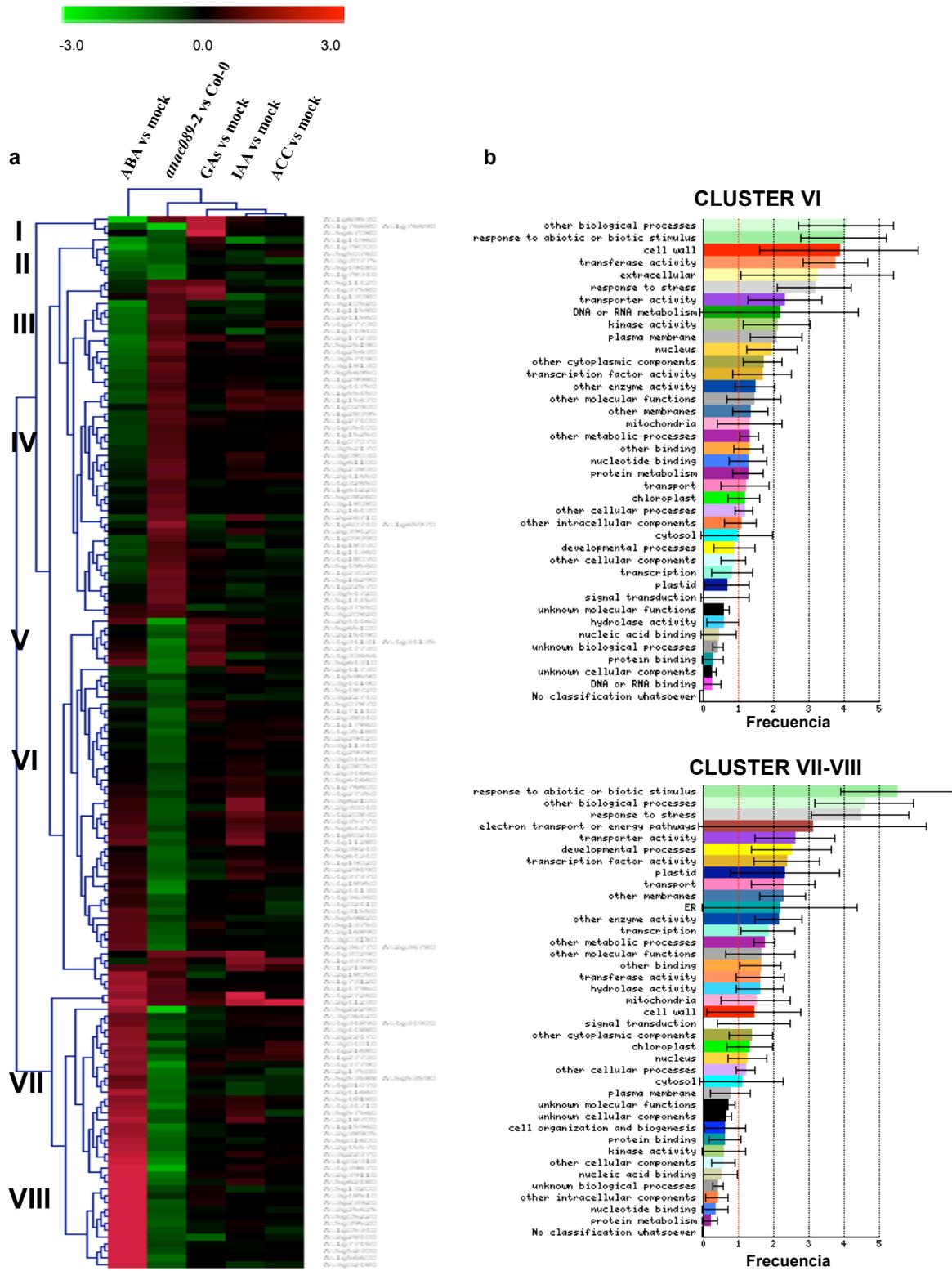
#### 8.4.1. Meta-análisis de genes dependientes de ABA y otras hormonas vegetales.

A continuación, se abordó el estudio de posibles interacciones entre rutas de señalización hormonal y el FT ANAC089 para obtener, de este modo, una mayor información de la regulación por otras hormonas de los genes que aparecían expresados diferencialmente en el mutante respecto al tipo silvestre. Para ello, se llevó a cabo un meta-análisis mediante el agrupamiento jerárquico de aquellos genes diferencialmente expresados en el presente estudio transcriptómico y que aparecieran regulados en al menos uno de los análisis de expresión realizados en tratamientos en el tipo silvestre con ABA, GAs, IAA y ACC presentes en la base de datos *ATGenExpress* (Figura R.50). Los genes fueron incluidos en ocho grupos en función de la semejanza en los niveles de expresión mostrada en respuesta a estos tratamientos, para lo cual se consideró la distancia Euclídea y un vínculo total (Materiales y Técnicas, apartado 5.14.3).

Como puede observarse en la figura R.50, en los grupos VII y VIII se encontraban genes con bajos niveles de expresión en el mutante *anac089-2* y regulados positivamente en el tipo silvestre en respuesta a ABA. La mayor parte de estos genes codificaban proteínas implicadas en la regulación de las respuestas frente a estreses bióticos y abióticos, como demuestran 2 de las 3 categorías funcionales. Así, en este grupo se encontraron *RD29B* (At5g52300) y *STZ* (*Salt tolerante Zinc Finger*, At1g27730), ambos implicados en procesos de defensa ante situaciones deficitarias de agua (Figura R.50).

Por su parte, dentro del grupo VI también encontramos genes reprimidos en el mutante *anac089-2*, pero en esta ocasión su expresión en respuesta ABA es nula o ligeramente diferencial. En cualquier caso, la mayoría de los genes correspondientes también pertenecen a respuestas a estímulos bióticos, abióticos y otros procesos biológicos.

Todos estos resultados sugieren la importancia del FT ANAC089 en la regulación de la expresión génica de procesos de estrés, tanto abiótico como biótico, y más concretamente de genes de respuesta a ABA en la germinación y primeros estadios del desarrollo vegetal.



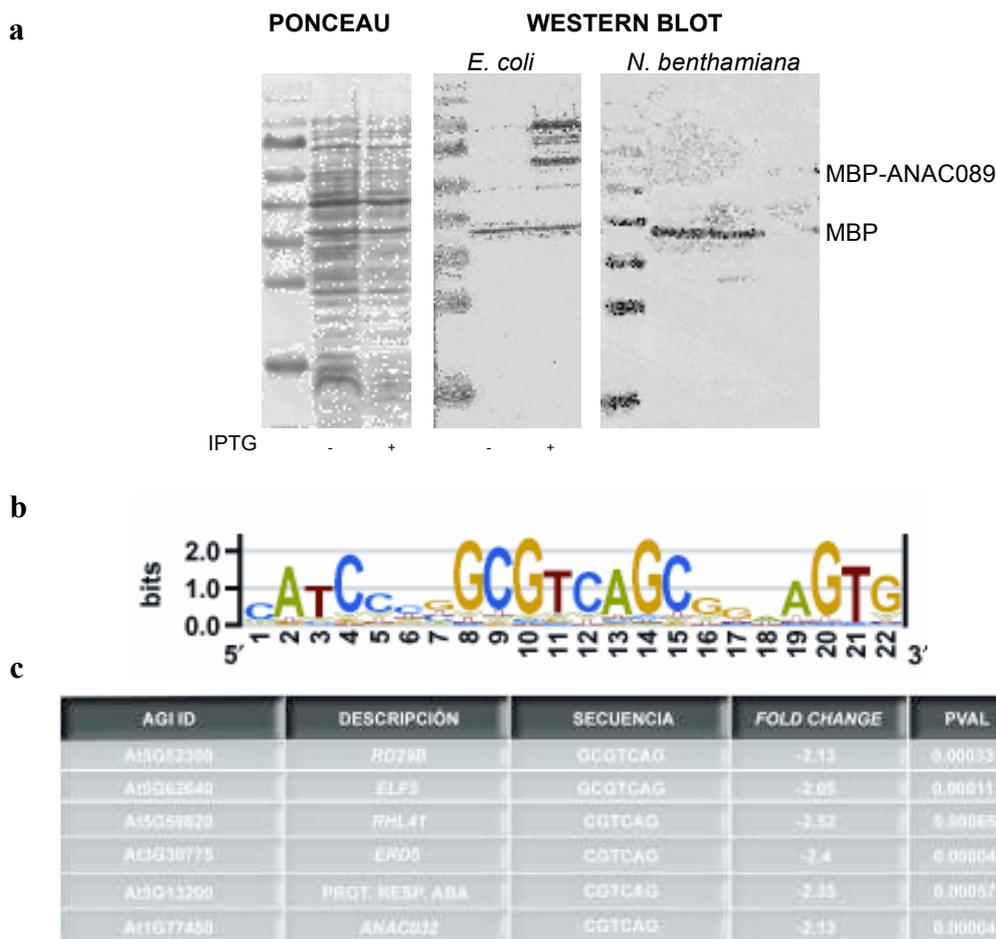
**Figura R.50. Meta-análisis de genes regulados en *anac089-2* y su implicación en las rutas de señalización de ABA, GAs, Auxinas y Etileno.** a) Análisis jerárquico: de los 326 genes con expresión diferencial entre el mutante *anac089-2* y Col-0, 152 respondían a alguno de los tratamientos hormonales analizados. Los genes (filas) y los experimentos (columnas) fueron agrupados con la aplicación TIGR *multi-experiment*. El color verde representa represión y el rojo inducción. b) Clasificación funcional: en la imagen superior aparecen los genes correspondientes al cluster VI y en la inferior los genes del cluster VII y VIII.

#### 8.4.2. Búsqueda de elementos reguladores *cis* reconocidos por ANAC089.

Finalmente, para estudiar de una forma precisa los mecanismos de regulación transcripcional llevados a cabo por el FT ANAC089, se llevó a cabo la búsqueda de elementos reguladores *cis* presentes en genes regulados por ANAC089. Para ello, se estableció una colaboración con el grupo de investigación del Dr. Roberto Solano (CNB-CSIC), quien previamente había implementado el diseño de un microarray que contenía aproximadamente 167.000 sondas representando todas las posibles combinaciones de 11 nucleótidos (Godoy et al., 2010). En primer lugar, se llevó a cabo la fusión N-terminal de la proteína ANAC089 a la proteína de unión a maltosa (MBP), previamente clonada en el vector plasmídico pMGWA. La proteína fusión MBP-ANAC089 fue sobreexpresada en presencia de isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido (IPTG), tanto en *E. coli* como en *N. benthamiana*, empleando el vector vacío como control (Figura R.51a). Posteriormente, el extracto proteico obtenido mediante sobreexpresión de la proteína recombinante ANAC089-MBP en *N. benthamiana*, llevada a cabo por el grupo de investigación del Dr. Pablo Vera (IBMCP-CSIC, Valencia), fue hibridado con dicho array, obteniéndose que la proteína ANAC089 era capaz de unirse con mayor frecuencia a la secuencia GCGTCAGC que aparece en la figura R.51b.

El análisis de la región promotora de los genes estudiados en el análisis transcriptómico, reveló la presencia de la secuencia de 7 nucleótidos GCGTCAG en los genes *RD29B* y *ELF5* (*Early Flowering 5*, At5g62640) y la secuencia de 6 nucleótidos CGTCAG en la región promotora de los genes *ERD5*, *RHL41* (*Responsive to High Light 41*, At5g59820), *ANAC032* (At1g77450) y de un gen que codifica una proteína de respuesta a ABA con dominio GRAM (At5g13200) (Figura R.51b). Todos ellos, que aparecían representados en el grupo de genes reprimidos en el estudio del perfil transcriptómico del mutante *anac089-2* realizado en el presente trabajo (Tablas R.4 y A.II).

En conjunto, los resultados obtenidos ponen de manifiesto la implicación directa de ANAC089 en la regulación de diversos genes implicados en las respuestas frente a estrés abiótico moduladas por ABA a través de su unión a la caja *cis* consenso GCGTCAGC presente en sus regiones reguladoras.



**Figura R.51. Elemento regulador *cis* consenso reconocido por ANAC089.** a) Expresión de la proteína recombinante MPB-ANAC089 en *E. coli* y en *N. benthamiana*. b) Secuencia nucleotídica a la que ANAC089 se unía con una mayor frecuencia. c) Genes con expresión diferencial encontrados en el presente perfil transcriptómico relacionado con las respuestas a ABA o estrés abiótico y que contenían una secuencia *cis* de unión a ANAC089 en sus promotores.

# Discusión

Discusión





## 1. DISCUSIÓN GENERAL

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

Es bien conocido que la germinación es una de las etapas del desarrollo más profundamente influenciada por la acción de las hormonas vegetales. De todas ellas, son las giberelinas (GAs) las que desarrollan un papel esencial en la regulación positiva de la germinación en *Arabidopsis thaliana* (Davies et al., 1985). En este sentido, otras hormonas como el etileno (ET) y los brasinosteroides (BRs) también participan en el control positivo de la germinación (Gazzarrini y McCourt, 2003; Li et al., 2007). Por el contrario, la germinación está influenciada de modo negativo principalmente por el ácido abscísico (ABA), aunque otros reguladores del crecimiento como los jasmonatos (JAs) y las respuestas a estrés, también la afectan de forma negativa (Staswick et al., 1992; Leung y Giraudat, 1998).

Los procesos de fosforilación/desfosforilación de proteínas y la activación transcripcional son esenciales en las rutas de transducción de señales hormonales y más concretamente, en la señalización de ABA y JAs (Trewavas et al., 1988; Schweighofer et al., 2004, 2008).

Por otro lado, se sabe que las hormonas no actúan en rutas de señalización independientes, sino que presentan complejas rutas de interacción entre ellas en la regulación de los procesos del desarrollo vegetal, de modo que el balance final de estas interacciones es el que determina las respuestas específicas al estímulo inicial (Lorenzo y Solano, 2005).

Todo ello pone de manifiesto que la germinación de las semillas está regulada por una intrincada red de señalización hormonal, en la que las hormonas interactúan entre sí a través de relaciones positivas y/o negativas. Sin embargo, se desconocen en gran medida los mecanismos moleculares que gobiernan esta interacción durante la germinación y el comienzo del desarrollo y que en última instancia, permiten a la planta controlar la expresión génica.

## 2. INTERACCIONES ENTRE LA SEÑALIZACIÓN DE ABA Y JAs EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE *Arabidopsis thaliana*.

Los estudios realizados en esta memoria comenzaron comprobando los efectos del ABA y los JAs sobre la germinación de semillas de *Arabidopsis* (Figuras R.1, R.2 y R.3). Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que bajas concentraciones de ABA (0.5  $\mu\text{M}$ ) retrasan la germinación de semillas del tipo silvestre Col-0, mientras que concentraciones más elevadas (3  $\mu\text{M}$ ) inhiben por completo el desarrollo de raíces y cotiledones verdes en Col-0 (Figura R.4), lo que coincide con lo observado por otros autores con anterioridad (Leung y Giraudat, 1998; Finkelstein y Lynch, 2000). Este efecto negativo del ABA sobre la germinación de semillas es debido, en gran medida, a la inhibición de la síntesis de RNAs y proteínas relacionadas con esta etapa del desarrollo (Dommes y Northcote, 1985; Rodríguez et al., 1985). En este sentido, se ha demostrado que el metabolismo del RNA es esencial para que se desencadenen las respuestas a ABA, de modo que a través de su procesamiento, incluido el transporte desde el núcleo hasta el citoplasma y su degradación, puede ser regulado el nivel de componentes específicos de la señalización, controlando así la transducción de su señal (Hugouvieux, et al., 2001; Xiong et al., 2001; Himmelbach et al., 2002; Nemhauser et al., 2006).

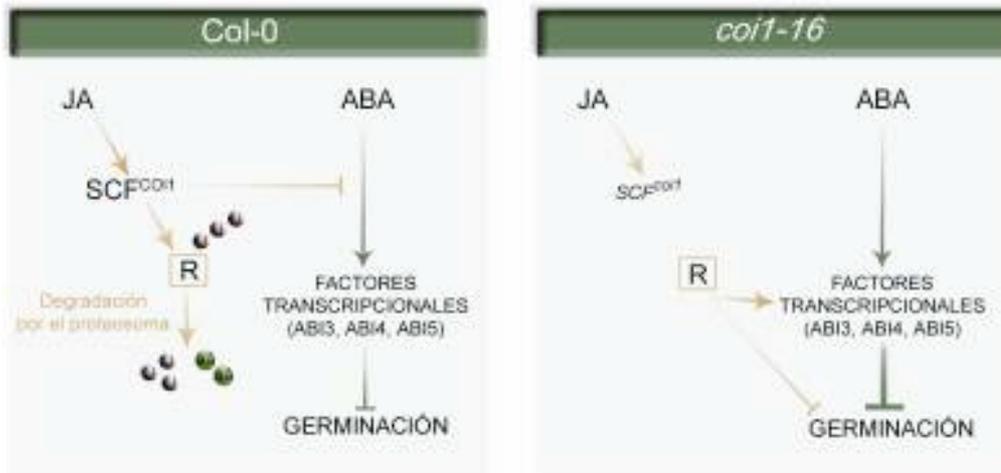
A partir de estos resultados, nos propusimos comenzar un estudio en profundidad de la interacción ABA-JA durante la germinación. Para ello, hemos analizado la respuesta a ABA de los mutantes insensibles a JA *coi1-16* (proteína F-box componente de complejos SCF implicada en la percepción de la hormona) y *jar1-1* (proteína que activa la molécula de JA por adenilación con restos de Ile) durante esta fase del desarrollo, observando que los índices de germinación (entendida como emergencia radicular y desarrollo de cotiledones verdes) disminuyen incluso en bajas concentraciones de ABA, demostrando ser hipersensibles a esta hormona (Figura R.2). En trabajos anteriores llevados a cabo con estos y otros mutantes, que presentan alterada la ruta de señalización del JA en alguna de sus fases, se han obtenido resultados similares (Staswick et al., 1992; Berger et al., 1996), lo que sugiere la existencia de interacciones negativas entre ambas hormonas en la regulación de la germinación de semillas.

El efecto de la adición conjunta de ambas hormonas durante la germinación se ha estudiado empleando mutantes insensibles a JA (*coi1-16*), mutantes insensibles a ABA (*abi1-1*) y el tipo silvestre Col-0 (Figura R.3), observándose que la germinación del tipo silvestre Col-0 está más inhibida al añadir ambas hormonas simultáneamente que únicamente con ABA. En el caso del mutante *coi1-16*, la inhibición de la germinación no aumenta al añadir ambas hormonas conjuntamente (debido a su insensibilidad a JA), por lo que únicamente el ABA actúa en este sentido. Por último, en el mutante *abi1-1*, insensible a ABA, la germinación no se

ve alterada al añadir las hormonas juntas o por separado, si bien, se observa un manifiesto retraso en el desarrollo temprano de la plántula con una fuerte inhibición de la elongación de la radícula y acumulación de antocianinas en los cotiledones a medida que aumenta la concentración de JA. Todo ello indica en primer lugar, que el JA por sí solo o en bajas concentraciones no inhibe la germinación de semillas en *Arabidopsis*, sino que potencia la acción del ABA en la inhibición de la germinación de semillas en el tipo silvestre Col-0. En segundo lugar, se establece una interacción negativa entre ambas hormonas en la regulación de la germinación, como demuestra la hipersensibilidad a ABA del mutante *coi1-16*. Esta segunda observación, junto con la identificación de COI1 como una proteína F-box que forma parte del complejo receptor SCF<sup>COI1</sup> y la existencia de represores que son degradados por el proteosoma para que se produzcan las respuestas a JAs (Chini et al., 2007, 2009; Thines et al., 2007; Pauwels et al., 2010), sugiere la existencia de un hipotético represor de la germinación que es degradado por el proteosoma vía COI1 en respuesta a JA para que tal interacción fuera posible.

Estudios previos, corroboran la compleja relación entre el ABA y el JA durante la germinación de semillas en *Arabidopsis* (Ellis y Tumer, 2002). En ellos, analizan esta interacción en el tipo silvestre Col-0 y el mutante *coi1-16*, revelando que ambas hormonas establecen interacciones positivas y negativas en la regulación de esta etapa del desarrollo. Sin embargo, todavía no se ha propuesto ningún modelo molecular que explique tal interacción.

A partir de los resultados obtenidos en nuestros ensayos, hemos elaborado un esquema hipotético donde se muestran las interacciones existentes entre las rutas de señalización de ABA y JA durante la germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana* (Figura D.1). El ABA inhibiría la germinación de semillas a través de la regulación de genes específicos de respuesta a ABA por medio de factores de transcripción (FTs) como ABI3, ABI4 y ABI5. Por su parte, la ruta de señalización del JA presentaría interacciones positivas y negativas con el ABA durante la germinación. Por un lado, presentaría fuertes interacciones sinérgicas con el ABA en la inhibición de la germinación del tipo silvestre Col-0, mientras que por otra parte, la interacción negativa viene determinada por la hipersensibilidad del mutante *coi1-16* en presencia de bajas concentraciones de ABA, debida al bloqueo de la vía de degradación de proteínas por el proteosoma, donde un hipotético represor o complejo represor de la germinación sería funcionalmente activo. Esto coincide con el descubrimiento de las proteínas NINJA y AFP, implicadas en la formación de complejos reguladores de la transcripción de genes de respuesta a JAs y a ABA, respectivamente. Ambas comparten secuencias aminoacídicas como el dominio EAR, responsable de la interacción con el co-represor TOPLESS (TPL), presente en las respuestas a ABA y JAs, reforzando la hipótesis de que ambas rutas podrían compartir elementos comunes en su señalización (Pauwels et al., 2010).



**Figura D.1. Modelo hipotético de la interacción entre el ABA y el JA durante la germinación de semillas.** Un posible represor (R), componente de la ruta del JA, actuaría en el mutante *coi1-16* inhibiendo la germinación.

### 3. APROXIMACIONES GENÉTICAS PARA LA BÚSQUEDA DE MUTANTES AFECTADOS EN LA SEÑALIZACIÓN DE ABA.

Muchos de los procesos fisiológicos y moleculares que tienen lugar en las semillas, en especial aquellos relacionados con la germinación, no están suficientemente aclarados. En este sentido, varias sustancias reguladoras del crecimiento actúan como moléculas señalizadoras en la germinación de semillas y entre ellas, el ABA, ha sido una de las más estudiadas. En la actualidad, ya se han identificado algunos intermediarios de la biosíntesis, percepción y señalización del ABA, si bien, se desconoce el itinerario completo de la ruta de señalización de esta fitohormona. Con el objetivo de profundizar en el conocimiento de los mecanismos implicados en la señalización del ABA durante la germinación de semillas, y dado el papel principal que desempeña en esta etapa del desarrollo, se decidió afrontar una búsqueda de mutantes afectados en la respuesta a ABA durante la germinación. Como ya se ha demostrado con anterioridad, la adición exógena de ABA inhibe la germinación en el tipo silvestre Col-0 (Figuras R.1, R.2 y R.4), por lo que mutaciones que modifican las respuestas a ABA durante esta etapa del desarrollo pueden ser claramente identificadas. De este modo, se han llevado a cabo con anterioridad diversas búsquedas de mutantes que tienen alterada su respuesta a ABA durante la germinación (Koornneef et al., 1984; Meyer et al., 1994), basándose para ello en la mutagénesis de semillas de tipo silvestre (Col-0 y *Ler*), en las que se fueron aislando los mutantes *abi* (*ABA insensitive*) conocidos hasta la fecha, *abi1*, *abi2*, *abi3*, *abi4*, *abi5* y *abi8* (Giraudat et al., 1992; Leung et al., 1994, 1997; Finkelstein et al., 1998; Brocard-Gifford et al., 2004). En este tipo de búsquedas, únicamente se han aislado mutantes con fenotipos muy

marcados de insensibilidad a ABA, de modo que no ha sido posible detectar mutantes con fenotipos intermedios perdiendo así la posibilidad de obtener un mayor número de genes implicados en la señalización del ABA.

Con el fin de encontrar nuevos mutantes con distintos grados de insensibilidad a ABA durante la germinación de semillas e identificar nuevos intermediarios de su ruta de transducción, decidimos emplear dos estrategias diferentes.

La primera aproximación experimental consistió en la mutagénesis de un fondo genético hipersensible a ABA. Después de estudiar las respuestas a esta hormona en diversos mutantes durante la germinación (Figura R.2), concluimos que el fondo genético hipersensible a ABA más adecuado para afrontar este trabajo era *coi1-16* por presentar hipersensibilidad en presencia de concentraciones bajas de la hormona (0.5  $\mu\text{M}$ ), resultados muy reproducibles y ser el único alelo del mutante *coi1* capaz de producir un número de semillas suficiente para poder afrontar este estudio.

Trabajos llevados a cabo con anterioridad, demuestran que la utilización de un fondo genético hipersensible a una hormona (ABA en nuestro caso), ha resultado ser un mecanismo óptimo para la selección positiva de mutantes afectados en la sensibilidad a esta hormona. Siguiendo este planteamiento, Lorenzo et al. (2004) llevaron a cabo la mutagénesis de una población de semillas del mutante *ein3-3* (*ethylene insensitive 3*), hipersensible al acortamiento de la raíz mediada por JA, para afrontar una búsqueda de mutantes insensibles a esta hormona.

En otras búsquedas de mutantes resistentes a la inhibición de la germinación mediada por ABA realizadas previamente, se han empleado concentraciones altas de la hormona (3  $\mu\text{M}$ ) de modo que únicamente se han podido aislar mutantes con fenotipos fuertes de insensibilidad. Por ello, decidimos analizar la emergencia radicular y el desarrollo de cotiledones verdes en presencia de bajas concentraciones de ABA (0.5  $\mu\text{M}$ ) como criterio conjunto para la selección de mutantes alterados en su respuesta a la hormona (Figura R.4), lo que nos permitió identificar fenotipos de insensibilidad a ABA intermedios entre *abil-1* y el tipo silvestre Col-0.

En la primera etapa del *screening* que se expone en esta memoria, hemos aislado 76 posibles mutantes que presentan una respuesta a ABA reducida respecto a su fondo genético *coi1-16* y en muchas ocasiones, también respecto al tipo silvestre Col-0 (Figura R.5 y Tabla R.1). Los estudios fenotípicos realizados con estos mutantes denominados *cra* (*coi1 resistant to ABA*), permiten diferenciar distintos grados de sensibilidad a la hormona, y en consecuencia, distintos fenotipos. De este modo, hemos establecido tres clases fenotípicas (Figura R.4) claramente diferenciadas en las que hemos incluido los mutantes seleccionados: fenotipo “R” (raíz), fenotipo “GD” (retraso en el desarrollo) y fenotipo “S” (supresor) (Figura R.6).

De todos los mutantes aislados, decidimos comenzar la caracterización de siete de ellos, por mostrar claros fenotipos de insensibilidad a la hormona y representar a cada una de las tres clases fenotípicas establecidas *cra1* (fenotipo R), *cra2-1*, *cra2-2*, *cra2-3* y *cra2-4* (fenotipos GD y S), *cra3* (fenotipo S) y *cra4* (fenotipo R).

Mediante clonaje posicional, la mutación *cra3* ha quedado localizada en el brazo superior del cromosoma III (Figuras R.7 y R.8), región en la que también se encuentra la mutación *abi3* que provoca insensibilidad a ABA. Mediante los correspondientes test de alelismo y complementación con los mutantes *abi3-1* y *abi3-6* hemos podido concluir que la mutación *cra3* afecta al gen *ABI3* (Figura R.9). La posterior amplificación del gen *ABI3* en el mutante *cra3* utilizando oligonucleótidos específicos, nos ha permitido determinar que la mutación *cra3* consiste en un cambio de G por A, dando lugar a la formación de un codón de paro prematuro, que en la proteína afecta al aminoácido triptófano (Trp, W) de la posición 562.

*ABI3* codifica un FT de unión a DNA implicado en el desarrollo de plastidios y dormición de yemas, y adicionalmente interactúa con genes implicados en los procesos de regulación mediados por la luz (Rohde et al., 2000, 2002). Presenta cuatro dominios aminoacídicos altamente conservados: A1 (dominio en el extremo ácido N-terminal de la proteína) y tres regiones básicas B1, B2 y B3 (Giraudat et al., 1992). El dominio B1 es el responsable de las interacciones proteína-proteína con ABI5, mientras que los dominios B2 y B3 permiten su unión a DNA (Nakamura et al., 2001). El dominio B3 de unión a DNA es único entre las plantas y está conservado en algunas familias génicas. La mutación *cra3* provoca la pérdida del dominio B3 casi en su totalidad, lo que disminuye su capacidad de unión al DNA impidiendo la correcta transcripción de los genes de respuesta a ABA. Sin embargo, la detección de bajos niveles de expresión en el mutante (Figura R.10), indican que la posible proteína mutada conservaría parte de su actividad transcripcional.

La cartografía de los 4 mutantes *cra2* ha situado las mutaciones entre los marcadores nga1126 y AtBIO2 del cromosoma II (Figura R.11), donde también se localiza el gen *ABI4*, que codifica un factor transcripcional implicado en la regulación de distintos procesos del desarrollo en plantas controlados por ABA, tales como la germinación de semillas y las respuestas a estreses abióticos (Fernández et al., 2008). Por esta razón, se procedió a afrontar la misma estrategia seguida para la identificación del mutante *cra3*, de modo que los test de alelismo y complementación realizados entre los 4 mutantes y *abi4-1* han confirmado que las mutaciones afectaban al gen *ABI4* (Figura R.12). La amplificación de este gen en los mutantes nos ha permitido determinar que la mutagénesis con EMS provocó en todos ellos el mismo cambio de G por A, formándose un nuevo codón de paro prematuro en el nucleótido 188, dando lugar a una posible proteína de 62 aminoácidos. Esta hipotética proteína ABI4 truncada,

carece casi por completo del dominio AP2-ERF localizado entre los aminoácidos 54 y 111, necesario para que se produzca la unión a la secuencia *cis* GCC-box del DNA presente en genes de respuesta a ABA (Hao et al., 1998), perdiendo de este modo su capacidad de unión a la región promotora de genes de respuesta ABA.

Por su parte, la cartografía del mutante *cra4* ha permitido acotar la mutación en una región del cromosoma IV (Figura R.13) en la que también se localiza *ABII*, que codifica una PP2C del tipo A implicada en la regulación negativa de las respuestas mediadas por ABA. Mediante la secuenciación del gen *ABII* en el mutante *cra4* hemos identificado una única mutación en la posición 539 de la secuencia nucleotídica consistente en un cambio de G por A, lo que provoca la sustitución del aminoácido G180 (glicina) por D (ácido aspártico) en la proteína mutada.

La cartografía del último de los mutantes seleccionados, *cra1*, ha situado la mutación entre los marcadores JV18/19 y AthZFPG del cromosoma I (Figura R.14). Un análisis de los genes localizados entre ambos marcadores ha permitido identificar entre ellos a *HAB2*, que también codifica una PP2C del grupo A, presumiblemente implicada en la transducción de la señal del ABA. Puesto que este gen es candidato a contener la mutación, hemos amplificado *HAB2* en el mutante, observándose la existencia de una única mutación consistente en un cambio de A por G en la posición 734 de la secuencia nucleotídica, dando lugar a una proteína que presenta la sustitución de la G245 por E (ácido glutámico).

La identificación de mutantes insensibles a ABA como *abi1-1*, *abi3* y *abi4*, aislados anteriormente en otras búsquedas de mutantes que presentan una respuesta a la hormona disminuida (Koornneef et al., 1984; Giraudat et al., 1992; Nambara et al., 2002), así como de la PP2C del grupo A *HAB2*, demuestran que la estrategia y las condiciones utilizadas en nuestro trabajo para llevar a cabo la identificación de mutantes afectados en la señalización del ABA han sido apropiadas.

La segunda aproximación empleada en este trabajo, se ha basado en la utilización específica de uno de los enantiómeros de la molécula de ABA. La isomería óptica del ABA es debida al carbono situado en la posición 1'. La mayor parte de los estudios fisiológicos que analizan los efectos de esta hormona emplean una mezcla 1:1 de los enantiómeros (+)-*S*-ABA y (-)-*R*-ABA. Solamente un limitado número de estudios han llevado a cabo análisis comparativos de la actividad biológica de ambas moléculas, demostrando la importancia de la estructura sobre su actividad y observándose diferencias, tanto en su percepción como en la señalización al usar el enantiómero natural (+)-*S*-ABA o el artificial (-)-*R*-ABA (Walker-Simmons et al., 1994). Ambos han demostrado ser igualmente efectivos como inhibidores de la

germinación en trigo (Walker-Simmons et al., 1992), pero no en la inducción del cierre estomático (Sondheimer et al., 1971) o en la regulación de la expresión génica (Walker-Simmons et al., 1992; Wilen et al., 1993). El hecho de que estos enantiómeros presenten, en ocasiones, actividades equivalentes, sugiere que la planta posee mecanismos que permiten que el isómero (-)-*R*-ABA mimetice los efectos de la hormona natural (Ueno et al., 2007). Sin embargo, el enantiómero (-)-*R*-ABA ha resultado ser menos efectivo en la inhibición del crecimiento de la raíz en cebada (Cummins et al., 1973), y si bien es percibido por semillas de los ecotipos Col-0 y *Ler* de *Arabidopsis* durante la germinación, no es tan efectivo durante la inhibición de esta etapa del desarrollo como el (+)-*S*-ABA, siendo necesaria una mayor concentración para lograr efectos represores similares (Nambara et al., 2002). Otros estudios han abordado el metabolismo de ambos enantiómeros, observándose que (-)-*R*-ABA es más persistente en cultivos celulares de *Bromus inermis* Leyss (Abrams et al., 1989), mientras que la toma de (-)-*R*-ABA y (+)-*S*-ABA en embriones de girasol es muy semejante (Barthe et al., 1991). Por otra parte, sí se han observado diferencias, en este sentido, en fragmentos de raíz de judía (Milborrow et al., 1985). Además, el (+)-*S*-ABA se metaboliza más rápidamente que el (-)-*R*-ABA dando lugar a metabolitos diferentes (Mertens et al., 1982; Barthe et al., 1991). Por otro lado, se ha encontrado especificidad por el enantiómero (+)-*S*-ABA en algunas proteínas de unión a ABA, de modo que la enzima ABA-8'-hidroxilasa (Kushiro et al., 2004) o las proteínas FCA, ABAR y GCR2 (Razem et al., 2006; Shen et al., 2006; Liu et al., 2007) no son capaces de unir al enantiómero artificial.

Anteriormente, se han llevado a cabo búsquedas de mutantes capaces de diferenciar entre ambos enantiómeros bajo la premisa de que a lo largo de la evolución, variaciones genéticas naturales podrían haber causado diferencias entre ambos en algunas especies vegetales (Nambara et al., 2002). Así, en embriones de trigo el isómero (-)-*R*-ABA induce los genes *LEA* (*Late-Embryogenesis-Abundant*) y *DHN* (*Dehydrins*), si bien su efecto sobre el gen *Em* (*Early methionine-labeled polypeptide*) es relativamente menor (Walker-Simmons et al., 1992). En este sentido, en *Arabidopsis* (-)-*R*-ABA no aumenta los niveles de expresión del gen de respuesta a ABA *RABI8* aunque estimula la conversión de ABA natural hasta el producto de su degradación, el ácido faseico (Windsor y Zeevaart, 1997; Jeannette et al., 1999). Nambara et al., (2002), en un primer *screening*, han llevado a cabo una búsqueda de mutantes capaces de diferenciar ambos enantiómeros durante la germinación de semillas, para lo cual emplearon (-)-*R*-ABA, encontrando únicamente 3 alelos del mutante *abi5* mientras que fueron aislados 10 alelos del mutante *abi4*. Este resultado podría indicar que los mutantes de pérdida de función del gen *ABI5* presentan una menor sensibilidad al enantiómero natural del ABA que al (-)-*R*-ABA. Asimismo, han identificado dos nuevos mutantes (*cho1* y *cho2*) que muestran

una menor sensibilidad a (-)-*R*-ABA mientras que apenas exhiben alterada su respuesta al otro enantiómero (Yamagishi et al., 2009). Todo ello pone de manifiesto la utilidad de este tipo de búsquedas para lograr diseccionar de un modo más estricto la ruta de señalización del ABA.

Como segunda aproximación experimental para la identificación de mutantes que presentaran alterada su respuesta a ABA durante la germinación, se ha empleado el enantiómero (+)-*S*-ABA en concentraciones inhibitorias (3  $\mu$ M) de la germinación en el tipo silvestre Col-0. Para alcanzar este propósito, el grupo de trabajo del Dr. Eiji Nambara ha llevado a cabo la mutagénesis de dos poblaciones de 1.000 semillas de los ecotipos Col-0 y *Ler*, empleando como agentes mutagénicos EMS y *fast neutrón*. El primero provoca mutaciones puntuales consistentes en cambios de bases, mientras que el segundo genera deleciones en los genes afectados. De este modo, se han podido aislar 18 mutantes, identificando 7 alelos del mutante *abi3*, 4 alelos de *abi4* y 5 alelos de *abi5* mediante los correspondientes test de alelismo y complementación (Tabla R.3). Además, se aislaron 2 mutantes más, afrontándose la localización cromosómica de la mutación en ambos, quedando acotadas en una región muy próxima del brazo superior del cromosoma V, entre los marcadores At5g22050/ *HinfI* y MWD9-25.3/*AccI*, (Figura R.42), zona en la cual únicamente se localizaban ocho genes. La secuenciación de estos genes en los dos mutantes, empleando oligonucleótidos específicos, ha revelado que ambas mutaciones afectan al gen *ANAC089* (At5g22290), un FT de la familia de proteínas NAC (NAM/ATAF/CUC).

La caracterización funcional de las proteínas *HAB2* y *ANAC089* así como su implicación en los procesos regulados por ABA se discuten a continuación

#### **4. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA PROTEÍN-FOSFATASA DE TIPO 2C (PP2C) HAB2.**

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

Las PP2Cs pertenecen a la familia de las serina/treonina fosfatasa, encargadas de eliminar el grupo fosfato de un aminoácido serina o treonina. En la actualidad se han

identificado 76 PP2Cs en *Arabidopsis* que se clasifican en 10 grupos (A-J). HAB2 (*Homology to ABI1-2*) se encuentra dentro del grupo A, integrado por otras 8 proteínas, la mayor parte de ellas implicadas en la regulación de la ruta de señalización del ABR como ABI1, ABI2, HAB1 (*Homology to ABI1*) y AtPP2CA. Diversos análisis genéticos han revelado que actúan como reguladores negativos de esta ruta de señalización, interaccionando e inhibiendo a los siguientes componentes de la transducción de la señal, las proteín-quinasas de tipo SnRK2s (*SNF1-related protein-kinase 2*) (Park et al., 2009). Así, mutantes de pérdida de función de estos genes muestran fenotipos similares de hipersensibilidad a ABA, mientras que mutaciones dominantes hipermórficas provocadas por sustituciones equivalentes de glicina (G) por aspártico (D) en el dominio catalítico (ABI1<sup>G180D</sup>, ABI2<sup>G168D</sup>, HAB1<sup>G246D</sup>), provocan fenotipos de insensibilidad en diversas respuestas mediadas por ABA (Koornneef et al., 1984; Robert et al., 2006).

En este sentido, HAB2 presenta todas las características típicas de las PP2Cs de *Arabidopsis*. El dominio catalítico localizado en el extremo C-terminal muestra una elevada homología con el resto de las PP2Cs del grupo A, implicadas la mayor parte de ellas y sus ortólogas (como en haca o en musgo) en la señalización de ABA (González-García et al., 2003; Komatsu et al., 2009). Esta familia de proteínas contiene 11 subdominios aminoacídicos altamente conservados dentro del dominio catalítico (Figura R.15). De esta forma, la sustitución del aminoácido glicina por otro de carácter ácido (aspártico, D o glutámico, E) en posiciones equivalentes del subdominio 2 del dominio catalítico, genera fenotipos de insensibilidad a ABA en las PP2Cs ABI1, ABI2, PP2CA, HAB1 y HAB2. Sin embargo, existen notables diferencias en la composición y longitud del extremo N-terminal, adquiriendo este hecho una gran importancia al comprobarse que esta región de la proteína puede facilitar la interacción con otros sustratos y tener una función reguladora (Rodríguez, 1998). Se sabe que la delección del extremo N-terminal de ABI1 y PP2CA provoca un incremento de la actividad fosfatasa (Sheen et al., 1998). También se ha comprobado que el extremo C-terminal es el responsable de la interacción de las proteínas receptoras de la hormona con las PP2Cs (Ma et al., 2009; Park et al., 2009) y que en el extremo C-terminal de ABI1 existen secuencias determinantes para la localización subcelular de la proteína, de modo que su delección da lugar a una redistribución de ABI1 dentro de la célula (Moes et al., 2008).

Aunque en menor número, se pueden encontrar ortólogos de la mayoría de las PP2Cs de *Arabidopsis* en otros organismos eucariotas (González-García et al., 2003; Sakata et al., 2009), siendo esta representación desigual el reflejo de la historia evolutiva en plantas. El entendimiento del desarrollo de mecanismos de comunicación intercelulares en plantas

ayudará a conocer el papel de este grupo específico de enzimas que regula los procesos de fosforilación.

A pesar del gran auge que ha experimentado el estudio de la función desarrollada por las PP2Cs en las rutas de señalización en *Arabidopsis*, su papel en otras especies está todavía lejos de ser dilucidado. Por ejemplo, se ha visto que la proteína ABI1 de *Arabidopsis* es también un fuerte regulador negativo de la ruta del ABA en otras especies como tabaco, tomate y arroz (Armstrong et al., 1995; Carrera y Prat, 1998; Hagenbeek et al., 2000), si bien la dificultad de trabajar con estas especies impide conocer la función precisa de esta proteína (y otras PP2Cs) en estas y otras plantas diferentes a *Arabidopsis*.

Alineamientos de las secuencias aminoacídicas realizados con anterioridad entre PP2Cs de *Arabidopsis* y otras especies vegetales, revelan una alta conservación del dominio catalítico de las PP2Cs a lo largo de la evolución. Para tener una mayor comprensión del papel desarrollado por las PP2Cs del grupo A a lo largo de la historia evolutiva, hemos realizado un análisis filogenético de las 9 PP2Cs del grupo A de *Arabidopsis*, empleando en este estudio otras 5 especies vegetales que incluyen plantas inferiores como musgos y helechos así como vegetales superiores (arroz, vid y chopo) (Figura R.16). Este análisis ha revelado que las PP2Cs han sufrido numerosos eventos de duplicación que preceden a la especiación y diversificación de la función de las proteínas, sugiriendo que algunos miembros de esta familia tienen funciones específicas. Por otro lado, todas las especies seleccionadas para el estudio aparecieron representadas en los clados establecidos, lo que indica la presencia de ortólogos de las PP2Cs del grupo A en todos los genomas analizados. En uno de los grupos se englobaron, además de las parejas ABI1/ABI2 y HAB1/HAB2, implicadas en la regulación de diferentes respuestas a ABA, otras PP2Cs de especies como *Populus trichocarpa* (chopo), *Vitis vinifera* (vid) y *Oryza sativa* (arroz), sugiriendo que la regulación de la ruta de señalización del ABA por las PP2Cs está altamente conservada a lo largo de la evolución en plantas.

Con el objetivo de obtener evidencias fisiológicas que nos permitan establecer la implicación de HAB2 en el control de las diferentes respuestas reguladas por ABA, hemos estudiado la función de la proteína en los procesos que regulan la formación, dormición y germinación de semillas y los primeros estadios del desarrollo vegetal.

Uno de los primeros procesos del desarrollo controlados por el ABA es la formación de la semilla, participando en la embriogénesis, en la síntesis de proteínas de reserva y en la tolerancia a la desecación y establecimiento de la dormición, siendo junto con las GAs, la hormona que regula la fase de maduración (Koornneef y Karssen, 1994; Rock y Quatrano,

1995). En esta etapa se establecen complejas interacciones entre ambas hormonas, comprobándose que el ABA puede suprimir la biosíntesis de GAs en semillas en desarrollo a través de la proteína AtGA2ox6, que reduce los niveles de GAs (revisado en Gutiérrez et al., 2007). Además, esta regulación no depende del tipo celular, por lo que la molécula de ABA o su señalización es transmitida a otras células para regular los niveles de GAs.

Otra de las señales involucrada en la embriogénesis y en la acumulación de sustancias de reserva son los JAs (Staswick, 1990; He et al., 2002), de modo que algunos mutantes que muestran alteradas sus respuestas a esta hormona no son capaces de completar correctamente la fase de desecación, dando lugar a semillas inviables (Li et al., 2001, 2004). En nuestro trabajo, hemos comprobado que el doble mutante *hab2;coi1-16* genera, además de semillas de aspecto semejante a Col-0, otras de morfología arrugada (*shrunk*) que presentan retrasada la imbibición en comparación con el tipo silvestre (Figuras R.17 y R.18). Los análisis de viabilidad, empleando sales de tetrazolium, nos han permitido comprobar que los embriones procedentes de semillas aberrantes del doble mutante *hab2;coi1-16* no eran viables tras la etapa de desecación (Figura R.19). En este sentido, es conocido que el ABA, junto con otros estímulos, induce la expresión de genes que codifican proteínas de reserva (*seed storage proteins, SSPs*), esenciales para que se produzca la tolerancia a la desecación al final de la fase de maduración (Zhang et al., 2009). En esta etapa, actúa fundamentalmente a través de la acción de *ABI3* (*Abscisic Acid Insensitive3*), *FUS3* (*Fusca3*), *LEC1* (*Leafy Cotyledon1*) y *LEC2* (*Leafy Cotyledon2*), de modo que mutaciones en estos genes provocan alteraciones en el desarrollo de la semilla, tales como una menor acumulación de proteínas de reserva, dormición reducida o intolerancia a la desecación (Nambara et al., 1992; Keith et al., 1994; Meinke et al., 1994; Parcy et al., 1997; Finkelstein et al., 2002). Diferentes análisis han revelado que estos genes no actúan a través de rutas independientes, sino que interactúan entre sí regulando diversos aspectos del desarrollo de las semillas. Así, *LEC1* controla la expresión de *SSPs* a través de la regulación de *FUS3* y *ABI3* (Kagaya et al., 2005), y a su vez, los niveles de la proteína *ABI3* son modulados por *FUS3* y *LEC1* (Parcy et al., 1997).

La caracterización en mayor profundidad de la morfología de los embriones con desarrollo aberrante, mediante la obtención de imágenes por microscopía diferencial de contraste de interferencia (D.I.C.) y microscopía electrónica (S.E.M.) (Figuras R.21 y R.22), ha permitido detectar la existencia de embriones de forma esférica en los que en ningún caso se apreciaba la formación de los primordios de los cotiledones y que presentaban un desarrollo anormal del teórico suspensor durante la embriogénesis. Anteriormente, se han descrito mutantes que muestran alteraciones durante el desarrollo embrionario con patrones alterados en la formación de los cotiledones. Así, el fenotipo *laterne* causado por una mutación en el gen

*PINOID (PID)* y por la mutación *enhancer of pinoid (enp)* que afecta a un gen todavía sin identificar, provoca una delección completa de los cotiledones en el embrión, si bien continúan con un normal desarrollo del hipocotilo y de la raíz, siendo tolerantes a la fase de desecación (Trembl et al., 2005). *PINOID (PID)* codifica una serina-treonina proteína-kinasa que regula negativamente el transporte de auxinas durante los primeros estadios del desarrollo embrionario (Christensen et al., 2000). Se sabe que las auxinas tienen un papel fundamental en la embriogénesis determinando el establecimiento del eje embrionario, siendo necesarias durante el estadio globular para desencadenar la transición de una simetría radial a una bilateral, permitiendo así la emergencia de los cotiledones. Una vez que el embrión alcanza el estado de octante (ocho células), modifica su patrón de división celular de modo que las células comienzan a dividirse siguiendo un eje vertical hasta alcanzar el estado de corazón, donde ya comienzan a emerger los primordios de los cotiledones (Fischer y Neuhaus, 1996; Hadfi et al., 1998). Nuestro trabajo nos ha permitido observar embriones en el doble mutante *hab2;coi1-16* que por su morfología esférica, parecen detener el desarrollo en la fase globular. Sin embargo, tales embriones muestran un tamaño y un número de células mayor que embriones globulares en el tipo silvestre (Figura R.20). Esto implica que el transporte polar de auxinas en los embriones inviables *hab2;coi1-16* podría estar alterado, de modo que no se produciría el correcto establecimiento del eje embrionario durante la embriogénesis continuando la proliferación celular bajo un patrón radial de división celular. En este sentido, estudios llevados a cabo con distintos mutantes en diversas especies vegetales como zanahoria, *Arabidopsis* o mostaza, han revelado que la inhibición del transporte polarizado de auxinas durante la fase globular previene la formación de los cotiledones y el establecimiento de la simetría bilateral, evitando la transición hacia la etapa de corazón y dando lugar, en muchas ocasiones, a la formación de embriones globulares de gran tamaño (Schiavone y Cooke., 1987; Okada et al., 1991; Liu et al., 1993).

Los embriones inviables del mutante *hab2;coi1-16* presentan además, una estructura semejante al suspensor formada por un elevado número de células dispuestas en varias capas, procedentes de planos de división anormales y que persiste a lo largo de la embriogénesis (Figuras R.21 y R.22). En el tipo silvestre Col-0, el suspensor aparece como una cadena integrada por 6-9 células que une el embrión con el sistema vascular de la planta y que desaparece después del estadio de corazón. Además, desarrolla un papel muy importante en el desarrollo embrionario participando en el transporte de auxinas hacia el embrión verdadero a través de la proteína PIN7 (*PIN FORMED7*) (Friml et al., 2003). Alteraciones en la formación del suspensor dan lugar a desarrollos aberrantes del embrión. Así, los mutantes *raspberryl*, *raspberry2* y *raspberry3* muestran un suspensor de mayor tamaño que el tipo silvestre y

mantienen un patrón de simetría radial durante toda la embriogénesis, mostrando embriones de morfología esférica con un elevado número de células (hasta 250) de aspecto semejante a los dobles mutantes *hab2;coi1-16*, si bien esta mutación no genera la letalidad del embrión (Yadegari et al., 1994; Apuya et al., 2002). Asimismo, en la superficie de los embriones dobles mutantes hemos observado células con irregularidades y protuberancias típicas de embriones de tipo silvestre que se encuentran en las últimas etapas de la maduración (Figura R.22).

Todo ello indica la existencia de algún tipo de relación entre las rutas de señalización de ABA y JAs, posiblemente modificando el transporte polarizado de auxinas durante la embriogénesis. De igual forma, la morfología celular de los embriones aberrantes, más parecida a embriones en los últimos estadios del desarrollo que a aquellos que se encuentran en la fase globular o de corazón, parece indicar que tales mutantes continúan el desarrollo hasta alcanzar la etapa de maduración, siendo incapaces de superar la fase de desecación.

Puesto que ya se ha demostrado con anterioridad la insensibilidad a ABA de mutantes en PP2Cs como *abi1-1* y *abi2-1* (Koornneef et al., 1984), nos hemos propuesto estudiar las respuestas a ABA del mutante *hab2*. Para ello, hemos analizado su germinación en presencia de concentraciones crecientes de la hormona. Este estudio nos ha permitido comprobar que mostraba una sensibilidad reducida a ABA durante la germinación y el desarrollo temprano de las plántulas (Figuras R.23 y R.26), al igual que ocurre con los mutantes insensibles a ABA *abi1-1* y *abi2-1* (Koornneef et al., 1984; Finkelstein et al., 1994). Sin embargo, en presencia de concentraciones más elevadas de la hormona se aprecia un descenso en los porcentajes de germinación así como un marcado retraso en el desarrollo temprano. En trabajos anteriores, se ha descrito la existencia de bajos niveles de expresión de *HAB2* en respuesta a la adición exógena de ABA durante el desarrollo temprano de *Arabidopsis* en comparación con otras PP2Cs como *ABI1*, *ABI2* y *HAB1* (Sáez et al., 2004), lo que podría indicar que no tenga una función tan relevante en algunos de los procesos regulados por la hormona. Este hecho, podría también explicar que altas concentraciones de la hormona provoquen un retraso en el desarrollo del mutante *hab2*, mostrando porcentajes de germinación menores que otros mutantes en PP2Cs como *abi1-1*, en cuyo caso se detectaron unos niveles de expresión elevados ante la adición exógena de ABA (Sáez et al., 2004). Por su parte, el doble mutante *hab2;coi1-16* exhibía porcentajes de germinación superiores al mutante simple *hab2* (Figura R.23), llegando a mostrar un mayor desarrollo radicular y de cotiledones verdes que sus parentales *hab2* y *coi1-16* en presencia de concentraciones altas de la hormona (1  $\mu$ M y 2  $\mu$ M) (Figura R.26). Esta observación pone de manifiesto el efecto supresor de la mutación *hab2* sobre el fenotipo del mutante *coi1-16*.

Una vez demostrado que el mutante *hab2* presenta una menor sensibilidad que el tipo silvestre a la aplicación exógena de ABA, decidimos estudiar si también muestra alteradas sus respuestas a ABA endógeno en condiciones fisiológicas, para lo cual hemos analizado el grado de dormición de las semillas del mutante.

Las semillas maduras de *Arabidopsis* presentan dormición primaria cuando son recogidas directamente de la planta madre, de modo que a pesar de darse las condiciones ambientales idóneas, no son capaces de germinar si no se las somete a tratamientos que ayuden a romper la dormición, tales como la estratificación o la adición exógena de GAs (Koornneef y Karssen, 1994). El ABA además de promover la tolerancia a la fase de desecación y maduración o la inhibición de la germinación en las semillas, participa también en el establecimiento y mantenimiento de la dormición. Así, semillas de mutantes deficientes o insensibles a la hormona muestran menor dormición que el tipo silvestre, mientras que la sobreexpresión de genes que participan en su biosíntesis promueve la acumulación de ABA y con ello una mayor dormición (Karssen et al., 1983; Koornneef et al., 1984; Leon-Kloosterzielet al., 1996). Para analizar el grado de dormición del mutante *hab2* hemos analizado los porcentajes de germinación de semillas recogidas simultáneamente y sometidas posteriormente a diferentes períodos de tratamiento frío (4°C) (Figura R.24a), lo que nos ha permitido comprobar que *hab2* germinaba sin necesidad de estratificación previa. Todo ello, indica que las semillas del mutante *hab2* tienen una sensibilidad reducida al ABA endógeno y con ello menor grado de dormición.

Por otro lado, puesto que hemos comprobado que los JAs pueden promover el efecto supresor del ABA sobre la germinación, decidimos estudiar la dormición en el mutante simple *coil-16* y en el doble mutante *hab2;coil-16*. En un estudio reciente se analizan los cambios en los niveles hormonales producidos después de la imbibición en semillas durmientes Col-0 y semillas no durmientes Cvi (*Cape Verde Islands*), comprobando que en las primeras se produce un descenso en los niveles de JA después de 1 hora de imbibición. En semillas secas Cvi no se detectan niveles apreciables de JA ni JA-Ile, aunque se acumula una cantidad significativa de ellos en semillas secas Col-0 (Preston et al., 2009). Asimismo, después de la imbibición se detecta un descenso en los niveles de ABA como consecuencia de un aumento en la inducción del gen *CYP707A2*, que codifica una 8'-hidroxilasa implicada en el catabolismo del ABA (Preston et al., 2009). En nuestro trabajo, sin embargo, no hemos observado diferencias en la germinación entre el tipo silvestre y *coil-16*, mostrando ambos una elevada dormición. En este sentido, al analizar los porcentajes de germinación en el doble mutante no se ha observado el mismo efecto supresor de la mutación *hab2* sobre *coil-16* en la dormición de semillas, que al realizar el ensayo de germinación en presencia de ABA (Figura

R.23), lo que sugiere que si bien el JA regula negativamente la germinación a través de la acción del ABA, no estaría implicado en los procesos de salida de la dormición.

En semillas secas la dormición va disminuyendo a lo largo del tiempo. En concreto, el almacenamiento en seco de las semillas (*after-ripening*) es un tratamiento comúnmente empleado para eliminar la dormición (Bewley, 1997; Probert, 2000) y podría representar un mecanismo natural para el control de la dormición en zonas con climas secos (Probert, 2000). En cualquier caso, mutantes cuyas semillas frescas tienen la capacidad de germinar cuando son recogidas de la planta madre y que presentan bajos niveles de dormición, no requieren los mecanismos de *after-ripening*, que se inician durante el desarrollo de la semilla (Karsen et al., 1983). El mutante simple *hab2* y el doble *hab2;coi1-16*, que han mostrado tener bajos niveles de dormición, alcanzaron porcentajes de germinación plenos cuando fueron almacenados durante varias semanas, indicando que los mecanismos de *after-ripening* siguen siendo operativos (Figura R.24b).

Para obtener más información de la función que desempeña HAB2 en la germinación de semillas de *Arabidopsis*, hemos realizado un ensayo adicional analizando la germinación del mutante en presencia de paclobutrazol (PAC), un inhibidor de la biosíntesis de GAs. Hace varias décadas que se conoce la relación antagonista existente entre el ABA y las GAs durante esta etapa del desarrollo, comprobándose que mientras mutantes en la enzima GA2-oxidasa, implicada en la inactivación de las GAs, muestran un incremento en los porcentajes de germinación (Yamauchi et al., 2007), mutantes inactivados en los genes *CYP707A1* y *CYP707A2*, muestran un aumento en los niveles de dormición como consecuencia de un incremento en la acumulación de la hormona (Okamoto et al., 2006). Del mismo modo, se sabe que mutantes con sensibilidad reducida a ABA o con niveles reducidos de la hormona, muestran resistencia a PAC durante la germinación (Koornneef et al., 1998). El uso de otros inhibidores de la síntesis de GAs como el uniconazol en mutantes insensibles a ABA como *abi1-1* o *abi3-1* han arrojado resultados semejantes, demostrando que este tipo de mutantes requiere menores niveles de GAs para iniciar la germinación (Steber et al., 1998). Nuestros estudios fenotípicos han revelado que el mutante *hab2* es capaz de germinar en presencia de altas concentraciones de PAC, lo que indica una reducción en la necesidad de GAs para que se produzca la germinación (Figura R.25). Estos resultados están de acuerdo con lo observado en mutantes deficientes en la biosíntesis de ABA, que requieren menos niveles de GAs para que se produzca la germinación debido a que en ellos la dormición primaria no se establece completamente (Karssen y Lacka, 1986; Steber et al., 1998). Por su parte, el mutante *coi1-16* mostraba una germinación muy reducida en comparación con Col-0 demostrando ser

hipersensible a PAC durante esta etapa del desarrollo y lo que indica que requiere mayores niveles de GAs para germinar que el tipo silvestre.

A la vista de estos resultados, se puede concluir que *hab2*, al igual que ha sido descrito para otros mutantes en PP2Cs del grupo A como *abi1-1* y *abi2-1*, presenta bajos niveles de dormición así como insensibilidad a la adición exógena de ABA y PAC, sugiriendo que la proteína HAB2 participa en la regulación de la señalización del ABA durante los procesos de dormición y germinación de las semillas. Asimismo, a partir de estos resultados podemos deducir que la germinación no sólo implica la acción positiva de las GAs, sino también una regulación negativa de la señalización del ABA.

El ABA además de participar activamente en la regulación de la germinación, también controla diferentes aspectos del desarrollo vegetativo de las plantas como el crecimiento de la raíz. En este sentido, se sabe que regula negativamente el crecimiento radicular a través de la inhibición de la elongación celular y de la detención de la actividad mitótica (Himmelbach et al., 1998). Diversas investigaciones han determinado que el ABA modifica el crecimiento de la planta, impidiendo el crecimiento de los meristemas y de la raíz antagonizando el efecto de las auxinas (Pilet y Saugy, 1987). En cualquier caso, el uso de inhibidores de la síntesis de ABA o de mutantes deficientes, no tiene efectos sobre el crecimiento de la raíz en maíz, indicando que el ABA endógeno no es un componente esencial para la regulación de este proceso (Moore y Smith, 1984, 1985). Sin embargo, un aumento en los niveles de la hormona ocasionado por estreses como las bajas temperaturas o la salinidad da lugar a la inhibición de la elongación celular y con ello la detención del crecimiento de la raíz. Además del ABA, otras hormonas como el JA están implicadas en la inhibición de la elongación radicular de *Arabidopsis* (Wasternack, 2007), de modo que mutantes insensibles a JA como *coi1*, *jin1* o *jar1* tratados con MeJA, presentan raíces de longitud similar a las raíces de plantas del ecotipo silvestre sin tratar. Por otro lado, mutantes que presentan expresión constitutiva de genes de respuesta a JA como *cev1*, *cet1* o *cex1*, presentan raíces cortas y un retraso en el desarrollo semejante a plantas de ecotipo silvestre tratadas con JA (Ellis et al., 2002).

Para comprobar la posible implicación de la proteína HAB2 en la regulación del crecimiento de la raíz primaria, hemos analizado el desarrollo de la raíz en el mutante *hab2* en presencia de concentraciones elevadas de ABA, observando una menor inhibición del crecimiento de la raíz que en el tipo silvestre (Figura R.27), al igual que se ha descrito para mutantes insensibles al ABA como *abi1-1* o *abi2-1* (Sáez et al., 2004). Este resultado sugiere que HAB2 no sólo regula las respuestas mediadas por ABA durante la germinación, sino que también está implicada en los procesos del desarrollo post-germinativos. Por su parte, el mutante *coi1-16* ha mostrado un desarrollo de la raíz semejante a Col-0 en presencia de la

hormona, lo que pone de manifiesto que no presenta respuestas alteradas en todos los procesos regulados por ABA. Por otro lado, el doble mutante *hab2;coi1-16*, con sensibilidad reducida a los dos de las rutas de señalización hormonal implicadas en la inhibición del crecimiento de la raíz, muestra una reducción de la longitud de la raíz muy similar al mutante *hab2*. Todo ello parece indicar que la señalización del ABA, en relación a la inhibición del crecimiento de la raíz, es independiente de COI1, de modo que ABA y JA podrían actuar a través de rutas de señalización diferentes para la regulación del desarrollo de la raíz principal.

Otra de las funciones reguladoras del ABA sobre el desarrollo de las plantas, es la de impedir la germinación y/o el establecimiento de plántulas cuando el aporte del agua no es el adecuado (González-Guzmán et al., 2002) y en este sentido, una elevada salinidad, los estreses osmóticos, así como las bajas temperaturas provocan en última instancia un déficit de agua en la planta (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1993). Es bien conocido que los niveles endógenos de ABA aumentan en presencia de estreses abióticos, particularmente ante estrés salino y osmótico. También se ha comprobado que el ABA regula negativamente la germinación de semillas y el desarrollo temprano de las plántulas en presencia de diferentes estreses osmóticos (González-Guzmán et al., 2002). Así, los mutantes hipersensibles a ABA son generalmente más sensibles a la inhibición de la germinación provocada por estreses osmóticos (Sáez et al., 2004), mientras que mutantes insensibles o deficientes en su síntesis son más tolerantes a este tipo de estreses (Leon-Kloosterziel et al., 1996; González-Guzmán et al., 2002). Diferentes alelos del mutante *aba2*, que presentan inactivada la enzima alcohol deshidrogenasa/reductasa implicada en la biosíntesis de ABA (Quesada et al., 2000; González-Guzmán et al., 2002), y los mutantes *abil-1* y *abi2-1* (Werner y Finkelstein, 1995) son capaces de germinar y desarrollarse en este tipo de condiciones. De esta forma, se han aislado mutantes alterados en la señalización y síntesis de ABA en búsquedas de mutantes resistentes a altas concentraciones de NaCl o de azúcares (Leon-Kloosterziel et al., 1996; Laby et al., 2000; Quesada et al., 2000). En nuestro estudio, el análisis de la germinación del mutante *hab2* en presencia de concentraciones de NaCl y manitol, inhibitorias de la germinación y del desarrollo temprano en plántulas del tipo silvestre, nos ha permitido comprobar que es capaz de germinar y desarrollarse en estas condiciones, mostrando unos porcentajes de germinación semejantes al mutante *abil-1* (Figura R.28). Ensayos de germinación similares realizados en presencia de estos estreses con mutantes de pérdida de función en el gen *HABI*, revelan que sus semillas presentan un claro retraso en la emergencia de la raíz y en el desarrollo, mientras que semillas que sobreexpresan este gen son capaces de germinar y desarrollar cotiledones verdes (Sáez et al., 2004; 2006). Por su parte, el doble mutante *hab2;coi1-16* muestra

porcentajes de germinación menores que el mutante simple. Anteriormente, se ha comprobado que *coil-16* presenta inhibida la germinación en presencia de NaCl en mayor medida que el tipo silvestre (Ellis y Turner, 2002), dato que también es corroborado por los resultados presentados en este trabajo, donde se observa la hipersensibilidad de *coil-16* bajo estrés salino (Figura R.28). Estos resultados podrían indicar que en el doble mutante se produce un efecto aditivo de ambas mutaciones en respuesta a este tipo de estreses, de modo que la baja germinación en *coil-16*, sumada a la insensibilidad aportada por la mutación *hab2*, provoca en el doble mutante una reducción en la resistencia a altas concentraciones de NaCl o manitol respecto a *hab2* (Figura R.28).

La exposición de las plantas a temperaturas subóptimas provoca un aumento en los niveles endógenos de ABA en diferentes especies y se ha observado que este efecto es independiente de la disponibilidad de agua en el sustrato (Daie et al., 1981; Dorffling et al., 1990). La germinación en el mutante *hab2* a una temperatura de 10°C se encuentra menos retrasada que en el tipo silvestre, mientras en el mutante *coil-16* se puede observar claramente un descenso en el porcentaje de semillas germinadas (Figura R.29). Como ya se ha comprobado al inicio de esta memoria (Figura R.1) y en trabajos anteriores (Staswick et al., 1992), el JA no es capaz por sí solo de inhibir la germinación de semillas cuando los ensayos se realizan a temperatura ambiente (22°C). Sin embargo, cuando la temperatura se reduce a 10°C actúa como un inhibidor efectivo de esta etapa del desarrollo (Hays et al., 1999). Estos resultados, junto con la observación de que la adición simultánea de ABA y JA al medio provoca una mayor inhibición de la germinación que al añadir ABA individualmente (Figura R.3), podrían implicar que algún componente molecular de la señalización del ABA actuara como intermediario de las respuestas a JA ante determinados estímulos. En este sentido, la mayor acumulación de mRNAs de oleosina y napina en tratamientos conjuntos de ABA y JA, que en aquellos realizados únicamente con JA, parecen apoyar esta teoría. También se ha podido comprobar que la acumulación de mRNAs de napina por JA en embriones de *B. napus* disminuye cuando se añade fluoridona (un inhibidor de la síntesis de ABA) (Hays et al., 1999).

Todo ello demuestra, por un lado, que HAB2 participa en la regulación de las respuestas ante estrés salino y osmótico moduladas por ABA, así como en las relacionadas con temperaturas subóptimas (10°C) y por otro, que la posible interacción entre ABA y JA ocurre únicamente durante determinados procesos del desarrollo temprano.

Además de hacer frente a estreses abióticos, como los anteriormente citados, las plantas para poder colonizar y adaptarse al medio, han de poseer mecanismos eficientes para defenderse y resistir a los ataques y a la invasión de organismos patógenos. La regulación de este tipo de respuestas se lleva a cabo por tres fitohormonas fundamentalmente, el ácido

salicílico (SA), JAs y ET, existiendo complejas redes de interacción entre ellas. Recientemente, el ABA ha surgido como un importante regulador, tanto positivo como negativo, de esta clase de respuestas en función de la naturaleza y del tipo de patógeno invasor (Anderson et al., 2004; Lorenzo et al., 2004; Mauch-Mani y Mauch, 2005; Adie et al., 2007). Así, para que se desencadenen las defensas frente al oomiceto hemibiótrofo *Pythium irregulare* y frente a la bacteria necrótropa *Ralstonia solanacearum*, se requiere la síntesis y señalización del ABA, indicando que regula positivamente las respuestas frente al ataque de estos dos patógenos (Adie et al., 2007; Hernández-Blanco et al., 2007). Por otro lado, plantas de tipo silvestre tratadas con ABA, experimentan una considerable reducción de los niveles de transcritos de genes implicados en las respuestas de defensa frente a estreses bióticos como *PDF1.2* o *CHI*, sugiriendo un papel represor del ABA ante este tipo de procesos (Anderson et al., 2004). Con el objetivo de analizar en mayor profundidad la función del ABA en estas respuestas y el papel que en ellas desempeña la PP2C HAB2, hemos caracterizado la interacción entre *Arabidopsis* y dos microorganismos fitopatógenos, *Botrytis cinerea* (hongo necrótropo) y *Pythium irregulare* (oomiceto hemibiótrofo). En la actualidad, se desconoce el verdadero papel desarrollado por el ABA en las respuestas frente al ataque por *Botrytis cinerea*. Así, algunos autores indican que ejerce una regulación positiva al observar que el mutante insensible a ABA *aim1* (*ABA-induced myb1*) en tomate muestra una susceptibilidad elevada al patógeno (Abuqamar et al., 2009), mientras que otros sugieren que desempeña el papel opuesto, tras determinar que algunos mutantes deficientes en ABA como *aba2-1* y *ao3-2* muestran una mayor resistencia que Col-0 frente al ataque por este hongo (Adie et al., 2007). En nuestro estudio hemos observado que *hab2* presenta una mayor susceptibilidad al ataque de *B. cinerea* que el tipo silvestre y similar al mutante *abi1-1* (Figura R.30a y b). Anteriormente, se han podido identificar otras proteínas en *Arabidopsis* como BOS1, inducida por ABA y necesaria para que se desencadenen las respuestas de defensa frente a *B. cinerea* (Mentiste et al., 2003). Por su parte, el doble mutante *hab2;coil-16* ha mostrado una respuesta semejante al mutante simple *hab2*, lo que indica que la mutación *hab2* es capaz de suprimir la hipersensibilidad de *coil-16* frente al ataque por *B. cinerea*, sugiriendo el papel negativo que tendría el ABA en la activación de las respuestas frente a este hongo y coincidiendo con lo descrito por Adie et al. (2007). Por su parte, *P. ultimum* no actúa como un patógeno necrótropo estricto, sino que en su proceso infectivo actúa como un biótrofo, si bien las respuestas de defensa que se activan en la planta son similares a las que se inducen por hongos necrótropos como *B. cinerea* (Adie et al., 2007). En este sentido, se puede observar un claro incremento en los niveles de ABA en plantas de tipo silvestre tras ser infectadas con *P. irregulare*, mientras que mutantes en la síntesis de ABA (como *ao3-2* o *aba2-12*) o en su señalización (como *abi4-1*) muestran una

mayor susceptibilidad a *P. irregulare* que el tipo silvestre, lo que indica que el ABA regula positivamente la activación de las respuestas frente a este patógeno (Adie et al., 2007). En el ensayo realizado con *P. ultimum*, se ha podido observar que los mutantes afectados en sus respuestas a ABA muestran lesiones más severas que el tipo silvestre, coincidiendo con el papel positivo del ABA en la regulación frente al ataque de hongos del género *Pythium*, observado con anterioridad por otros autores (Adie et al., 2007). Todo ello pone de manifiesto que HAB2 estaría implicada en la regulación de los procesos de defensa frente a *B. cinerea* y *P. irregulare*, actuando a través de mecanismos diferentes según se trate de un patógeno u otro.

Una vez realizados los ensayos correspondientes para la caracterización fenotípica del mutante *hab2*, el siguiente paso fue analizar al mutante desde un punto de vista molecular, incidiendo principalmente en los efectos de la mutación sobre la expresión génica en respuesta a ABA, en la localización subcelular de la proteína y su interacción con la familia de proteínas PYR1/PYL-RCAR, descrita como receptores de ABA.

Para comprobar si la menor sensibilidad a ABA, mostrada por el mutante *hab2* respecto a Col-0 en los análisis fenotípicos, conllevaba cambios en la expresión de genes específicos, hemos analizado la expresión de los genes de respuesta a ABA *RD29A* (*Responsive to Dehydration A*), *RD29B* (*Responsive to Dehydration B*), *RAB18* (*Responsive to ABA 18*) y *P5CS1* ( *$\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthase*) en el mutante *hab2* (Figura R.31). Todos estos genes están positivamente regulados por ABA y codifican diferentes proteínas implicadas en las respuestas frente a estreses abióticos. *RAB18* es una dehidrina encontrada en plantas tratadas con ABA y que se acumula en semillas secas de *Arabidopsis* (Nylander et al., 2001), por lo que este gen es un buen candidato para el estudio de las respuestas a ABA en los primeros estadios del desarrollo. *RD29A* y *RD29B* (*Responsive to Dehydration A-B*) son genes inducidos por ABA y por estreses como el frío y la salinidad, que contienen elementos de respuesta a ABA en sus promotores (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994). Finalmente, *P5CS1* ( *$\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthase*) es un gen regulado por sequía, salinidad y ABA, cuya expresión está reducida en mutantes con sensibilidad disminuida a ABA (Strizhov et al., 1997). Por todo ello, estos genes son buenos candidatos para discernir las distintas respuestas a ABA en los estreses abióticos. En los análisis de expresión mediante Q RT-PCR hemos comprobado que el mutante *hab2* presentaba bajos niveles de transcritos correspondientes a los genes anteriormente citados (Figura R.31), al igual que ocurre con los mutantes *abi1-1* y *abi2-1* (Gosti et al., 1999; Merlot et al., 2001; Moes et al., 2008). Esta observación indica que HAB2 está implicada en la ruta de señalización del ABA regulando negativamente la

expresión de estos genes y confirma los resultados obtenidos en los ensayos fenotípicos de respuesta a ABA y a estreses.

El lugar de acción de las PP2Cs del grupo A en las plantas no está todavía suficientemente aclarado. En diferentes trabajos se ha descrito la localización tanto nuclear como citoplasmática de la proteína ABI1 (Himmelbach et al., 2002; Moes et al., 2008). Asimismo, la expresión de HAB1 fusionada a la proteína GFP ha revelado que se distribuye por toda la célula (Sáez et al., 2004). Por otro lado, la interacción entre ABI1 y el factor de transcripción ATHB6 y de HAB1 con SWI3B, una proteína remodeladora de la cromatina, confirman la localización nuclear de ambas fosfatasa, sugiriendo su implicación en la regulación de la transcripción durante las respuestas a ABA (Moes et al., 2008; Sáez et al., 2008). El análisis de la localización subcelular de la proteína HAB2 se ha llevado a cabo mediante transformación transitoria de células de epidermis de cebolla por biobalística y de hojas de tabaco por agroinfiltración fusionándola al extremo C-terminal de la proteína GFP (Figura R.32). Estos estudios han revelado la localización tanto nuclear como citosólica de la proteína (Figura R.33). El elevado tamaño de la proteína quimérica GFP-HAB2 no le permite penetrar en el núcleo por difusión pasiva, como ocurre con la GFP, y debido a que las PP2Cs carecen de subunidades reguladoras asociadas, su transporte al núcleo debe ser dirigido por señales específicas presentes en su secuencia.

El análisis mediante microscopía confocal de la compartimentación subcelular de las proteínas quiméricas ABI1-GFP y ABI<sup>G180D</sup>-GFP en células guarda y en células de la raíz en *Arabidopsis*, ha puesto de manifiesto que la mutación del dominio funcional de ABI1 provoca un cambio en la distribución subcelular de la proteína, dando lugar a una acumulación preferencial en el núcleo (Moes et al., 2008). Sin embargo, en nuestro estudio no hemos observado una acumulación preferencial en el núcleo de la proteína mutada hab2G245E, presentando una distribución ubicua por toda la célula (Figura R.33). La utilización de plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan constitutivamente la proteína HAB2 o su versión mutada hab2G245E fusionada a la proteína GFP bajo el control del promotor 35S han demostrado resultados similares (Figura R.41).

En los últimos años se han caracterizado numerosos componentes de la ruta de señalización del ABA, entre ellos proteínas G, fosfolipasas, segundos mensajeros, proteína-fosfatasa y proteína-kinasas, así como diferentes FTs. En este sentido, mediante análisis de doble híbrido se ha podido identificar una familia de 14 proteínas denominada RCAR (*Regulatory Component of ABA Receptor*), capaces de interactuar directamente con varias

de las PP2Cs del grupo A, bloqueando su actividad fosfatasa *in vivo* (Ma et al., 2009). Simultáneamente, Park et. al (2009) describieron esta misma familia de proteínas que denominaron PYR1 (*Pyrabactin Resistance 1*) y PYL (*PYR1-Like*), encontrando que el ABA promueve la interacción de PYR1 con ABI1, ABI2 y HAB1 e inhibiendo su actividad fosfatasa.

Los estudios de unión entre HAB2 y varias proteínas de la familia PYR1/PYL-RCAR se han llevado a cabo mediante la técnica de complementación bimolecular fluorescente (BiFC), comprobando que existe interacción entre HAB2 y dos de estas proteínas, PYL7 y PYL8, y que tiene lugar tanto en el núcleo como en el citoplasma (Figura R.35), lo que concuerda con la localización subcelular que presentan la proteína quimérica GFP-HAB2 y varias proteínas de la familia PYR1/PYL-RCAR (Ma et al., 2009; Saavedra et al., 2010).

También es conocido que la mutación dominante *abi-1* impide la interacción entre las proteínas ABI1 y PYR1 (Park et al., 2009). Al igual que la proteína ABI1, la versión mutada ABI1<sup>G180D</sup> en presencia de ABA inhibe la actividad enzimática de los siguientes componentes de la ruta de señalización, las proteína-quinasas SnRKs, si bien este efecto no puede ser revertido por la expresión de PYR1, como ocurre con la proteína silvestre. Esto sugiere que la proteína mutada ABI1<sup>G180D</sup> sigue manteniendo su actividad represora y que no está sujeta a la regulación por dentro de la célula (Fujii et al., 2009). El estudio de interacción entre la proteína mutada *hab2G245E* y las proteínas PYL7 o PYL8 mediante BiFC reveló ausencia de fluorescencia, tras el análisis de las hojas coinfiltradas con las construcciones correspondientes. Este resultado indica que la mutación *hab2*, al igual que ocurre con otras mutaciones dominantes en las PP2Cs del grupo A, impide que se forme el complejo receptor de ABA entre la PP2C y las proteínas PYR1/PYL-RCAR, de modo que la proteína mutada *hab2G245E* está continuamente ejerciendo su actividad represora sobre la ruta de señalización del ABA.

Como ya se ha comentado con anterioridad, el doble mutante *hab2;coi1-16* produce semillas inviables que albergan en su interior embriones con claras alteraciones morfológicas (Figuras R.17, R.18, R.21 y R.22), lo que sugiere la posible implicación de HAB2 en la morfogénesis de las semillas. Por este motivo, decidimos analizar los patrones de expresión de los diferentes miembros de la familia PYR1/PYL-RCAR, encontrando que tanto PYL3 (At1g01360) como PYL9 (At1g7300) presentaban una expresión en la semilla similar a HAB2 (Figura R.36a). El análisis mediante BiFC de la posible interacción entre HAB2 y las dos proteínas de la familia PYR1/PYL-RCAR con una expresión mayoritaria en semillas, PYL3 y PYL9, ha mostrado reconstrucción de la proteína YFP mediante la detección de fluorescencia, lo que indica la existencia de interacción entre ellas (Figura R.36b). Puesto que PYL3 es el único miembro cuya expresión solamente se detecta en la semilla, este resultado sugiere que HAB2 podría participar en la formación del complejo receptor de ABA en la semilla durante la

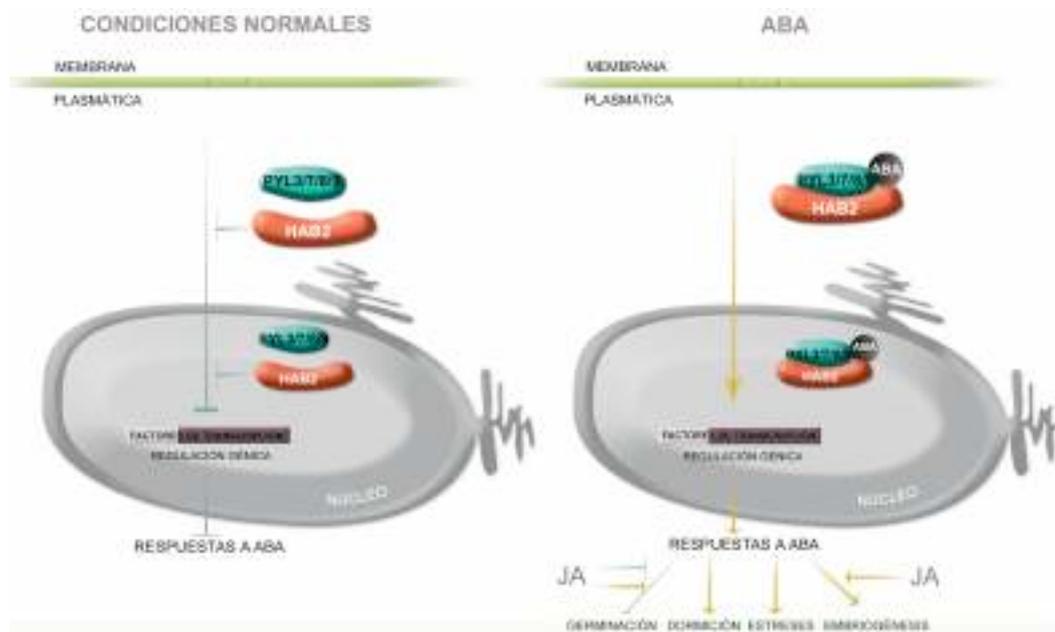
formación del embrión, de modo que mutaciones en la proteína HAB2 pueden generar errores en el programa de desarrollo embrionario, como así se ha demostrado en este trabajo.

Una vez obtenidas pruebas fisiológicas y moleculares de la implicación de HAB2 en la regulación por ABA de diferentes aspectos fisiológicos y del desarrollo, hemos sobreexpresado la proteína HAB2 y su versión mutada *hab2G245E* en *Arabidopsis* con el objetivo de obtener evidencias genéticas adicionales sobre la implicación de HAB2 en las respuestas a ABA y poder determinar el tipo de control que ejerce sobre esta ruta de señalización. Si HAB2 fuera un regulador positivo de la ruta de señalización del ABA, la expresión constitutiva de la proteína nativa y de su versión mutada daría lugar a un respuesta incrementada a la hormona, mientras que si ejerciera un control negativo, observaríamos fenotipos de insensibilidad a la hormona semejantes a los exhibidos por el mutante dominante *hab2*. El análisis de la segregación en higromicina de la T2 muestra que las 2 líneas seleccionadas para cada transgén presentan una sola inserción (Tabla R.2). Adicionalmente, el análisis de expresión mediante Q RT-PCR ha permitido comprobar un mayor nivel de los transcritos correspondientes en las plantas sobreexpresoras que en el tipo silvestre (Figura R.37). La caracterización de la germinación en estas líneas transgénicas en presencia de ABA y de estreses salino y osmótico, nos ha permitido determinar que la expresión constitutiva de HAB2 y de su versión mutada *hab2G245E* genera fenotipos de insensibilidad frente a estas condiciones durante la germinación y el desarrollo temprano de las plántulas mayores que el mutante *hab2* (Figuras R.38 y R.39). En este sentido, ensayos similares en presencia de altas concentraciones de ABA, NaCl y manitol realizados con plantas que sobreexpresan la PP2C HAB1 y su versión mutada HAB1<sup>G246D</sup> han permitido comprobar que son capaces de germinar y desarrollarse en estas condiciones (Sáez et al., 2004; Robert et al., 2006). Asimismo, los análisis de expresión en presencia de ABA completados en plantas transgénicas *35S:GFP:HAB2* y *35S:GFP:hab2G245E*, han mostrado una menor acumulación de transcritos correspondientes a los genes de respuesta a ABA *RD29A-B*, *RAB18* y *P5CSI*, en comparación con el tipo silvestre (Figura R.40). En el caso de las plantas transgénicas *35S:GFP:HAB2* la sobreexpresión de la proteína HAB2 provoca un exceso de PP2C que no puede ser unido por las proteínas PYR1/PYL-RCAR, reprimiendo parcialmente la actividad de las SnRKs. Por su parte, el fenotipo de insensibilidad de las plantas *35S:GFP:hab2G245E* se explica porque, a excepción de la propia PP2C endógena de la planta, la proteína procedente de la sobreexpresión, al no ser inhibida por las proteínas PYR1/PYL-RCAR, va a estar continuamente bloqueando las respuestas a la hormona. Se han obtenido resultados similares al sobreexpresar otras PP2Cs, de modo que la expresión constitutiva tanto de *ABII* y *PP2CA* en maíz como de *HAB1* y su

versión mutada en Arabidopsis, bloquea la inducción de genes reportadores regulados por promotores de respuesta a ABA y provoca un descenso en los niveles de transcritos correspondientes a genes de esta ruta de señalización (Sheen et al., 1998; Sáez et al., 2004).

Estos resultados avalan el papel represor de HAB2, junto con las otras PP2Cs del grupo A, sobre la ruta de señalización del ABA durante la germinación de semillas y los primeros estadios del desarrollo, así como en las respuestas de la planta a diferentes tipos de estreses abióticos y bióticos.

Como conclusión de todos los resultados obtenidos en la realización de esta parte del trabajo en relación a la implicación del ABA y JAs en la germinación y a la función desarrollada por HAB2 en tales procesos, proponemos un modelo hipotético que se representa en la figura D.2. En este esquema se asume que HAB2 es un regulador negativo de la ruta de señalización del ABA en los procesos del desarrollo que tienen lugar en las semillas y en los primeros estadios del crecimiento de las plántulas, de modo que la interacción con las proteínas PYR1/PYL-RCAR tras la percepción del ABA en la célula inactivaría la actividad fosfatasa de la proteína y permitiría que se produzca la transcripción de los genes regulados por ABA y con ello las respuestas a la hormona. El JA, por su parte, presentaría interacciones positivas y negativas con el ABA a través de la proteína receptora de la hormona COI1, regulando algunas de las respuestas controladas por el ABA, tales como la germinación y la embriogénesis.



**Figura D.2. Modelo de la función desarrollada por HAB2 en la ruta de señalización del ABA.** En presencia de la hormona la actividad represora de HAB2 quedaría inhibida al unirse a los receptores PYR1/PYL-RCAR, permitiendo la transcripción de los genes de respuesta a ABA. El JA, por su parte, establece interacciones con el ABA en la inhibición de la germinación de las semillas y durante la embriogénesis.

## 5. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL ANAC089.

El gen *ANAC089* (At5g22290) codifica un factor transcripcional (FT) perteneciente a la familia NAC (NAM-ATAF-CUC). Estas proteínas son únicas del reino vegetal y cuentan con al menos 100 representantes en *Arabidopsis*, si bien, sólo un pequeño número de ellas ha sido estudiado (revisado en Olsen et al., 2005). Se sabe que participan en la regulación de numerosos procesos del desarrollo, así como en respuestas a diversos estreses bióticos y abióticos (Souer et al., 1996; Xie et al., 2000; Collinge et al., 2001). Todas ellas presentan una región muy conservada en el extremo N-terminal denominada dominio NAC, el cual da nombre a esta familia de proteínas (Aida et al., 1997). Aunque la función de dicho dominio todavía no está suficientemente aclarada, diversos estudios indican que puede estar implicado en la unión de la proteína al DNA, si bien el modo en que se produciría este reconocimiento todavía se desconoce (Xie et al., 2000; Duval et al., 2002; Ernst et al., 2004). El análisis de la secuencia aminoacídica de la proteína ANAC089 en la base de datos PlantsP (<http://plantsp.genomics.purdue.edu/html>) ha revelado la existencia del dominio conservado NAC entre los aminoácidos 21 y 164 del dominio N-terminal (Figura R.43b). Asimismo, se ha podido identificar una posible región transmembrana entre los aminoácidos 321 y 334 del extremo C-terminal. A pesar de que el dominio C-terminal de esta familia de proteínas muestra una alta variabilidad y no contiene dominios conocidos (Ooka et al., 2003), el estudio de la estructura de otras proteínas de la misma familia (*ANAC089*, *ANAC060*, *ANAC040*, *ANAC014*, *ANAC062* y *ANAC091*) también ha permitido identificar este tipo de regiones (Figura R.43a). Diversos ensayos llevados a cabo en levaduras y en plantas han demostrado que el extremo C-terminal de varias proteínas NAC podría funcionar como dominio de activación transcripcional. La presencia de repeticiones simples de aminoácidos y la existencia de secuencias ricas en serina, treonina, prolina y glutamina, ambas características propias de dominios de activación en plantas, avalan esta hipótesis (Xie et al., 2000; Ren et al., 2000; Fujita et al., 2004).

Como ya se ha comentado en los apartados anteriores de esta discusión, la germinación de semillas de tipo silvestre (*Col-0*) en *Arabidopsis* se inhibe ante la adición exógena de ABA. Por su parte, las semillas del mutante *anac089-1* y *anac089-2* son capaces de germinar y desarrollar cotiledones verdes en presencia de concentraciones de ABA 1  $\mu$ M (Figura R.44), demostrando tener una sensibilidad reducida a ABA durante esta etapa del desarrollo. La función fisiológica de la proteína ANAC089 en los procesos que regulan la germinación, también se ha comprobado mediante ensayos *in vitro* en presencia del inhibidor de la

biosíntesis de GAs paclobutrazol (PAC). Así, se ha observado que mientras el tipo silvestre muestra una germinación retrasada en presencia de este inhibidor, el mutante *anac089-2* es capaz de desarrollarse en estas condiciones (Figura R.45), lo que indica que requiere menores niveles de GAs que el tipo silvestre para que comience la germinación. En este sentido, puesto que la mutación *anac089-2* reduce la sensibilidad a ABA y los requerimientos de GAs en las semillas, podría tener una importante función fisiológica en la regulación de la germinación.

También se ha indicado con anterioridad en esta memoria, que una de las principales funciones del ABA es la de impedir la germinación cuando las condiciones ambientales que rodean a la semilla no son las adecuadas (González-Guzmán et al., 2002). Existen numerosas evidencias que demuestran que los estreses salino y osmótico retrasan la germinación de las semillas, así como el desarrollo temprano de las plántulas y que el ABA tiene un papel fundamental en estos procesos (López-Molina et al., 2001). Una vez concluida la estratificación, hay un periodo temporal de aproximadamente 60 horas durante el cual el ABA y los estreses abióticos promueven una dormición secundaria evitando el crecimiento de los embriones germinados, si bien siguen siendo viables y pueden continuar el desarrollo cuando las condiciones de estrés han desaparecido (López-Molina et al., 2002). Se ha observado que mutantes alterados en la síntesis del ABA, como *aba2*, o en su señalización, como *abi1-1*, son capaces de germinar y desarrollarse en estas condiciones (Werner y Finkelstein, 1995; López-Molina et al., 2000; González-Guzmán et al., 2002). En este sentido, el mutante *anac089-2* germina y desarrolla cotiledones verdes en presencia de concentraciones inhibitorias de manitol y cloruro sódico mientras que el tipo silvestre muestra un crecimiento muy retrasado cuando es sometido a este tipo de condiciones (Figura R.46), lo que indica que ANAC089 ejerce un papel regulador de las respuestas a este tipo de estreses mediadas por ABA durante la germinación de semillas y los primeros estadios del crecimiento. Anteriormente, otros factores transcripcionales como ABI5 han mostrado ser importantes reguladores de estas respuestas en las etapas iniciales del desarrollo de las plantas, observándose que los niveles de proteína aumentan como consecuencia de un incremento de ABA, desarrollando un papel protector cuando las plántulas se encuentran en estas condiciones (López-Molina et al., 2001). De modo análogo, la expresión del gen *ANAC089* podría inducirse por acción del ABA cuando las semillas/plántulas son sometidas a estos estreses, de modo que la proteína tuviera efectos reguladores sobre la germinación y los primeros estadios del crecimiento hasta que las condiciones ambientales fueran óptimas para el desarrollo.

Con el objetivo de clarificar el papel de *ANAC089* durante la germinación y los primeros estadios del desarrollo, hemos analizado cuál es su lugar de expresión utilizando

plantas transgénicas transformadas con la construcción correspondiente al promotor *ANAC089* fusionado al gen reportador de la  $\beta$ -Glucuronidasa (GUS). De este modo, se ha podido comprobar que tras la imbibición de las semillas, *ANAC089* comienza a expresarse débilmente en el extremo del eje embrionario y una vez que se ha producido la emergencia radicular, se detecta coloración azul en la parte más distal de la raíz (Figura R.47). Un análisis más pormenorizado mediante microscopía D.I.C nos ha permitido comprobar que la expresión está localizada en la zona de la raíz donde se produce una mayor tasa de división celular. Sin embargo, no se ha podido detectar tinción en el centro quiescente, que desempeña un papel fundamental en el desarrollo y organización de los tejidos radiculares y donde la división celular es menos activa (Figura R.47). En ensayos similares realizados para analizar la expresión del gen *ABI5* durante la germinación, han localizado la tinción en el eje embrionario y en células del endospermo. En estas células, niveles elevados de ABA promueven la expresión de *ABI5* y con ello la acumulación de la proteína bajo condiciones de bajos niveles de GAs, evitando la rotura del endospermo y con ello la inhibición de la germinación (López-Molina et al., 2002). Asimismo, se ha comprobado que el gen *RGL2*, un regulador negativo de la germinación y de las respuestas a GAs, muestra un patrón de expresión semejante durante esta etapa del desarrollo (Lee et al., 2002; Piskurewicz et al., 2008). Estos datos indican que *ANAC089* participa activamente en la germinación de las semillas y al igual que otros reguladores de esta etapa como *ABI5* o *RGL2*, podría actuar promoviendo o reprimiendo la germinación, en el caso de que fuera un regulador positivo o negativo, respectivamente.

Los reguladores transcripcionales llevan a cabo su función cuando se encuentran en el núcleo, por lo que suelen presentar señales de localización nuclear (NLS) que dirigen su transporte a este orgánulo una vez que ha concluido su traducción en el citoplasma. En este sentido, la familia de FTs NAC contiene un dominio altamente conservado en el extremo N-terminal que podría actuar como una NLS. Así, en el FT ATAF1 de la familia NAC se ha predicho una NLS en el subdominio D dentro del dominio NAC (Lu et al., 2007). El estudio de la localización subcelular de la proteína *ANAC089*, mediante la transformación transitoria de células de epidermis de cebolla con la construcción *2X35S:GFP:ANAC089* (Figura R.48a), nos ha permitido comprobar que la proteína quimérica GFP-*ANAC089* únicamente se encuentra en el núcleo de las células examinadas (Figura R.48b). La expresión de proteínas de la familia NAC, como *OsNAC5*, *OsNAC6* y *SNAC1* en arroz o *ATAF1* en *Arabidopsis* (Hu et al., 2006; Lu et al., 2007; Nakashima et al., 2007), fusionadas a GFP y reguladas por su propio promotor, por el promotor constitutivo 35S o mediante expresión transitoria en tejidos vegetales de diferentes especies, ha mostrado resultados semejantes.

La regulación de numerosos procesos del desarrollo en plantas es el resultado de la interacción de diferentes familias de FTs. Un gran número de ellos pueden formar selectivamente homodímeros y heterodímeros, contribuyendo a la regulación de la expresión génica. Se ha comprobado que algunos FTs tienen la capacidad por sí mismos de activar la transcripción (transactivación) de los genes que regulan. Así, el análisis de la actividad transcripcional de este tipo de proteínas haciendo uso de la técnica del híbrido simple en levaduras, ha permitido asignar esta función transactivadora a gran número de ellas. De este modo, se pueden encontrar FTs de la familia b-ZIP como AtbZIP10 y AtbZIP25, ambos implicados en la regulación del desarrollo de semillas y en el control de la expresión de genes que codifican proteínas de reserva (Lara et al., 2003) o factores de la familia B3 como FUS3, que en cebada transactivan los promotores de los genes *HOR2* y *ITR1* (Moreno-Risueño et al., 2008). Con el objetivo de estudiar el tipo de actividad transcripcional que presenta ANAC089, hemos llevado a cabo ensayos de transactivación y homodimerización empleando la técnica de doble híbrido en levaduras. El análisis de la actividad  $\beta$ -galactosidasa nos ha permitido observar que el FT ANAC089 funciona como un potente activador transcripcional (Figura R.49). En este sentido, otros FTs de la misma familia como ATAF1 en Arabidopsis, GmNAC11 y GmNAC35 en soja, CarNAC5 en guisante (*Cicer arietinum* L.) y OsNAC5 en arroz (*Oriza sativa*) (Lu et al., 2007; Peng et al., 2009; Hao et al., 2010; Takasaki et al., 2010) también han sido descritos como potentes activadores de la transcripción. Diversos estudios en los que se ha llevado a cabo la fusión de diferentes fragmentos de proteínas de la familia NAC al dominio de unión al DNA de GAL4, han permitido determinar que la actividad transcripcional de estos FTs reside en secuencias aminoacídicas localizadas en el extremo C-terminal, de modo que el dominio conservado NAC no sería el responsable de esta función (Peng et al., 2009; Hao et al., 2010; Takasaki et al., 2010).

Por otro lado, es bien conocida la capacidad que presentan los FTs para formar dímeros integrados por subunidades idénticas (homodímeros) o con miembros de la misma o de diferente familia (heterodímeros) durante la regulación de la expresión génica. En este sentido, se ha demostrado que las proteínas ANAC019 y ANAC092 forman heterodímeros entre sí para llevar a cabo el inicio de la transcripción del DNA y que tal interacción se lleva a cabo a través del dominio NAC (Olsen et al., 2005). Ensayos de *pull down* realizados con la proteína OsNAC5 de arroz ponen de manifiesto su capacidad de formar homodímeros a través del dominio NAC y de interaccionar con OsNAC6 y SNAC1 formando heterodímeros (Takasaki et al., 2010). Al analizar la capacidad de ANAC089 para formar homodímeros, hemos observado actividad galactosidasa en células de levadura co-transformadas con las

construcciones BD-ANAC089 y AD-ANAC089 en presencia de concentraciones de 3-aminotriazol (3-AT) inhibitorias de la autoactivación mostrada por este FT (Figura R.49).

La capacidad de ANAC089 para activar la transcripción del gen reportador *LACZ* en levaduras, junto con la localización nuclear de la proteína observada tras llevar a cabo la expresión transitoria de la proteína en células de epidermis de cebolla, indica que ANAC089 actúa como un activador de la transcripción y que lleva a cabo la regulación de la actividad génica a través de la formación de homodímeros. En cualquier caso, serán necesarios más estudios para clarificar si esta proteína es capaz de interactuar con otras proteínas formando heterodímeros en su unión a secuencias específicas del DNA.

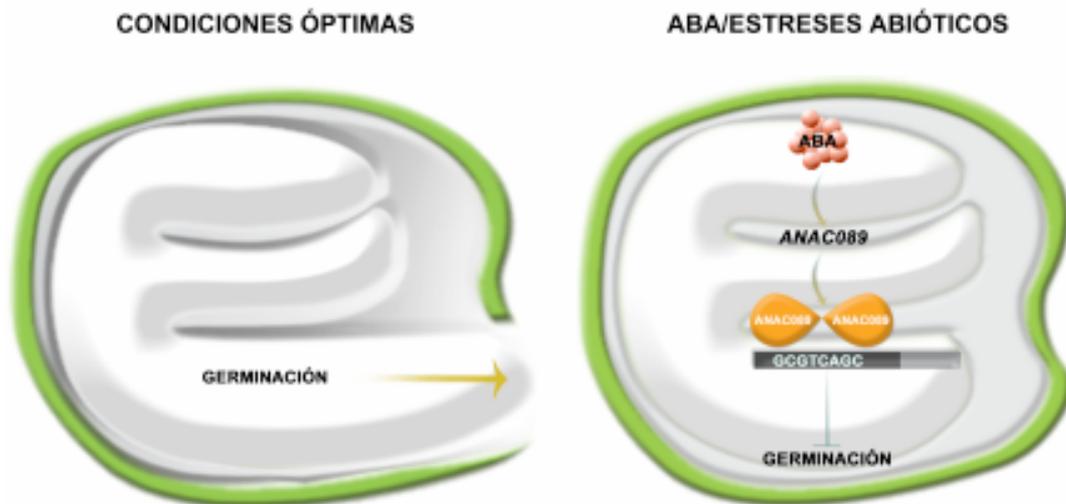
El perfil transcriptómico de las respuestas a ABA en semillas del mutante *anac089-2* durante la germinación, comparado al del tipo silvestre, así como el meta-análisis realizado con los datos obtenidos, confirman el papel regulador de ANAC089 en la señalización de esta hormona. El análisis transcriptómico (Tablas A.II y A.III) ha mostrado un elevado número de genes reprimidos en el mutante respecto al tipo silvestre y que presentan expresión diferencial en respuesta a la adición exógena de ABA (Tabla R.4). El propio gen *ANAC089* mostró el mayor nivel de represión, validando de este modo los resultados de este experimento e indicando que está positivamente regulado por ABA. El agrupamiento jerárquico de los genes nos ha permitido comprobar que en los grupos VI, VII y VIII se incluyen aquéllos diferencialmente expresados entre el mutante y el tipo silvestre en respuesta a la hormona (Figura R.50). Entre estos genes, aparece una elevada representación que codifican proteínas reguladoras de situaciones de estrés. Este resultado coincide con lo observado en el Capítulo I de la presente memoria y en estudios anteriores, en los que se ha comprobado que el ABA induce la expresión de genes de respuesta a estreses abióticos regulando negativamente la germinación de semillas y el desarrollo temprano de las plántulas ante condiciones tales como la sequía, bajas temperaturas o estreses salino y osmótico, de modo que mutantes deficientes en la síntesis de ABA o en la transducción de su señal, son más tolerantes a la presencia de este tipo de situaciones (González-Guzmán., 2002). Como ya se ha comentado anteriormente, el mutante *anac089-2* mostraba una menor sensibilidad a la presencia de estreses osmóticos y salinos durante la germinación y los primeros estadios del desarrollo que el tipo silvestre, lo que concuerda con la disminución en los niveles de expresión de genes positivamente regulados por ABA que modulan las respuestas a este tipo de estreses, tales como *RD29B* (At5g52300), *STZ* (*Salt tolerante Zinck Finger*, At1g27730) *ERD5* (*Early Responsive to Dehydration*, At3g30775) y un gen con dominio DRE2B (At2g38340) identificados en el presente análisis transcriptómico. También aparecen representados genes reguladores de las

respuestas frente a estreses bióticos como *PR4* (*Relacionado con la Patogénesis 4*, At3g04720) y At1g47540 (un inhibidor de tripsina). Recientemente, se ha demostrado que el ABA es un importante regulador de las respuestas frente a estreses bióticos, existiendo en ocasiones una correlación negativa entre los niveles de esta hormona y la resistencia al ataque de algunos patógenos, mientras que en otros casos regula positivamente la activación de este tipo de respuestas (revisado en Ton et al., 2009). Además, dos de los genes más fuertemente reprimidos son *12-oxophytodienoate reductase* (*OPR1*, At1g76680) y *OPR4* (At1g76680), ambos implicados en la biosíntesis de JA, principal fitohormona reguladora de las respuestas frente a estreses bióticos. De hecho, estreses abióticos como la exposición al ozono pueden provocar muerte celular, sugiriendo que genes implicados en respuestas a estreses abióticos pueden estar relacionados con procesos de defensa frente al ataque por patógenos (Adie et al., 2007). Análogamente, se ha propuesto que la deshidratación forma parte de las respuestas frente a la producción de heridas (Reymond et al., 2000, 2004). En este sentido, se han identificado dos proteínas de la familia NAC, ANAC019 y ANAC055, que participan en la regulación de las respuestas a ABA y a JA. Así, se ha comprobado que ambos genes están inducidos por sequía, salinidad y por la adición exógena de ABA, y que plantas transgénicas sobreexpresoras de una u otra proteína muestran una mayor tolerancia a la sequía que plantas del tipo silvestre. Por otro lado, los niveles de expresión de ambos genes aumentan tras la adición de JA y actúan como activadores transcripcionales de los genes *VSP1* y *LOX2* inducidos por JA, lo que indica que ANAC019 y ANAC055 podrían también participar en la regulación de la interacción entre ambas rutas de señalización (Jiang et al., 2009). Estos resultados sugieren que *ANAC089* se induce en presencia de ABA y que es necesario para que se produzca la expresión de genes relacionados con la germinación en respuesta a estreses, lo que coincide con lo observado anteriormente para otros FTs de la familia NAC como ANAC019, ANAC055 y ANAC072, en los que su expresión está fuertemente inducida por tratamientos con ABA, NaCl y deshidratación y cuya sobreexpresión aumenta los niveles de transcritos correspondientes a genes de respuesta a estreses (Tran et al., 2004).

Los ensayos posteriores para identificar las secuencias *cis* consenso de las cajas promotoras de genes regulados por ANAC089 mediante micromatrices de unión a proteínas fusionadas a la proteína de unión a la maltosa (PBM) (Godoy et al., 2010) han revelado la existencia de la secuencia consenso GCGTCAGC como posible diana de unión de la proteína (Figura R.51). De modo interesante, se ha podido comprobar la existencia de esta secuencia en los genes diferencialmente expresados *RD29B*, *ERD5*, *RHL41* (*Responsive to High Light 41*, At5g59820) y una proteína de respuesta a ABA con dominio GRAM (At5g13200), convirtiéndose en posibles dianas directas de ANAC089. Ensayos similares muestran otros FTs

similares de la familia NAC, como IDEF2, en arroz reconocen secuencias reguladoras presentes en genes de respuesta a estreses abióticos relacionados con la homeostasis de hierro (Ogo et al., 2008). En este sentido, el FT ANAC019 en Arabidopsis, cuya expresión se ve fuertemente inducida por estrés salino y sequía, se une al elemento *cis* CACG descrito en las región promotora del gen *ERD1*, implicado en este tipo de estreses (Tran et al., 2004).

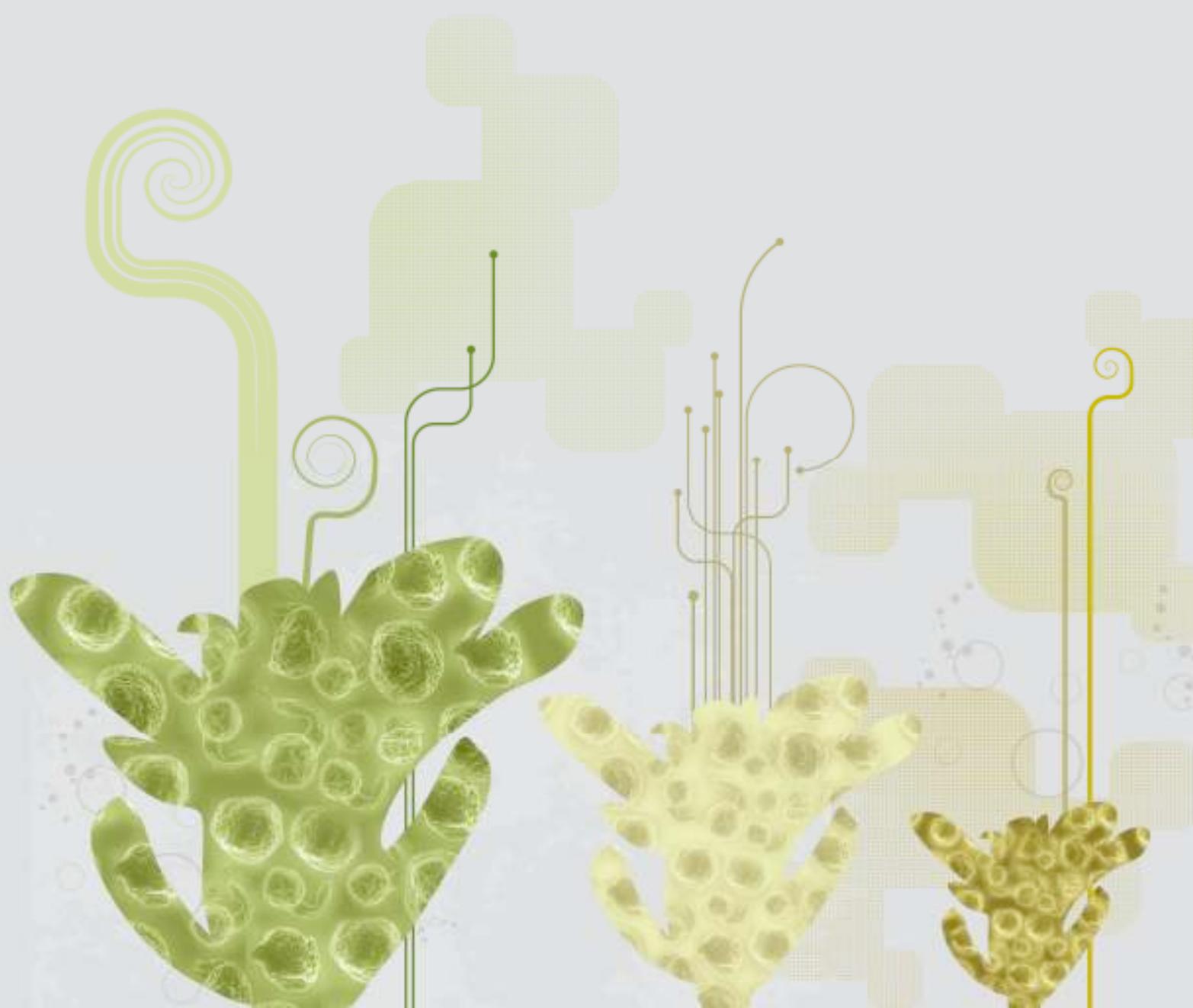
Todos los resultados obtenidos en esta última parte del trabajo indicarían que un aumento en los niveles de ABA provocados por estreses abióticos (como estrés salino u osmótico) inducen la expresión de *ANAC089*, y formando complejos homodiméricos, se uniría a secuencias GCGTCAGC presentes en cajas promotoras de genes de respuesta a ABA que regulan negativamente la germinación de semillas ante condiciones ambientales adversas (Figura D.3).



**Figura D.3. Modelo hipotético de la función desarrollada por ANAC089 en la ruta de señalización del ABA durante la germinación de semillas.** En condiciones de estrés se produce un incremento en los niveles de ABA, lo que va a provocar un aumento en los niveles de transcrito del gen *ANAC089*. ANAC089 formaría homodímeros que se van a unir a la secuencia *cis* GCGTCAGC presente en promotores de genes de respuesta a ABA que actúan como represores de la germinación de las semillas en condiciones adversas.

# Conclusiones

Conclusiones





Los resultados obtenidos de las búsquedas de nuevos mutantes con sensibilidad reducida a ABA y del aislamiento y caracterización de una proteín-fosfatasa de tipo 2C (PP2C) y de un factor transcripcional de la familia NAC, ambos regulados por ABA y relacionados con la germinación de semillas, nos han permitido llegar a las siguientes conclusiones:

1. Las fitohormonas ABA y JAs presentan interacciones durante la regulación de la germinación de semillas en *Arabidopsis thaliana*. Por un lado, se establece una relación sinérgica entre ambas hormonas en la inhibición de la germinación de semillas del tipo silvestre Col-0, mientras que por otra parte, existe una interacción negativa determinada por la hipersensibilidad del mutante *coi1-16* en presencia de bajas concentraciones de ABA, debida al bloqueo de la vía de degradación de proteínas por el proteosoma, donde un hipotético represor o complejo represor de la germinación sería funcionalmente activo.
2. Las dos estrategias de búsqueda de nuevos mutantes implicados en la señalización del ABA, así como las condiciones empleadas en este trabajo, han resultado ser apropiadas. La utilización del fondo genético mutante *coi1-16*, insensible a JA e hipersensible a ABA y el uso específico de uno de los enantiómeros de la molécula de ABA, han permitido aislar mutantes afectados en las respuestas a la hormona previamente descritos, entre ellos *abi1-1*, *abi3*, *abi4* y *abi5*, así como dos nuevas mutaciones, cuyo correspondiente cartografiado genético ha dado lugar a la identificación de los genes *HAB2* y *ANAC089*.
3. *HAB2* codifica una proteín-fosfatasa de tipo 2C (PP2C) que participa en la regulación de la señalización del ABA durante los procesos del desarrollo y las respuestas a estreses. El mutante *hab2* presenta bajos niveles de dormición, es insensible a la adición exógena de ABA y PAC durante la germinación y los primeros estadios del desarrollo, así como a la presencia de estreses abióticos por cloruro sódico y manitol. Asimismo, muestra una mayor susceptibilidad al ataque de patógenos necrotrofos como *Pythium ultimum* y *Botrytis cinerea*, suprimiendo la hipersensibilidad de *coi1-16* frente al ataque por este último. Además, el doble mutante *hab2;coi1-16* genera semillas con claros defectos morfológicos que albergan embriones inviábiles en su interior, demostrando la posible implicación del ABA y los JAs en el desarrollo y formación de las semillas.
4. Los ensayos de interacción proteína-proteína empleando la técnica de complementación bimolecular fluorescente (BiFC), muestran que la proteína HAB2 es capaz de interactuar con varios componentes de la familia de proteínas PYR1/PYL-RCAR, descritas como

receptores de ABA y que la interacción se produce tanto en el núcleo como en el citoplasma, concordando con lo observado en los ensayos de localización subcelular mediante transformación transitoria de tejido vegetal y el uso de plantas transgénicas sobreexpresoras de *HAB2*. Por otro lado, la mutación *hab2G245E* impide la formación del complejo receptor de ABA entre la PP2C y las proteínas PYR1/PYL-RCAR, sin provocar cambios en la distribución subcelular de la proteína, apoyando la participación de *HAB2* en la percepción de la hormona.

5. La mutación dominante hipermórfica *hab2*, así como la sobreexpresión del gen *HAB2* y de su versión mutada, generan fenotipos similares de insensibilidad a ABA durante la germinación de semillas y los primeros estadios del desarrollo post-germinativos en presencia de ABA y bajo condiciones de estrés osmótico y salino. Además, el análisis molecular de estas líneas ha permitido comprobar la reducida expresión de genes de respuesta a la hormona, demostrando ser un regulador negativo de la señalización del ABA en este tipo de procesos.

6. ANAC089 se ha aislado en una búsqueda de mutantes insensibles utilizando el enantiómero (+)-*S*-ABA y codifica un factor transcripcional perteneciente a la familia NAC, que ha mostrado tener localización nuclear dentro de la célula y potente actividad transcripcional. Los ensayos de transactivación y dimerización confirman que ANAC089 es un fuerte activador de la transcripción con capacidad de formar homodímeros para regular la expresión génica.

7. El diseño de un perfil transcriptómico en semillas del mutante *anac089-2* y la búsqueda de elementos reguladores *cis* consenso reconocidos por ANAC089, han mostrado su papel regulador en la ruta de señalización del ABA. Los resultados obtenidos en el análisis transcriptómico en semillas del mutante en respuesta a ABA y la identificación de la secuencia reguladora GCGTCAGC de unión de la proteína ANAC089, indicarían que un aumento en los niveles de ABA provocados por estreses abióticos, como estrés salino u osmótico, inducen la expresión de *ANAC089*, que a través de la formación de complejos homodiméricos, se uniría a la secuencia presente en las cajas promotoras de genes de respuesta a ABA, regulando negativamente la germinación de semillas ante condiciones ambientales adversas.

8. Como conclusión final, podemos decir que los resultados presentados en esta memoria sobre los efectos del ABA y los JAs y su interacción en los procesos de formación y germinación de semillas, así como en la regulación de estreses abióticos y bióticos, nos han permitido demostrar la participación de la PP2C *HAB2* como un regulador negativo y del FT ANAC089 como un regulador positivo de la ruta de señalización del ABA.

**UNIVERSITY OF SALAMANCA**  
**Division of Plant Physiology**  
**Faculty of Biology**



**FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF NEW  
MOLECULAR PLAYERS INVOLVED IN ABSCISIC  
ACID (ABA) SIGNALING DURING SEED  
GERMINATION IN *Arabidopsis thaliana***

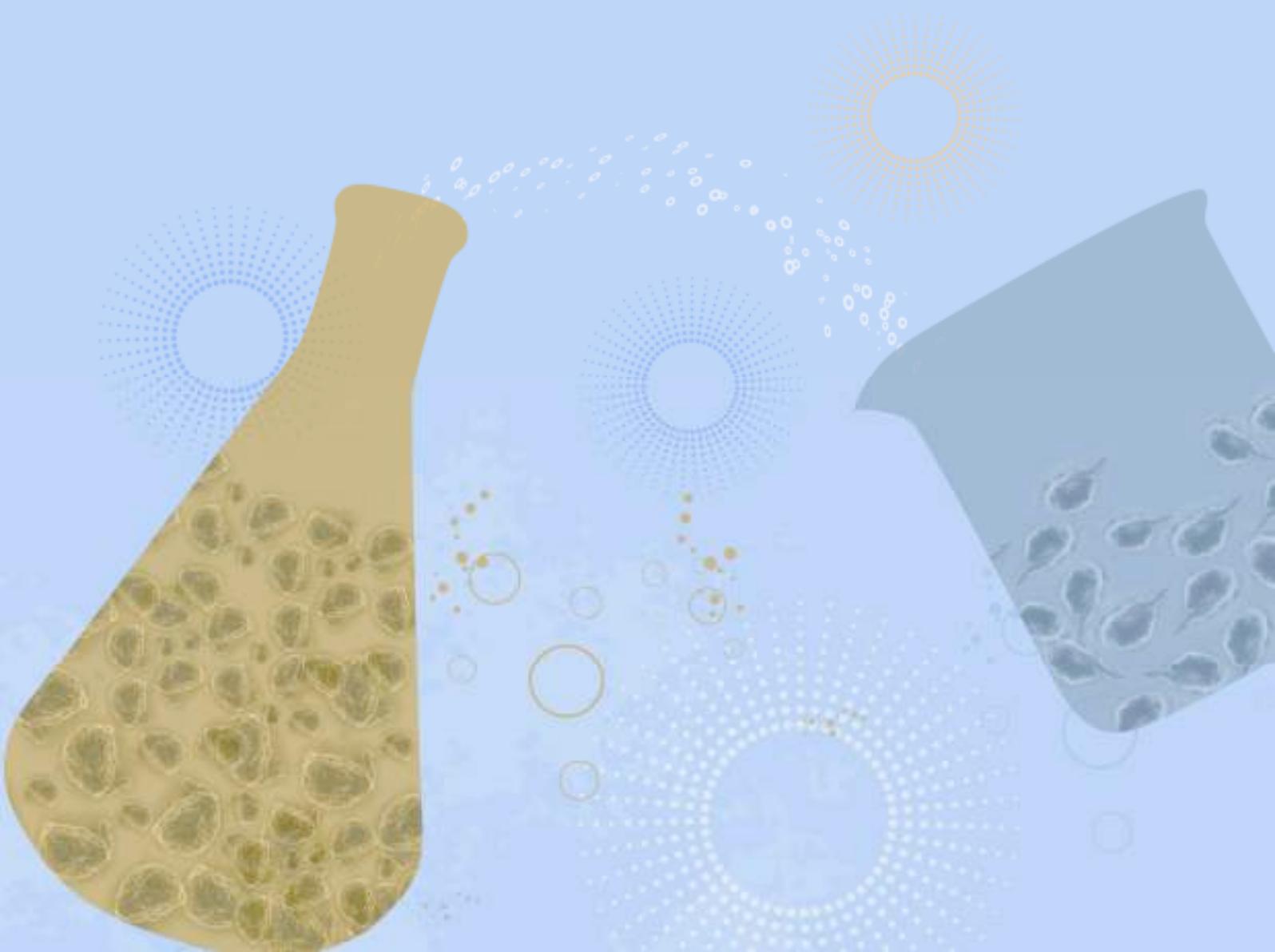
**PhD Thesis**  
**Doctor Europeus Mention**

**ALEJANDRO FERNÁNDEZ ARBAIZAR**

**SALAMANCA, January 2011**

# Summary

Summary



## 1. INTRODUCTION

Seed biology is a highly topical subject in Plant Physiology research. Essential regulatory molecules, such as abscisic acid (ABA) and jasmonates (JAs), have been related to seed germination. However, most of the molecular bases of the ABA and JAs action during this developmental cue are currently unknown.

The phytohormone ABA is a key regulator of many physiological processes during the plant life. For example, ABA has been shown to play an important role in seed formation, establishment and maintenance of dormancy and inhibition of germination in seeds (Koornneef and Karssen, 1994; Bewley, 1997), later on in the early seedling growth arrest under unfavourable environmental conditions (Lopez-Molina et al., 2001; González-Guzmán et al., 2002) and recently, also found to have a prominent role in disease resistance (reviewed by Mauch-Mani and Mauch, 2005; Ton et al., 2009). ABA signaling pathway has been greatly improved since the identification of the 14 member protein family of PYR1-PYL (Pyrabactin Resistance 1-PYR-like)/RCAR (Regulatory Component of ABA Receptor) regulators of clade A type 2C protein phosphatases (PP2Cs) (Park et al., 2009; Ma et al., 2009). Using biochemical and genetic approaches, Park et al. (2009) and Ma et al. (2009) found that ABA promotes the interaction of PYR1/RCAR with group A PP2Cs leading to the inhibition of PP2C activity. According to these results, it was concluded that PYR1, PYLs and RCARs form a large subfamily of cytosolic ABA receptors of the BetV I family that act by binding and inhibiting PP2Cs (Fig. I.5 on p.23). Furthermore, an ABA-triggered reversible protein phosphorylation cascade mediating ABA responses also includes the serine/threonine protein kinases SnRK2.6/OST1 (Fujii et al., 2009), SnRK2.2 and SnRK2.3 (Nishimura et al., 2010). The crystal structure of PYR1 (Santiago et al., 2009), PYL1 (Miyazono et al., 2009) and PYL2 (Melcher et al., 2009) has established the structural basis of the mechanism of ABA perception and characterization of independent members of the receptor family, evidencing the complexity to fine-tune ABA responses.

Transcriptome analysis have provided powerful tools for the discovery of ABA-responsive genes. The Arabidopsis kinases OST1, SnRK2.2, SnRK2.3 and SnRK2.8 phosphorylate *in vitro* a motif in the *basic-leucine zipper* (b-ZIP) transcription factors including ABA Responsive Element Binding protein (AREB)1, AREB2 and ABI5 (Furiihata et al., 2006). Recently, additional DNA-binding proteins interacting with *cis*-elements involved in ABA responses, such as ABRE motifs, have been identified as NAC transcription factors

(Tran et al., 2004). An example is the NAC transcription factor codified by the *RD26* gene, which is induced by drought, salinity, ABA and JA treatments (Fujita et al., 2004).

Jasmonates (jasmonic acid and other oxylipin derivatives) are lipidic hormones derivated from fatty acids with a key role in plant responses to environmental stresses and biotic challenges, such as ozone exposure, wounding, water deficit, and pathogen and pest attack. Additionally, they are involved in several developmental processes like root growth, fruit ripening, tendril coiling, reproductive development and senescence (Farmer et al, 1992; Rao et al., 2000; Huffaker et al., 2006; Kong, 2006; Wasternack, 2007; Suza and Staswick, 2008). The best known JAs are jasmonic acid (JA), methyl jasmonate (MeJA), jasmonyl-isoleucine (JA-Ile) and oxo-phytodienoic acid (OPDA). However, only several JAs are biologically active. The JAs known to possess biological activity are: (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine, that seems to play a major role in JA signaling in *Arabidopsis* leaves and flowers (Fonseca et al., 2009), jasmonoyl-L-tryptophan, an auxin signaling inhibitor in *Arabidopsis* roots (Staswick, 2009) and OPDA, with signaling properties independent of JAs signaling (Stinzti et al., 2001) or using part of the JA signaling machinery (Ribot et al., 2008). JAs biosynthesis take place mainly in the cytosol, plastids and peroxisome and can be stimulated by a range number of stresses, including biotic stresses, wounding, water deficit and several developmental processes such as tendril coiling (Kramell et al., 1997; Parchmann et al., 1997; Creelman and Mullet, 1997).

Dissection of the JAs signaling pathway showed two different steps (Chini et al., 2007). The first one includes components and regulators of SCF (Skip/Cullin/F-box) E3 ubiquitin ligases complex ( $SCF^{COI1}$ ). The second step is defined by transcription factors (MYC2 and ERF1, for example) which regulate the expression of JA response genes. Recently, it has been described the link between these two steps. The activation of JAs responses by transcription factors requires ubiquitin degradation of a repressor downstream JA perception. One of these  $SCF^{COI1}$  complex targets is JAI3 (jasmonate insensitive 3) which belongs to the JAZ (jasmonate ZIM-domain) family protein. Under normal growth conditions, JAI3 is able to interact with MYC2 and repress it. When environmental or developmental signals trigger JA signaling, JAI3 (and other JAZ proteins) is targeted to the 26S proteasome by the  $SCF^{COI1}$ , linking ubiquitin-mediated protein degradation to transcriptional activation of JA responses by MYC2 (Fig. 1.8 on p.37). Genetic and biochemical approaches have discovered that COI1 protein is the JA receptor, showing that loss of COI1 function leads to JA insensitive phenotypes (Feys et al., 1994) and direct binding of JA-Ile to COI1 (Yan et al., 2009).

For most of developmental processes and stress situations, the precise plant response is not only activated by one hormone, but is the result of a complex network of interactions among different signaling pathways (Lorenzo and Solano, 2005). Several examples of crosstalk between ABA and other hormonal transduction pathways, such as gibberellins (GAs), ethylene (ET), salicylic acid (SA), auxins or jasmonates (JAs), have been reported. Germination is a clear example of this type of regulation since there are direct evidences for the involvement of ABA in blocking seed germination. In contrast, GAs are known to be involved in the initiation of germination. Essential hormones in other plant developmental processes have also been related to germination events, i.e. auxins, ET, brassinosteroids and JAs (reviewed by Finkelstein et al., 2002; Brady et al., 2003) (Fig. I.2 on p. 13).

## 2. AIM OF THE WORK

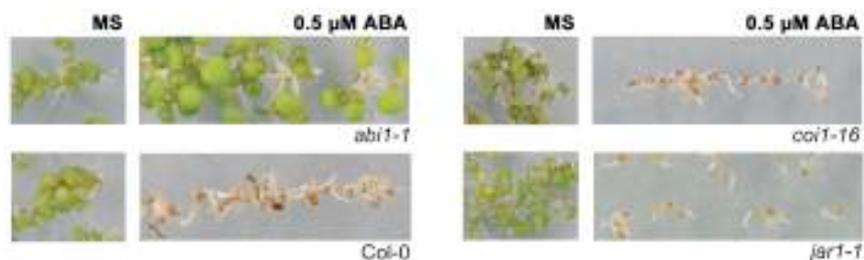
The major aim of this work is to find new members involved in ABA signaling pathway using two different approaches:

1. It is known that alterations in a concrete signal transduction pathway can affect the sensitivity of the plant to another hormonal signaling pathway. The first part of this work will include the following objectives:
  - Isolation of mutants affected in ABA responses during seed germination and early development carrying out a new screening strategy using the JA-insensitive and ABA-hypersensitive background *coi1-16*.
  - Identification and characterization of the mutants isolated.
2. Differences in activity or perception between the natural (+)-*S*-ABA and the unnatural (-)-*R*-ABA enantiomer have been observed. Dr. Eiji Nambara et al. (unpublished) performed a sensitized genetic screening using (+)-*S*-ABA and isolated a transcription factor belonging to the NAC family protein. The main objective will focus on the physiological and molecular characterization of the *nac* mutant and the codified protein using transcriptomic tools.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### Chapter I: Isolation and characterization of the clade A PP2C HAB2 protein.

One of the most important physiological effects of ABA is the inhibition of seed germination (Fig. R.1 on p.101). It is well known that there are complex crosstalk between phytohormones during regulation of many developmental processes. In this regard, JAs play a role in the regulation of seed germination cooperating with ABA, with positive and negative interactions during this developmental cue. It has been demonstrated that JAs inhibit seed germination in several species and show a synergistic effect with ABA in *Arabidopsis* (Wilén et al., 1991; Staswick et al., 1992; Ellis and Turner, 2002). On the other hand, several JA insensitive mutants such as *coi1-16* and *jar1-1* show ABA hypersensitive phenotypes during seed germination indicating a negative crosstalk between ABA and JA (Staswick et al., 1992; Ellis and Turner, 2002). When *coi1-16* and *jar1-1* seeds were sowed in medium containing 0.5  $\mu$ M ABA they displayed delayed germination and absence of green cotyledons (Fig.1).

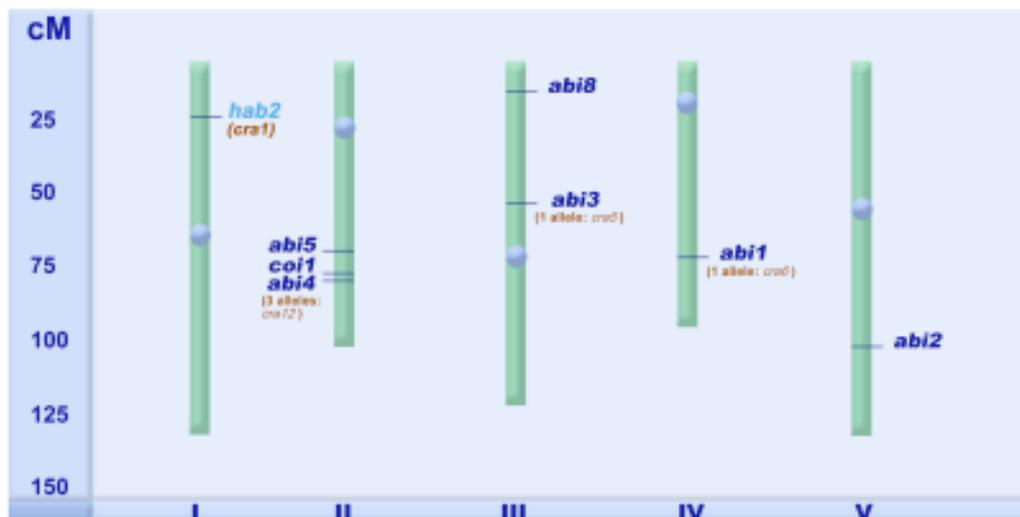


**Figure 1. ABA responses of JA insensitive mutants during seed germination.** Picture shows 6 day-old-seedlings of the wild type (*Col-0*), the ABA insensitive mutant *abi1-1* and the JA insensitive mutants *coi1-16* and *jar1-1* exhibiting ABA hypersensitivity during seed germination and early development.

On the basis of this negative crosstalk between ABA and JAs and the knowledge that alterations in a specific signal transduction pathway may affect plant sensitivity to other hormonal signaling pathways (Lorenzo and Solano, 2005), we decided to use an ABA-hypersensitive background to isolate mutants affected in ABA responses. With this purpose and in order to get deeper insight about ABA responses intermediates, we have developed a

screening strategy to find novel ABA resistant mutants during seed germination and early development using the JA insensitive and ABA hypersensitive background *coi1-16*. Screening of 105,000 M2 seedlings from 17 M1 EMS-mutagenized *coi1-16* families, yielded 72 M2 new putative mutants able to suppress the *coi1-16* ABA-hypersensitive phenotype during germination when sowed in MS medium containing low concentrations of ABA (0.5  $\mu$ M). The isolated mutants were named *cra* (*coi1-16* resistant to ABA) (Fig. M.3 on p.84).

Chromosomal localization of *cra* mutants using molecular markers (SSLPs and CAPs) (Fig.2) together with analysis of allelism and complementation tests have uncovered the previously identified *abi1-1* mutant and new alleles of the *abi3* and *abi4* mutants. In addition, we have identified one dominant hypermorphic mutation located in the higher arm of Chromosome I, that affects the *HAB2* gene (At1g17550), which encodes a clade A PP2C.



**Figure 2. Chromosomal localization of *cra* mutants using molecular markers (SSLPs and CAPS).** We have isolated the previously described *abi1-1* mutant and new alleles of *abi3* and *abi4* mutants. In addition, we have identified a mutation affecting the *HAB2* gene.

Protein phosphatases (PPs) are involved in reversible protein phosphorylation and catalyze the release of phosphate from serine, threonine or tyrosine residues. These proteins constitute a complex group, highly conserved along evolution and with a great structural and functional diversity. Among them, PP2Cs belong to a class of conserved serine/threonine protein phosphatases involved in stress responses in plants, yeasts, and animals (reviewed by Rodriguez et al., 1998). Plant PP2Cs, as demonstrated by studies with *Arabidopsis*, are key elements in ABA signal transduction, more precisely in abiotic stress responses, and play a crucial role as regulators of seed dormancy (Leung et al., 1994; Meyer et al., 1994). A multiple

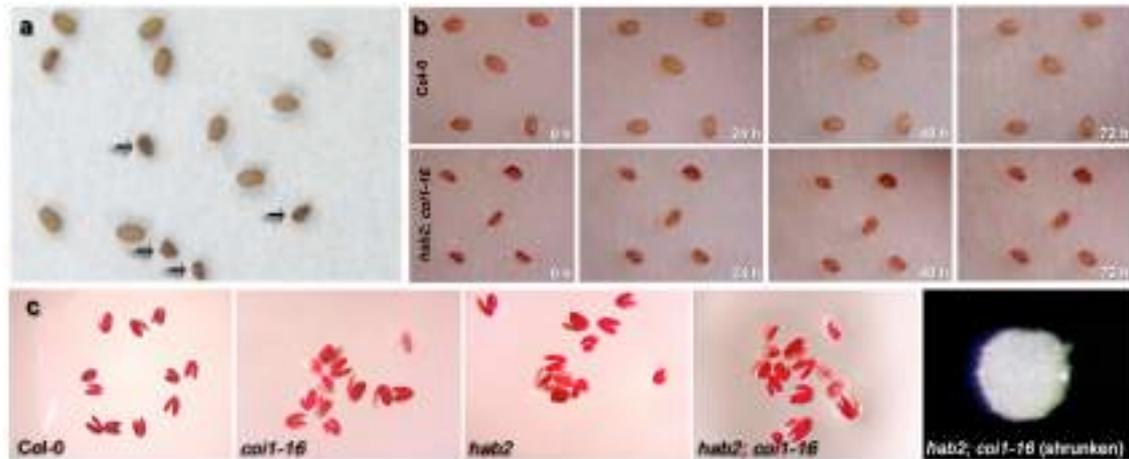
sequence alignment of PP2Cs catalytic domain reported by Kerk et al. (2002) reveals distinct clusters of plant and non-plant sequences. One of the clusters (clade A) contains PP2Cs physiologically characterized and proposed to participate in ABA signaling, in particular, Arabidopsis ABI1, ABI2 (Merlot et al., 2001), HAB1 (Saez et al., 2004) and PP2CA (Sheen, 1998; Tahtiharju and Palva, 2001).

*hab2* dominant mutation results in a Gly-Asp substitution within the catalytic domain of the protein. Other dominant mutations affecting the clade A PP2C proteins, such as *abi1-1* and *abi2-1* result in equivalent Gly-Asp amino acid substitution (Leung et al., 1997; Rodríguez et al., 1998).

Double mutant *hab2;coil-16* produces colourless seeds (Fig. R.17 on p.121) within immature siliques and shrunken seeds (Fig.3a) after desiccation phase which did not germinate. However, the simple parental mutants *hab2* and *coil-16* did not exhibit abnormal seeds. The shrunken seeds exhibited delayed imbibition compared with WT seeds (Fig.3b). The embryos excised from imbibed dry seeds were small, irregular in shape and lacked radicle and cotyledons. This result indicates that embryo differentiation was initiated but arrested during seed development in this double mutant. To examine if these embryos were viable, a tetrazolium salt (TZ) test was conducted. Embryos excised from rehydrated shrunken seeds were not stained with TZ at all (Fig.3c), demonstrating that were not viable after the desiccation phase.

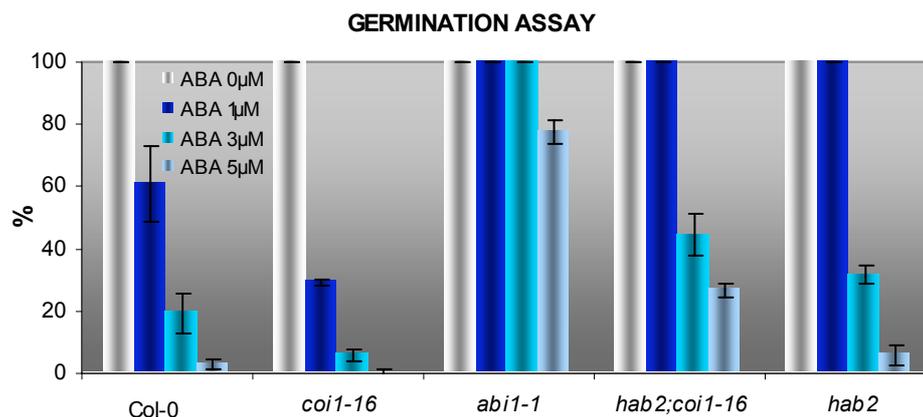
To characterize these phenotypes, mutant embryos were observed by differential interference contrast (DIC) and using scanning electron microscopy images (S.E.M.) once excised from imbibed seeds, observing irregular shaped embryos (Figs. R.21 and R.22 on p. 124 and 125 respectively). Although mutant embryos grew larger than WT globular embryos, they did not differentiate into regular heart or torpedo embryos indicating that the cell organization in transition/heart-like mutant embryos was aberrant. In addition, the suspensor in the double mutant embryos became enlarged. Previously, it has been reported the existence of mutants which exhibit lacked cotyledon formation such as *laterne* mutant (Trembl et al., 2005) and suspensor enlargement, like *raspberry 1, 2* and *3* (Yadegari et al., 1994; Apuya et al., 2002). Several mutants with aberrant embryo development, such as *pin1-1* or *laterne* show altered auxin transport during early development (Okada et al., 1991; Trembl et al., 2005). This hormone plays a key role in the establishment of embryo axis and in the cotyledon formation. Altogether, these results suggest that polar auxin transport in the *hab2;coil-16* mutant embryos could be impaired during embryogenesis arresting the establishment of the embryo axis. In this way, several studies carried out in Arabidopsis, carrot and mustard demonstrated that

inhibition of polar auxin transport avoids cotyledon formation and the transition to heart stage, leading to the formation of large globular embryos (Schiaivone and Cooke., 1987; Okada et al., 1991; Liu et al., 1993), with similar phenotypes to *hab2;coil-16* aberrant embryos.



**Figure 3. a)** Double mutant seeds showing WT and shrunken phenotypes (arrows). **b)** WT and shrunken double mutant seeds imbibed for 0h, 24h, 48h and 72h. **c)** Tetrazolium salt (TZ) test: Col-0, *coil-16*, *hab2*, *hab2;coil-16* (viable) and *hab2;coil-16* (shrunken) embryos were stained by 0.5% (w/v) 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride solution.

Clade A PP2C proteins are well known ABA negative regulators during seed dormancy, germination and stress responses. Thus, we analyzed seed germination in the simple mutant *hab2* and in the double mutant *hab2;coil-16* in MS medium supplemented with ABA and compared it with that of Col-0, *coil-16* and *abil-1* (Fig.4). Previously, it has been described that dominant-type PP2C mutants, such as *abil-1* and *abi2-1*, are ABA insensitive during seed germination, even when the medium contains high concentrations of the hormone (Koornneef et al., 1984). Dose-response analysis using different ABA concentrations (0.5, 1, 3 and 5  $\mu$ M) have shown that *hab2* mutant is ABA insensitive during seed germination while Col-0 displayed delayed germination and seedling development when the medium was supplemented with 1  $\mu$ M ABA. However, *hab2* germination and early development are also delayed in presence of higher concentrations of the hormone. The double mutant *hab2;coil-16* showed a higher germination percentage compared to the simple mutant *hab2*, indicating that the *hab2* mutation is able to suppress *coil-16* ABA hypersensitivity during this developmental cue.



**Figure 4. Germination assays in *hab2* and *hab2;coi1-16* mutants.** Percentage of seed germination in MS medium (white columns) or supplemented medium (0, 1, 3 and 5  $\mu$ M ABA, blue columns). Seeds were scored 7 days after sowing. Error bars represent  $\pm$  SD of three independent experiments.

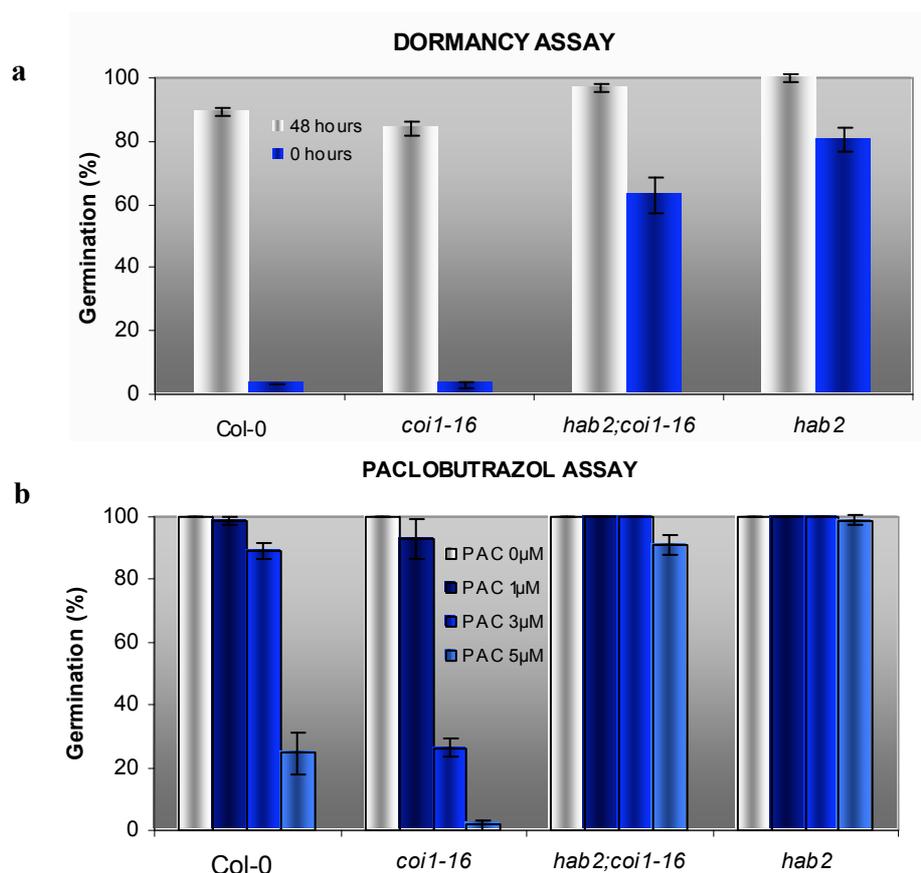
Mature Arabidopsis seeds exhibit primary dormancy when are freshly released from the mother plant, which means that seeds are not able to germinate under the appropriate conditions unless they are treated with dormancy-breaking treatments such as stratification (4°C) or GAs (Koornneef and Karssen, 1994). It is well known that ABA deficient or insensitive mutants are less dormant than WT, while transgenic plants overexpressing ABA biosynthetic genes showed a marked seed dormancy (Karssen et al., 1983; Koornneef et al., 1984; Leon-Kloosterzielet al., 1996). To analyze the degree of dormancy in *hab2* mutant we compared germination of freshly harvested seeds in response to two different cold treatments at 4°C (0 hours and 48 hours) and compared with that of Col-0 and *coi1-16* (Fig.5a). As a result, WT and *coi1-16* were not able to germinate unless they were stratified. In contrast, *hab2* showed low degree of dormancy reaching 80% germination after 5 days of sowing (Fig.5a).

Seed dry storage is an after ripening breaking-dormancy treatment, in which ABA is cleaved by ABA 8'-hydroxylases within the seed, promoting germination (Ali-Rachedi et al., 2004; Jacobsen et al., 2004; Kushiro et al., 2004). Once seeds were after-ripened, *hab2* and WT seeds showed germination at similar rates under normal conditions. When we checked germination in 1 month-storage seeds in Col-0 and *coi1-16*, we observed that they reached almost 100% germination. In addition, *hab2* mutant also showed complete germination after this treatment, indicating that after ripening mechanisms are active in the mutant (Fig. R.24b on p.128).

To further characterize this phenotype, we analyze *hab2* germination in response to paclobutrazol (PAC), an inhibitor of GAs biosynthesis. Previously, it has been described a negative crosstalk between ABA and GAs during seed germination, demonstrating that

mutants affected in the GA2-oxidase enzyme (implicated in GA inactivation) showed a high germination percentage (Yamauchi et al., 2007) while *cyp707a1* and *cyp707a2* knockout-mutants (impaired in genes encoding ABA 8'-hydroxylases enzymes), displayed high dormancy degree (Okamoto et al., 2006). It is well known that ABA insensitive mutants are PAC resistant during germination, showing a lower need for GAs to germinate (Koornneef et al., 1998). This requirement was compared in Col-0, *coi1-16*, *hab2; coi1-16* and *hab2* seeds germinated in a medium containing PAC. In contrast to Col-0 and *coi1-16* mutant, *hab2* seeds germinated and developed green cotyledons in medium supplemented with 5  $\mu\text{M}$  PAC, showing 100% germination (Fig.5b). Non-stratified WT seeds grown under these conditions exhibited lower germination than the stratified seeds. No changes were detected in non-stratified *hab2* seeds compared with *hab2* stratified seeds.

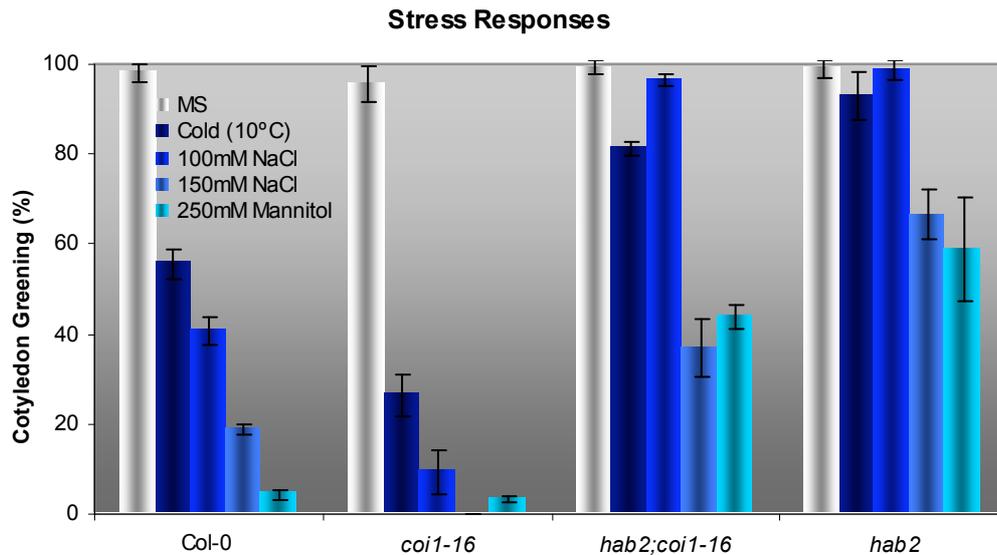
Altogether, these results indicate that *hab2* is a non-dormant mutant exhibiting low degree of dormancy and a reduced requirement of GAs to germinate, suggesting that HAB2 positively affects germination playing a key role in the regulation of seed dormancy.



**Figure 5. a)** Dormancy assay of *hab2* mutant. Seeds were stratified for 0 hours (blue columns) and 48 hours (white columns). **b)** Percentage of seeds that germinated in MS medium (white columns) or in medium supplemented with 0, 1, 3 and 5  $\mu\text{M}$  PAC (blue columns). Seeds were scored 7 days after sowing. Error bars represent  $\pm$  SD of three independent experiments.

In order to analyze if *hab2* mutation also affected whole plant phenotypes, we analyzed ABA sensitivity in vegetative tissues of the mutant. ABA has an inhibitory effect on root growth, and consequently, ABA insensitive mutants are resistant to this ABA-mediated process (Himmelbach et al., 1998). With this purpose, we compared *hab2* root growth of plants grown vertically in medium supplemented with 50  $\mu$ M ABA with that of Col-0, *coi1-16* and *abil-1* (Fig. R.27 on p.133). After 2 weeks under these conditions, WT and *coi1-16* plants showed yellowing and impaired growth both, in leaves and roots, while *hab2* seedlings did not display any visible phenotypic alteration, showing similar root growth than those grown in the absence of ABA. Similar results have been obtained overexpressing clade A PP2C proteins such as HAB1 (Sáez et al., 2004). These data demonstrate that HAB2 is also implicated in post-germination ABA-related responses.

Previously, it has been suggested that ABA is also involved in the regulation of different stress responses. In this way, salt and osmotic stresses in seeds and seedlings lead to the increase of ABA biosynthesis and consequently, to the inhibition of germination and early growth arrest (Lopez-Molina et al., 2001; González-Guzmán et al., 2004). Low temperature, high salt or drought conditions induce dehydration of plant cells (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994) which, in turn, triggers ABA biosynthesis. Therefore, ABA-hypersensitive mutants are more sensitive to inhibition of seed germination by osmotic stresses (Sáez et al., 2004). On the other hand, ABA-deficient or -insensitive mutants are stress-resistant during this developmental cue (Leon-Kloosterziel et al., 1996; González-Guzmán et al., 2002). To analyze if the reduced ABA sensitivity during *hab2* seed germination and early development is also evident in other ABA-mediated stresses that increase ABA levels, we analyzed the germination and development of green cotyledons of *hab2* seeds in response to different stresses such as NaCl, mannitol and low temperature (10°C) and compared it with that of WT (Fig.6). Seed germination under these conditions leads to a severe delay in radicle emergence and further growth arrest in WT and *coi1-16*, while *hab2* mutant germinated and developed green cotyledons under such stresses. These results suggest that HAB2 could be involved in the negative regulation of ABA-mediated stress responses.



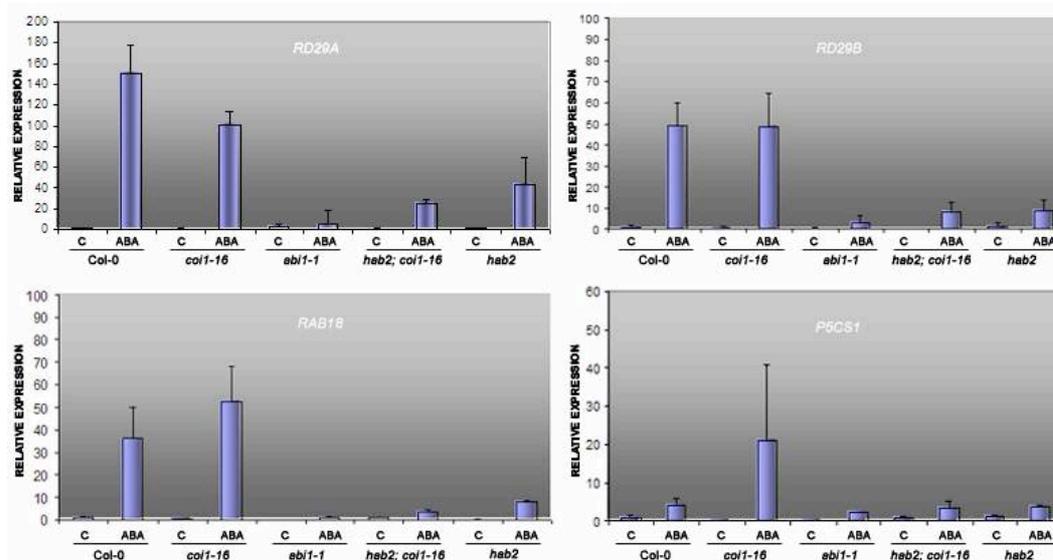
**Figure 6. Stress germination assays.** Percentage of seed germination and early seedling growth in MS medium or MS medium supplemented with NaCl (100 mM and 150 mM) and mannitol (250 mM). Low temperature stress was carried out sowing seeds in MS medium under 10°C conditions. Seeds were scored 7 days (salt and osmoticum stresses) or 5 days (low temperature stress) after sowing.

Plants must have evolved mechanisms against pathogen attack, as well as to environmental conditions. JAs, ethylene (ET) and salicylic acid (SA) are key hormones implicated in the regulation of biotic stresses (Thomma et al., 2001; Turner et al., 2002; van Loon et al., 2006a and b). Recently, it has been described that ABA also plays a role in the control of responses against biotic stresses. Several studies have reported that ABA negatively and positively affects the disease resistance phenotypes in various plant species (Audenaert et al., 2002; Anderson et al., 2004). To further characterize ABA-dependent responses in *hab2* plants, the susceptibility of the mutant to the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* and the hemibiotrophic oomycete *Pythium ultimum* was tested. 5-6 days after infection we could observe that double mutant *hab2;coi1-16* is more resistant to *Botrytis cinerea* than *coi1-16*, indicating that the *hab2* mutation suppresses the *coi1-16* hypersensitive phenotype to the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* but not to the oomycete *Pythium ultimum* (Fig. R.30 on p.137).

To examine if the ABA insensitive phenotypes in *hab2* mutant were accompanied by altered expression of ABA-responsive genes, we analyzed RNA levels in several ABA-inducible genes, such as *RD29A* and *RD29B* (*Responsive to Dehydration A and B*), which are cold-, drought- and ABA-inducible genes (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994), *RAB18* (*Responsive to ABA 18*), a strongly ABA-inducible gene, whose expression is

drastically repressed both, in *abi1-1* and *abi2-1* mutants (Lang and Palva, 1992; Leung et al., 1997) and *P5CS1* (*Δ1-pyrroline-5-carboxylate synthase*), a drought-, salt- and ABA-regulated gene with low RNA levels in *abi1-1* mutant (Strizhov et al., 1997). With this purpose, RNA isolated from plants treated with 50  $\mu$ M ABA was analyzed by Q RT-PCR in WT, *abi1-1*, *coi1-16*, *hab2* and *hab2;coi1-16* mutants (Fig.7). Expression analysis demonstrated that *hab2* and *hab2;coi1-16* plants behave similar as *abi1-1* mutant, showing lower expression of *RD29A*, *RD29B*, *RAB18* and *P5CS1* genes upon ABA treatment from that detected in Col-0 and *coi1-16* plants.

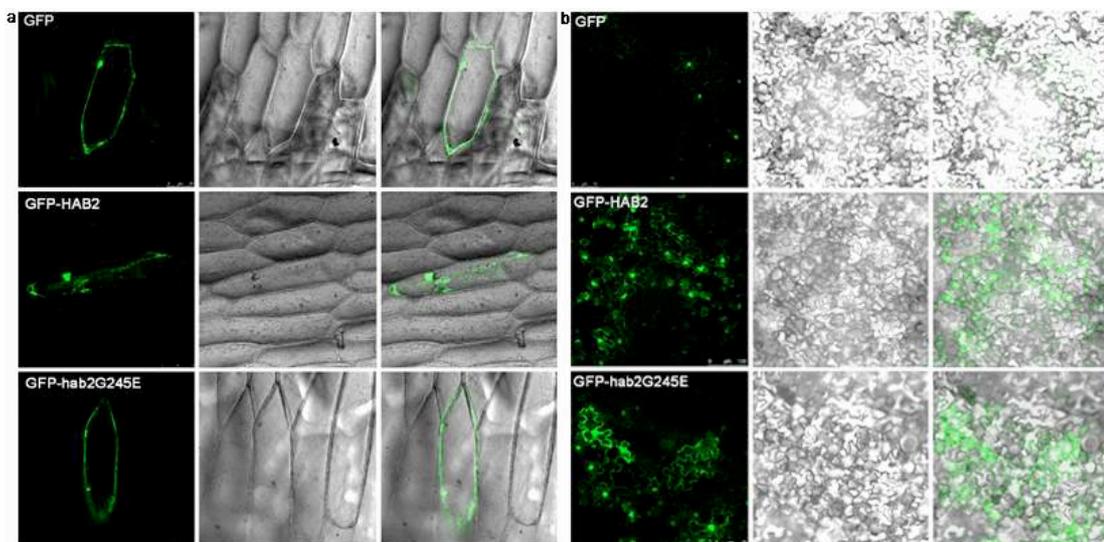
These results indicate that *hab2* mutation decreases the expression of ABA-responsive genes and is also linked to ABA-related physiological responses such as ABA-insensitive germination, low degree of dormancy, stress-resistant germination and ABA-insensitive root growth. In addition, *hab2* mutation is able to suppress *coi1-16* ABA-hypersensitive phenotype at molecular level during early development.



**Figure 7. Expression analysis in *hab2* and *hab2;coi1-16* mutants by Q RT-PCR.** Expression of the ABA-responsive genes *RD29A*, *RD29B*, *RAB18* and *P5CS1* in *hab2* and *hab2;coi1-16* was compared with those in Col-0, *abi1-1* and *coi1-16*. RNA was isolated from mock-treated plants (C) and 50  $\mu$ M ABA-treated (ABA) plants for 3 hours.

The subcellular compartment of PP2C action in ABA responses is unknown. In a recent report, Moes et al. (2008) described the nuclear localization of ABI1 WT and mutant proteins and the requirement of a functional nuclear localization sequence (NLS) in order to regulate ABA sensitivity and ABA-dependent gene expression, suggesting that ABI1 reprograms sensitivity towards ABA in the nucleus. Similarly, Sáez et al. (2008) confirmed the interaction of HAB1 and SWI3B (an Arabidopsis homolog of the yeast

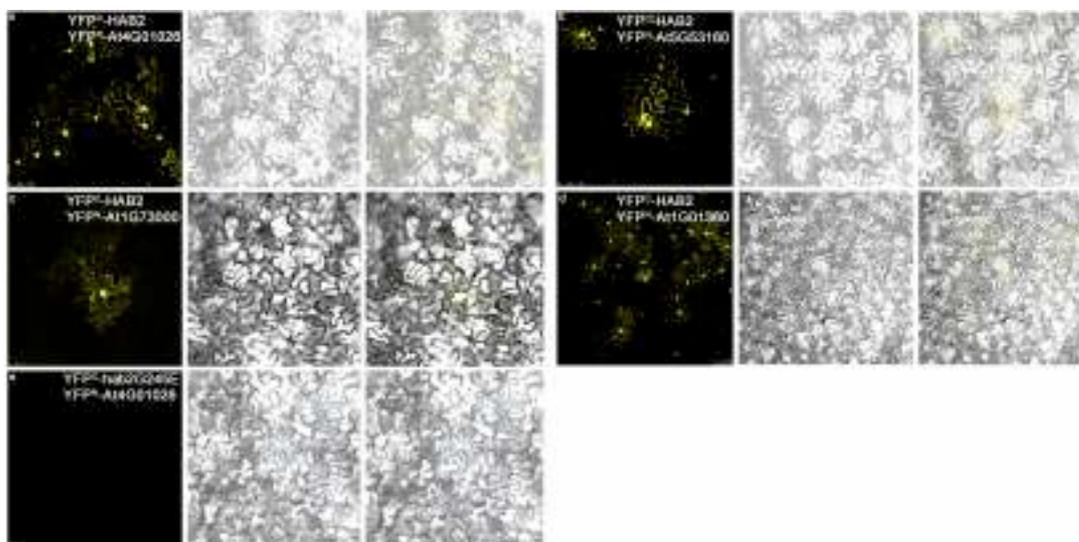
SWI3 subunit of SWI/SNF chromatin-remodeling complexes) in the nucleus and suggested a direct involvement of HAB1 in the regulation of ABA-induced transcription. These results have revealed a connection between ABA signaling and the chromatin remodeling machinery suggesting a direct involvement of HAB1 in the regulation of ABA-induced transcription (Sáez et al., 2008). To ascertain the potential site of action of HAB2 within the cell, the subcellular localization of this protein was investigated using N-terminal GFP fusions of full length *HAB2* and *hab2G245E* under the control of the CaMV 35S constitutive promoter. Transient expression of this construction in epidermal onion cells and agroinfiltration analysis in tobacco (*Nicotiana benthamiana*) leaves, showed that HAB2 and the mutated version appeared both, in the cytoplasm and the nucleus (Fig.8).



**Figure 8. Subcellular localization of HAB2.** 35S:*GFP:HAB2* and 35S:*GFP:hab2G245E* constructions were delivered into **a)** epidermal onion cells by biobalistic and **b)** tobacco leaves by agroinfiltration. Nuclear and cytosolic distribution of the GFP protein alone is shown as control (GFP).

Recently, it has been described that the protein family of PYR1-PYL (pyrabactin resistance 1-PYR-like)/RCAR (regulatory component of ABA receptor) are negative regulators of clade A type-2C protein phosphatases (PP2Cs) (Park et al., 2009; Ma et al., 2009). ABA promotes interaction of PYR1/RCAR with clade A PP2Cs leading to the inhibition of PP2C activity. To analyze the *in planta* interaction between HAB2 and PYL/RCAR proteins, bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays were used. To this aim, HAB2 was translationally fused to the C-terminal 84-amino acid region of the yellow fluorescence protein (YFP<sup>C</sup>) in the pYFP<sup>C</sup>43 vector generating the YFP<sup>C</sup>-HAB2 fusion protein. Moreover, PYL7

(At4G01026), PYL8 (At5G53160), PYL3 (At1G73000) and PYL9 (At1G01360) were translationally fused to the N-terminal 155-amino acid region of the yellow fluorescence protein (YFP<sup>N</sup>) in the pYFP<sup>N</sup>43 vector, which generated the YFP<sup>N</sup>-At4G01026, YFP<sup>N</sup>-At5G53160, YFP<sup>N</sup>-At1G73000 and YFP<sup>N</sup>-At1G01360 fusion proteins, respectively. The corresponding constructions were codelivered into tobacco leaf cells by *Agrobacterium tumefaciens* infiltration showing interaction between HAB2 and the four mentioned PYL/RCAR family proteins. These *in vivo* targeting experiments also determined the subcellular localization of the interaction both, in the nucleus and the cytosol, which is consistent with the expression of the fusion protein GFP-HAB2, which was localized to the same intracellular compartments as the PYL/RCAR-HAB2 complexes (Fig.9).



**Figure 9. BiFC assay.** The interactions among YFP<sup>C</sup>-HAB2 and four PYL/RCAR proteins (YFP<sup>N</sup>-At4G01026, YFP<sup>N</sup>-At5G53160, YFP<sup>N</sup>-At1G73000 and YFP<sup>N</sup>-At1G01360) and between the mutated version YFP<sup>C</sup>-hab2G245E and YFP<sup>N</sup>-At4G01026 are shown. No interaction was observed between the mutated version of HAB2 (YFP<sup>C</sup>-hab2G245E) and YFP<sup>N</sup>-At4G01026.

It is known that dominant-type mutation in PP2C proteins, such as *abil-1* or *ahg1G152D* constitutively dephosphorylates and inactivates SnRK2 kinases, conferring dominant ABA insensitivity (Umezawa et al., 2009). In this way, both Park et al., 2009 and Ma et al., 2009 have described that *abil-1* and *abi2-1* mutations lacked PYL/RCAR binding ability, even in the presence of ABA. Because of that, we analyzed if *hab2G245E* mutation abolished the interaction between HAB2 and ABA receptors. Therefore, we used the mutated version of HAB2 fused to the C-terminal 84-amino acid region of the yellow fluorescence protein (YFP<sup>C</sup>) in the pYFP<sup>C</sup>43 vector and YFP<sup>N</sup>-At4G01026 construction. Interestingly, we were able to

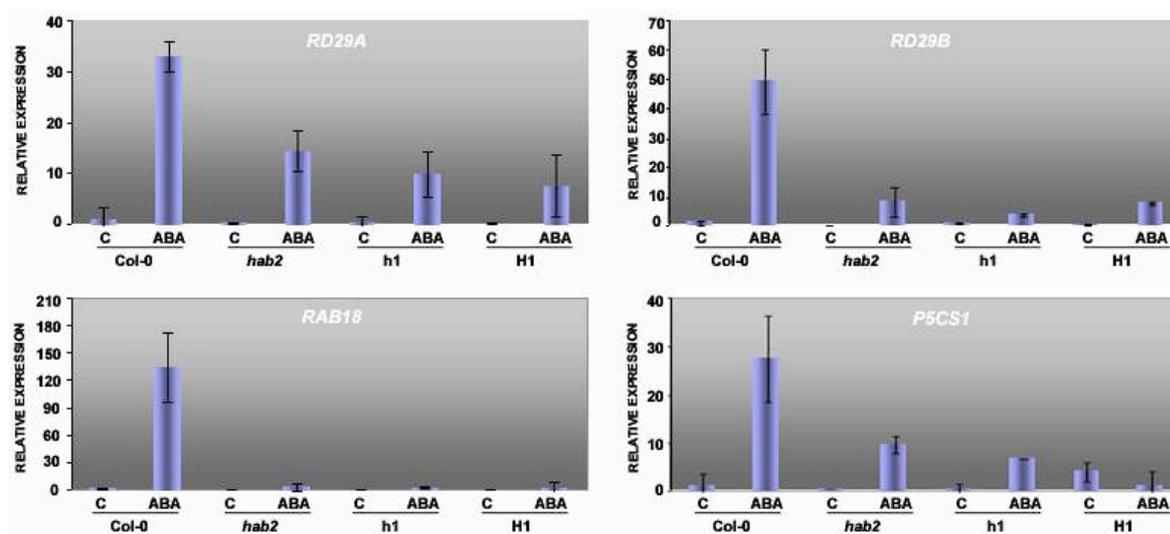
demonstrate that *hab2G245E* mutation abolished the interaction between HAB2 protein and PYL7 (At4G01026) (Fig.9).

Further analysis of ABA responses through a gain-of-function approach by generating *35S:HAB2* and *35S:hab2* transgenic lines, provided genetic evidence on the role of HAB2 in ABA signaling pathway. In this way, the coding region of *HAB2* and the mutated version *hab2* were fused to the CaMV 35S promoter in the vector pMDC43 and the constructions were used to transform Arabidopsis plants. T3 homozygous lines with a single insertion were obtained showing high level of transgene expression (Fig. R.37 on p.146) and were selected for further analysis. Previously, it has been described that overexpression of several PP2Cs, such as ABI1, HAB1 or PP2CA, generates ABA-related phenotypes during seed germination and stresses responses (Sheen et al., 1998; Sáez et al., 2004). Thus, we analyzed seed germination of *HAB2* and *hab2* overexpressing transgenic plants in medium supplemented with ABA (Fig. R.38 on p.146). Col-0 germination was greatly inhibited in 1  $\mu$ M ABA at seven days post-stratification, and transgenic lines showed radicle emergence and developed green cotyledons. The addition of 3  $\mu$ M ABA arrested cotyledon greening in *hab2* mutant but overexpression lines were able to germinate and showed green cotyledons under this condition.

To further substantiate this result, we analyze transgenic plant responses to salt and osmotic stresses during seed germination and early development (Fig. R.39 on p.147). We compared the germination of *35S:HAB2*, *35S:hab2*, Col-0, *hab2* and *abil-1* plants in medium supplemented with NaCl (150 mM and 200 mM) and mannitol (250 mM and 400 mM). Overexpression of *HAB2* and *hab2* transgenes generated both, salt- and osmoticum-insensitive phenotypes during these abiotic stresses.

Finally, the measurement of RNA levels of *RAB18* and *RD29A* genes in the *35:HAB2* and *35S:hab2* transgenic plants by Q RT-PCR demonstrated that transgenic lines showed lower expression of both ABA responsive genes upon ABA treatment from that detected in Col-0 (Fig.10).

Altogether, these results indicate that HAB2 is a negative regulator of the ABA signaling pathway during several physiological responses including seed development, germination, dormancy, root growth and biotic and abiotic stresses.



**Figure 10.** Expression of the ABA regulated genes *RAB18* and *RD29A* in *35S:HAB2* (*H2*) and in *35S:hab2* (*h1*) plants compared with Col-0 and *hab2* mutant. mRNA levels were determined by Q RT-PCR using total mRNAs isolated from mock-treated plants (c) or 50  $\mu$ M ABA treated-plants (ABA) for 3 hours.

## Chapter II: Characterization of the ANAC089 transcription factor.

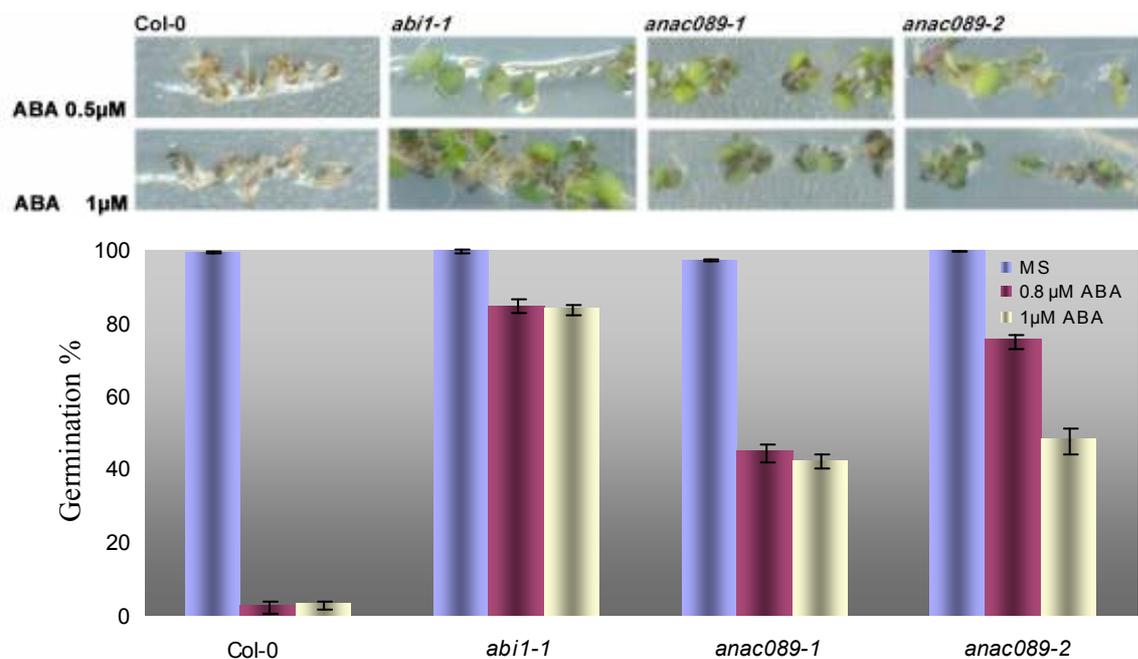
Differences in activity or perception of the natural (+)-*S*-ABA and its mirror image, the unnatural (-)-*R*-ABA enantiomer have been observed. In this way, (+)-*S*-ABA and (-)-*R*-ABA are not equally effective in *A. thaliana* seed germination, stomatal closure and ABA-responsive gene expression (Walker-Simmons et al., 1994).

To isolate novel mutants involved in ABA signaling, we have established a collaboration with Dr. Eiji Nambaras's group. They previously performed a sensitized genetic screening using (+)-*S*-ABA and isolated 19 (+)-*S*-ABA-insensitive mutants that were able to germinate on 3  $\mu$ M (+)-*S*-ABA. Allelism tests indicated that these fell into 5 loci, including 7 *abi3*, 4 *abi4*, and 5 *abi5* alleles. In addition, two new mutants were isolated from ethyl methane sulfonate (EMS)-mutagenized Landsberg *erecta* (*Ler*) M2 seeds and from fast neutron-mutagenized Col-0 M2 seeds, respectively.

The two mutant lines were used for mapping based on Col/Ler polymorphisms. Both mutations were independently mapped to the top arm of Chromosome 5. The first mutation is located in an 86 kb region between CAPS markers, At5g22050/HinfI and MWD9-25.3/AccI, and the second mutation in a 25 kb region between MWD9/EcoRV and MWD9-25.3/AccI. This shared 25 kb region contains 8 genes, and sequencing of these genes revealed both mutants contained a mutation in the At5g22290. This gene encodes the ANAC089 protein, a NAC transcription factor, with a deduced protein of 340 amino acids. Both mutations are designated as *anac089-1* and *anac089-2*, respectively. The *anac089-1* mutation substitutes Trp<sup>323</sup> to a premature stop codon. Southern blot analysis indicated that *anac089-2* mutation was a ~700 bp deletion that includes the C-terminal region.

NAC proteins are plant specific transcriptional regulators implicated in diverse processes including developmental programmes, defense and abiotic stress responses. NAC family proteins are not limited to monocots and dicots but are also present in conifers and interestingly in the moss *Physcomitrella patens* (Olsen et al., 2005). This family-defining domain within the N-terminal region was named the NAC domain. The C-terminal part of NAC proteins is highly diverse and no contain any known protein domain (Olsen et al., 2005) (Fig. R.42 on p.151).

It has been reported that transgenic plants overexpressing three different Arabidopsis NAC genes (*ANAC019*, *ANAC055*, and *ANAC072*) showed significantly increased drought tolerance (Tran et al., 2004; Jiang et al., 2009). Furthermore, ANAC072 was shown to function in a novel ABA dependent stress-signaling pathway. The ANAC genes belong to a subgroup of NAC genes defined by the wound-inducible *ATAF1* and *ATAF2* genes and are up-regulated by dehydration, high salinity and ABA (Tran et al., 2004; Fujita et al., 2004). We analyzed ABA responses in *anac089* mutants during seed germination and early development. First, we characterized the effect of ABA over *anac089-1* and *anac089-2* seed germination and early development. Approximately, 50 seeds were surface-sterilized, sown on 0.8% agar media with half strength of MS supplemented with (+)-S-ABA. Germination in the presence of 0.5  $\mu$ M and 1  $\mu$ M ABA was monitored after stratification and incubation under long day light conditions at 22°C temperature. Radicle protrusion and green cotyledons were the criterion of germination. While Col-0 displayed inhibited germination and delayed development both, *anac089-1* and *anac089-2* mutants were able to germinate and developed green and expanded cotyledons under these conditions (Fig.1).



**Fig. 1. ABA responses of *anac089-1* and *anac089-2* mutants during seed germination and early development.** MS medium was supplemented with 0.5  $\mu$ M and 1  $\mu$ M ABA and radicle protusion and green cotyledons were scored 8 days after sowing.

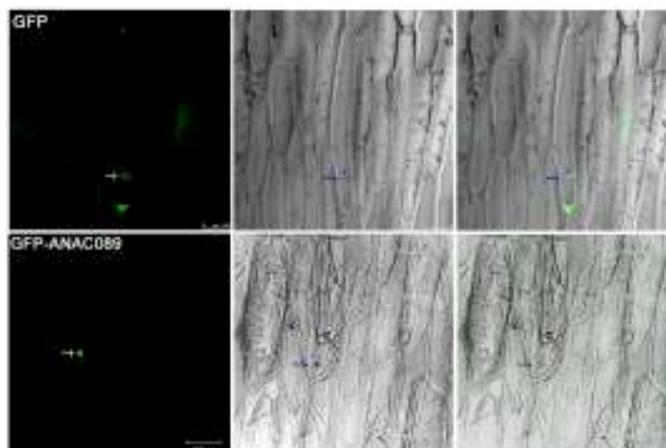
It has been reported that ABA-resistant mutants exhibit paclobutrazol (PAC)-insensitive phenotype during seed germination. Therefore, we decided to analyze *anac089-2* germination in presence of two different concentrations of PAC (1  $\mu$ M and 2  $\mu$ M) and compared with that of Col-0 and *abi1-1* (Fig. R.45 on p.155). WT displayed delayed germination in presence of 1  $\mu$ M PAC, while when the medium was supplemented with 2  $\mu$ M PAC development was totally inhibited. Nevertheless, *abi1-1* and *anac089-2* mutants showed fully germination and developed green cotyledons even in presence of 2  $\mu$ M PAC. This result suggests that, ANAC89 would reduce the threshold of GA required for germination.

To further characterize the function of *ANAC89* gene in ABA responses, we analyzed seed germination and early development under salt and osmoticum stresses. *anac089*, Col-0 and *abi5-1* were sowed in MS medium supplemented with NaCl (100 mM and 150 mM) and mannitol (200 mM and 250 mM). Recently, it has been reported that the NAC transcription factor *NTL8* regulates GA-mediated salt signaling in seed germination. It is known that high salinity reduces GA biosynthesis by repressing GA biosynthetic genes (Magome et al., 2004). In addition, these authors demonstrated that GA represses *NTL8*, which negatively regulates seed germination under high salinity (Kim et al., 2008). NaCl- and D-Mannitol-insensitive inhibition of germination of *anac089-2* mutant and transgenic lines were compared to WT

Col-0 and *abi5-1* seeds. Seed germination in Col-0, *abi5-1* and *anac089-2* was analyzed seven days after stratification by scoring green cotyledons showing an insensitive phenotype for *anac089-2* mutant (Fig. R.46 on p.156).

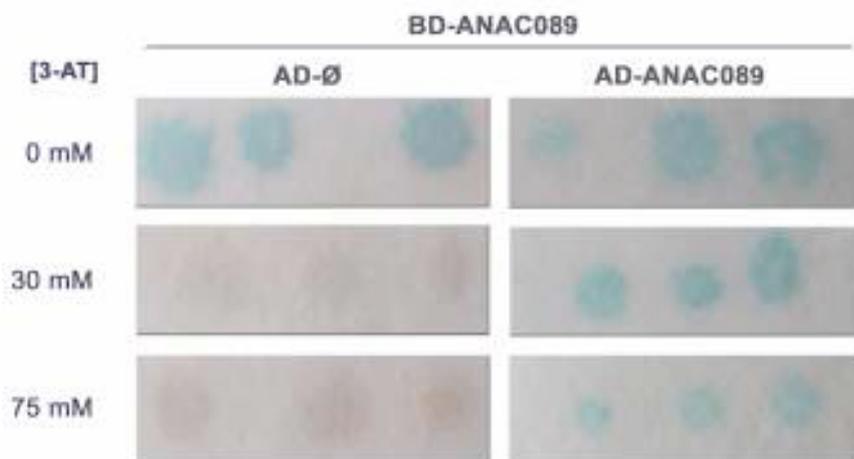
Representative GUS staining images of *pANAC089:GUS* transgenic seeds imbibed during 48 hours, revealed that *ANAC089* is mainly expressed in root tips during seed germination. Microscopic analysis by DIC in germinated seeds showed that *ANAC089* expression was located in the growth area and there was no expression in the quiescent center (Fig. R.47 on p.157), which is implicated in the identity and development of the radicular tissues showing a lower ratio of cell division.

NAC family proteins contain a highly conserved domain within the N-terminus, which may function as a potential nuclear localization signal (NLS). Thus, by transient expression it has been determined that the NAC protein ATAF1 was mostly localized in the nucleus (Lu et al., 2007). Similar results were obtained when subcellular localization analysis of the NAC family protein LOV1 using LOV1:GFP revealed a predominant localization in the nucleus in transiently transformed epidermal onion cells (*Allium cepa*) (Yoo et al., 2007). To elucidate the subcellular localization of ANAC089 protein, the coding region of *ANAC089* was fused in frame at its N-terminus with the GFP marker. This construction was delivered into epidermal onion cells where the GFP-ANAC089 fusion protein was expressed under the control of the CaMV 35S promoter. Visualization under a confocal microscope determined that GFP-ANAC089 fusion protein was located exclusively within the nucleus, indicating that ANAC089 is a nuclear protein (Fig.2). As control, GFP signal was observed within both, the cytoplasm and nucleus.



**Figure 2. Nuclear localization of GFP-ANAC089 protein.** Epidermal onion cells were delivered with plasmids harbouring the *GFP* coding region.

Several complex biological processes in plants results from the interplay of diverse families of nuclear factors with distinct classes of binding sites (reviewed by Gilmartin et al., 1990; Weising and Kahl, 1991). Many eucaryotic transcription factors bind to DNA as dimers and can selectively hetero- and homodimerize, contributing to regulation by modifying binding sites specificities, altering dimer stability and permitting a new set of specific protein-protein interactions to occur at the promoter (reviewed in Lamb and McKnight, 1991). Therefore, we examined if ANAC089 was able to homodimerize using the yeast two hybrid system. In this regard, ANAC089 protein was fused to the Gal4 DNA-binding domain (BD) in the pGBKT7 vector (Clontech) and to the Gal4 activation domain (AD) in the pGADT7 vector (Clontech). First, the SFY526 yeast strain was cotransformed with the fusion plasmid pBD-ANAC089 and pAD. Cotransformed yeast cells with pBD-ANAC089 plus pAD grown well on DOB -Leu, -Trp medium at 28°C in the presence of 5 bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galacto-pyranoside (X-Gal) and the yeast cells turned blue, indicating that the reporter gene *LACZ* was activated (Fig.3). These results suggest that ANAC089 is a potent transcriptional activator.



**Figure 3. Transactivation and dimerization tests in yeast.** ANAC089 protein was fused to the Gal4 DNA-binding domain (BD) and to the Gal4 activation domain (AD). Increasing concentrations (30 mM and 75 mM) of 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) were used to suppress the basal activation capacity displayed by ANAC089.

Previously, it has been described that other NAC family proteins have transactivation activity, such as ATAF1 protein (Lu et al., 2007). In addition, it is known that several NAC transcription factors can form homodimeric complexes. In this sense, AtNAC2 is able to form homodimers suggesting that functions as a dimer (He et al., 2005). To test the ability of ANAC089 to dimerize, SFY526 cells were cotransformed with pBD-ANAC089 and pAD-ANAC089 and with fusion plasmid pBD-ANAC089 and pAD as control and were sowed in

DOB-Leu,-Trp medium. Increasing concentrations (30 mM and 75 mM) of 3-aminotriazole (3-AT) were used to suppress the basal activation capacity displayed by ANAC089. The results show that the cotransformed yeast cells with pBD-ANAC089 and pAD were not able to activate reporter gene *LACZ* on DOB -Leu, -Trp medium plus 30 mM and 75 mM AT at 28°C. Interactions between pBD-ANAC089 and pAD-ANAC089 were revealed in the above mentioned 3-AT concentrations (Fig.3). These results suggest that ANAC089 can form homodimeric complexes.

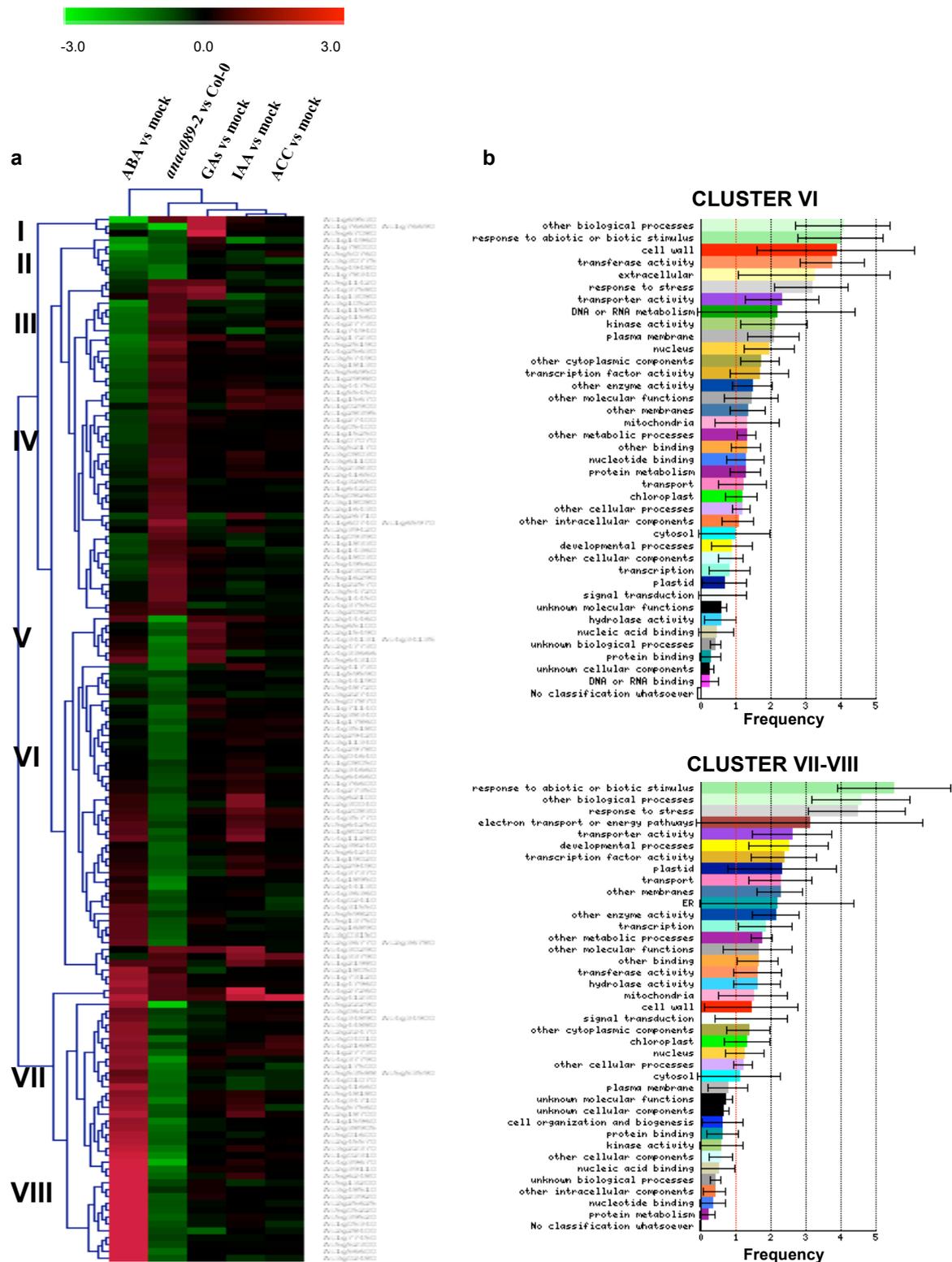
In order to analyze *ANAC089* regulation of gene expression during seed germination we carried out a transcriptomic profiling comparing ABA responses in *anac089-2* mutant and Col-0 during this developmental cue. *anac089* and WT seeds were stratified in water during 72 hours to break dormancy and then water was supplemented with 5  $\mu$ M ABA during 3 hours under 22°C and light conditions. Triplicate microarray analysis using Affymetrix ATH1 Genome Array gave consistent results.

We dissected the response between down-regulated genes (157 genes, cutoff 2-fold) and up-regulated genes (169 genes, cutoff 2-fold) in *anac089-2* mutant versus Col-0. As validation of microarray results, the most strongly repressed gene was *ANAC089* ( $\log_2$ ratio=-5.36). Most of the down-regulated genes encode proteins implicated in cellular seed metabolism (28,3%), such as albumines (At4g27170) or LEA proteins (At2g18340, At2g42560 and At4g02380). Interestingly, many of down-regulated genes in *anac089-2* mutant are well known ABA-responsive genes (Table R.4 on p.162). Among them, it is represented the *NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 4* gene (*NCED4*, At4g19170) which participates in ABA biosynthesis. Within the first group, 17% of genes encode proteins implicated in several responses to abiotic stresses (high temperature, salt stress, dehydration...) such as *RD29B* (*Responsive to Dehydration*, At5g52300), *STZ* (*Salt tolerant Zinc Finger*, At1g27730) and *ERD5* (*Early Responsive to Dehydration*, At3g30775). Thus, it is well known that these conditions trigger biosynthesis of ABA, increasing hormone levels which stimulates expression of the above mentioned genes. Moreover, this transcriptomic analysis uncovered other stress-responsive genes (At2g38905, At3g02480, At2g38340) and two ABA-related proteins with unknown function (At5g13200 and At3g02480). In addition, we were able to identify genes implicated in biotic stresses, as *PR4* (*Pathogenesis- Related 4*, At3g04720). Two of the most strongly repressed genes, *OPR1* (*12-oxophytodienoate reductase*, At1g76680) and *OPR4* (At1g76680), encode enzymes implicated in JA biosynthesis, a hormone that plays a key role in plant responses against biotic stresses. Finally, we have identified a nitrilase 4 (*NIT4*) as the most highly repressed gene ( $\log_2$ ratio=-3.77) (the sites of nitrilase expression

may represent sites of auxin biosynthesis in Arabidopsis, Bartel and Fink, 1994), an auxin efflux carrier family protein (At2g17500) highly repressed ( $\log_2\text{ratio}=-1.93$ ) and several auxin-induced proteins, such as IAA8 (At2g22670), IAA12 (At1g04550) and IAA26/PAP1 (At3g16500). Taken together, these results suggest that ANAC089 regulates ABA-related stress responses during seed germination.

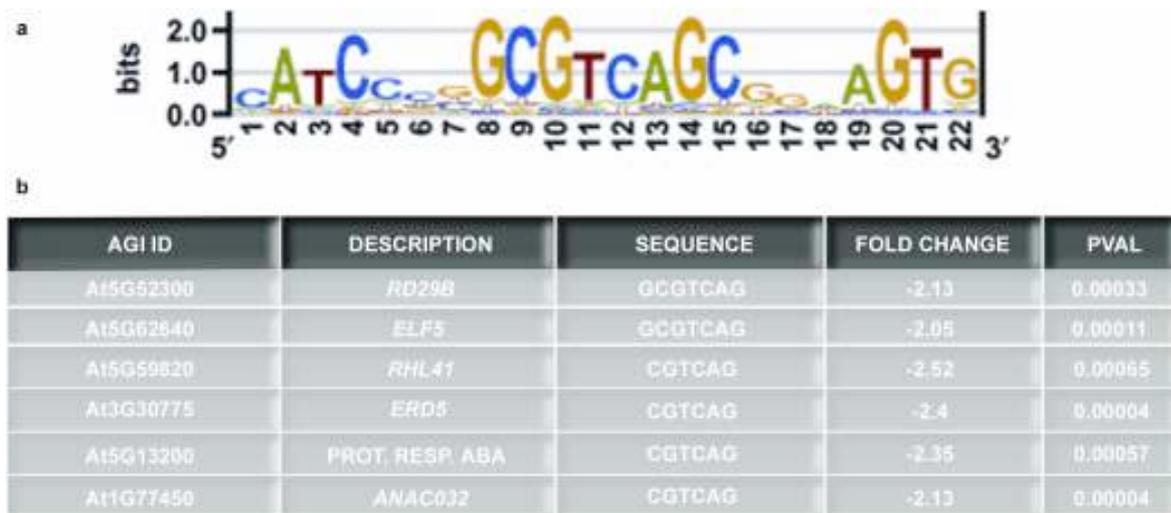
The second group includes genes up-regulated in *anac089-2* mutant versus Col-0 (169 genes, cutoff 2-fold). Therefore, these genes are negatively regulated by ANAC089. Many of them were implicated in protein synthesis (17,2%). Among them, we could identify genes encoding ribosomal proteins (At2g40010, At1g27400, At1g60090, At3g56340, At5g16130). One of the most strongly up-regulated genes in the mutant ( $\log_2\text{ratio}=2.09$ ) was the homeotic gene *ATHB33* (*Arabidopsis thaliana Homeobox Protein 33*, At1g75240). This family of genes encode transcriptional factors which establish the identity of organs in the plant. Finally, transcriptomic analysis revealed a high number of up-regulated genes encoding cell wall-related enzymes such as pectinesterases (At1g11580, At1g47960), several members of hydrolase family proteins like glycosyl-hydrolases (At3g18080, At5g20950, At5g61130) and a xyloglucan-endotransglucosylase (At4g30290).

In order to categorize *anac089-2* response versus Col-0 response, we performed a hierarchical clustering analysis of hormone-dependent response using the Multiarray Experiment Viewer software (version 4.4), provided by the TIGR Institute (Saeed et al., 2003). Clustering of genes differentially regulated by ABA, GAs, auxins (IAA) and the ethylene precursor (ACC) displayed 152 genes which were ordered in eight groups (I-VIII). Groups VII and VIII are the most relevant and showed ABA-responsive genes which were down-regulated in *anac089* mutant versus Col-0, including biotic- and abiotic-responsive genes, such as *RD29B* (At5g52300) and *STZ* (*Salt tolerate Zinc Finger*, At1g27730).



**Figure 4.** Hierarchical cluster analysis of 158 genes ANAC089-responsive and at least one of the hormones treatments applied to WT (Col-0) Arabidopsis seedlings. Genes (rows) and experiments (columns) were clustered with The Institute for Genomic Research (TIGR) Multi-experiment Viewer (version 4.4) using Pearson uncentered and complete linkage. Gene subclusters of interest are discussed in the text.

To identify the consensus cis-element binding site of ANAC089, we have used a DNA microarray manufactured by Agilent Technologies, containing all possible DNA sequences of 11 nucleotides compacted in 167,773 DNA probes of 35 nucleotides in length so each probe contained 25 different, overlapping 11-nt sequences. The sequence significantly over-represented in the promoters of ANAC089 targets was GCGTCAGC (Fig.5a), contained in genes differentially expressed in the transcriptomic analysis, such as *RD29B*, *ERD5*, *RHL41* (*Responsive to High Light 41*, At5g59820), and *ELF5* (*Early Flowering 5*, At5g62640) and an ABA-response gene whose encoded protein contains the GRAM domain (At5g13200) (Fig.5b).



**Figure 5.** Sequence significantly over-represented in the promoters of target genes of ANAC089.

#### 4. CONCLUSIONS.

Results obtained from the screenings carried out in order to identify new mutants with reduced ABA sensitivity, as well as the isolation and characterization of a protein phosphatase type-2C (PP2C) and a NAC family transcription factor, both of them ABA-regulated and related to seed germination, suggest the following conclusions:

1. The phytohormones ABA and JAs show interactions during the regulation of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. Firstly, a synergistic interaction is established between both hormones in the inhibition of seed germination in the wild-type Col-0. And secondly, a negative interaction is determined by the *coil-16* hypersensitivity to ABA, because of the blockage of the proteasome-mediated protein degradation pathway, which implicates that a germination repressor or repressor complex would be functionally active.
2. Both sensitized genetic screening strategies performed to isolate new mutants involved in the ABA signaling transduction pathway, as well as the conditions considered in the present work, were found to be appropriate. By using the *coil-16*, JA-insensitive and ABA-hypersensitive, mutant background in addition to the specific enantiomer (+)-S-ABA, allowed us to isolate ABA-related mutants, as the previously described *abil-1*, *abi3*, *abi4* and *abi5*, as well as two new mutations which were subjected to mapping, leading to the identification of the *HAB2* and *ANAC089* genes.
3. *HAB2* encodes a protein phosphatase type-2C (PP2C) involved in the regulation of ABA signaling during plant developmental processes and stress responses. *hab2* mutant exhibits low degree of seed dormancy, is ABA- and PAC-insensitive during germination and early developmental stages, in addition to abiotic stresses such as sodium chloride and mannitol. Moreover, this mutant showed higher sensitivity to the necrotrophic pathogen infection by *Pythium ultimum* and *Botrytis cinerea*, abolishing *coil-16* hypersensitivity to *B. cinerea*. Additionally, *hab2;coil-16* double mutant arises inviable embryos within shrunken seeds, suggesting the involvement of ABA and JAs in seed development.
4. Protein-protein interaction assays, using the bimolecular fluorescence complementation (BiFC) test, show that HAB2 is able to interact with several components of the PYR1/PYL-RCAR family protein, recently described as ABA receptors, and this interaction takes place in both, nucleus and cytoplasm, in agreement with the subcellular localization assays through

transient transformation of plant tissues and *HAB2* over-expressing plants. Additionally, *hab2G245E* mutation abolishes the formation of PP2C/PYR-RCAR ABA-receptor complexes, although no changes in the protein subcellular distribution are observed, supporting *HAB2* involvement in ABA perception.

5. Dominant hypermorphic *hab2* mutation, *HAB2*- and its mutated version *hab2*-overexpressing lines generate similar ABA-insensitive phenotypes during seed germination and seedling establishment in presence of ABA and under salt and osmoticum stress conditions. Furthermore, the corresponding molecular analyses in these lines showed reduced expression of ABA-responsive genes, demonstrating its role as a negative regulator of ABA signaling in these processes.

6. *ANAC089* was isolated from a sensitized genetic screening of ABA-insensitive mutants using the natural enantiomer (+)-*S*-ABA and found to encode a transcriptional factor belonging to the NAC family. This TF shows nuclear localization inside the cell and a strong transcriptional activity. Transactivation and dimerization tests demonstrated that *ANAC089* is a strong transcriptional activator able to form homodimeric complexes to regulate gene expression.

7. The transcriptomic profiling of *anac089-2* mutant seeds revealed that many of the down-regulated genes were ABA-responsive during stress. In addition, the search for *cis* regulatory elements recognized by *ANAC089*, suggests that is a crucial regulator of the ABA signaling pathway. Results obtained from the transcriptomic analyses of *anac089-2* mutant seeds in response to ABA and the identification of the *ANAC089*-binding regulatory sequence GCGTCAGC, indicate that the increase of ABA levels by means of abiotic stresses, such as salt or osmoticum treatments, provoked higher *ANAC089* transcript levels. In this context, *ANAC089* can form homodimeric complexes binding to the *cis* sequence presented in the promoters of ABA-responsive genes, supposed to negatively regulate seed germination under adverse environmental conditions.

8. As a final conclusion, we can confirm that the results presented in this memory about ABA and JAs effects and their interaction in seed development and germination processes, as well as the regulation of abiotic and biotic stresses, demonstrate the negative role of the PP type-2C *HAB2* and the positive role of the TF *ANAC089* in the ABA signaling pathway.

# Apēndices

Apēndices





**Tabla A.I.** Números de identificación (AGI) correspondientes a los genes empleados para la elaboración del árbol filogenético de las PP2Cs del grupo A, en el que se incluyen las especies vegetales *Arabidopsis thaliana* (At), *O. sativa* (Os), *P. patens* (Pp), *P. trichocarpa* (Ptr), *V. vinifera* (Vv) y *S. moellendorffii* (Smo).

Nombre	AGI	Nombre	AGI
HAB1	At1g72770	PtrABIL5	Ptr:577877
<b>HAB2</b>	<b>At1g17550</b>	PtrABIL6	Ptr:278785
ABI1	At4g26080	PtrABIL7	Ptr:433572
ABI2	At5g57050	PtrABIL8	Ptr:251067
AHG1	At5g51760	PtrABIL9	Ptr:253643
AtPP2CA/AHG3	At3g11410	PtrABIL10	Ptr:806657
At5g59220	At5g59220	PtrABIL11	Ptr:768154
At1g07430	At1g07430	PtrABIL12	Ptr:172527
At2g29380	At2g29380	PtrABIL13	Ptr:659641
OsABIL1	Osa:12005. m09214	PtrABIL14	Ptr:719969
OsABIL2	Osa:12001. m10282	VvABIL1	GSVIVT00016515001
OsABIL3	Osa:12005. m8729	VvABIL2	GSVIVT00032224001
OsABIL4	Osa:12001. m10873	VvABIL3	GSVIVT00034312001
OsABIL5	Osa:12005. m09043	VvABIL4	GSVIVT00034305001
OsABIL6	Osa:12001. m12397	VvABIL5	GSVIVT00016669001
OsABIL7	Osa:1005. m8008	VvABIL6	GSVIVT00006743001
OsABIL8	Osa:12003. m07054	VvABIL7	GSVIVT00006514001
OsABIL9	Osa:12009. m04828	VvABIL8	GSVIVT00038525001
PpABI1 A	Ppa:13662	VvABIL9	GSVIVT00024235001
PpABI1 B	Ppa:32342	VvABIL10	GSVIVT00018423001
PtrABIL1	Ptr:298956	SmoABIL1	Smo:13309
PtrABIL2	Ptr:645770	SmoABIL2	Smo:113714
PtrABIL3	Ptr:426680	SmoABIL3	Smo:54775
PtrABIL4	Ptr:279694		

**Tabla A.II.** Lista de genes reprimidos en el mutante *anac089-2* en comparación con el tipo silvestre Col-0 tras el tratamiento con ABA. Se incluyen aquellos genes con diferencias estadísticas significativas siguiendo los criterios independientes de *p-value* <0.05 y  $M \leq -1$ .

AGI	log <sub>2</sub> Ratio (M)	Descripción de la proteína	AGI	log <sub>2</sub> Ratio (M)	Descripción de la proteína
At5g22290	-5.36	ANAC089	At5g14420	-1.43	Ligasa RGLG2
At5g22300	-3.77	NT4 (Nitrilasa 4)	At4g24160	-1.42	F.P. hidrolasa
At1g76680 At1g76690	-3.63	OPR1 (12-oxofitodienoato reductasa 1)	At4g01070	-1.42	GT72B1 (UDP-glucosiltransferasa)
At4g39670	-3.32	Transportador de glicolípidos	At3g23920	-1.42	BAM1 (Beta-amilasa)
At3g46070	-2.78	F.P. dedos de zinc	At3g61040	-1.41	CYP76C7 (F.P. citocromo P450)
At2g44130	-2.48	Prot. F-box	At4g17615	-1.41	CBL1 (Prot. de unión a calcio)
At2g44460	-2.38	F.P. glicosil-hidrolasa	At2g42750	-1.40	Prot. con dominio <i>heat shock</i>
At4g18950	-2.32	Proteín-kinasa	At1g78000	-1.38	SULTR1;2 (Transportador de sulfatos)
At3g22370	-2.19	AOX1A (Oxidasa Alternativa 1A)	At2g41660	-1.38	Función desconocida
265674_at	-2.16	Función desconocida	At1g08050	-1.36	C3HC4 (F.T. dedos de zinc)
At1g02310	-2.15	F.P. glicosil-hidrolasa	At1g17860	-1.35	Inhibidor de proteasas
At4g37790	-2.05	HAT22 (F.P cremallera de leucina)	At2g29490	-1.35	GST19 (Glutación S-transferasa)
At2g41730	-2.01	Función desconocida	At4g33930 At4g34300	-1.34	Función desconocida
At4g34131 At4g34135	-1.98	UDP-glicosil transferasa	At4g19170	-1.34	NCED (9- <i>cis</i> -epoxicarotenoide dioxigenasa)
At2g38900	-1.98	Inhibidor de serín-proteasas	At3g15280	-1.34	Función desconocida
At5g64310	-1.96	AGP1 (Arabinogalactano1)	At4g11280	-1.34	ACS6 (ACC sintasa 6)
At4g34710	-1.94	ADC2 (Arginina Descarboxilasa 2)	At3g46620	-1.33	F.P. dedos de zinc
At2g17500	-1.93	Transportador de auxinas	At1g27030	-1.33	Función desconocida
At4g33666	-1.92	Función desconocida	At2g38905	-1.33	Prot. de respuesta a baja T <sup>a</sup> y salinidad
At3g28210	-1.90	F.P dedos de zinc	At5g59820	-1.33	RLH41 ( <i>Responsive to high light 41</i> )
At5g49480	-1.83	ACP1 (Prot. de unión a calcio)	At4g29780	-1.31	Función desconocida
At2g32190 At2g32210	-1.79	Función desconocida	At4g27170	-1.31	Albúmina 2S
At4g13250	-1.74	SDR (F.P. deshidrogenasa)	At4g20830	-1.31	Prot. con dominio de unión FAD
At3g27060	-1.72	Posible ribonucleótido reductasa	At2g29420	-1.31	GSTU7 (Glutación S-transferasa)
At2g45040	-1.69	matrix metalloproteínasa	At1g76070	-1.30	Función desconocida
At1g78340	-1.68	GSTU22 (glutación transferasa)	At1g62180	-1.30	APR2 (5-adenolisulfato reductasa 2)
At2g45570	-1.63	CYP76C2 (citocromo P450)	At4g36620	-1.29	F.P dedos de zinc
At5g65100	-1.63	F.P insensible a etileno 3	At2g38240	-1.28	Oxidoreductasa
At3g04010	-1.62	F.P. glicosil hidrolasa	At1g71140	-1.27	F.P MATE effluX
At3g22910	-1.62	ATPasa transportadora de calcio	At5g60760	-1.26	Prot. tipo 2-fosfoglicerato kinasa
At1g09200	-1.58	Histona H3	At3g30775	-1.26	ERD5 ( <i>Early Dehydration-Induced 5</i> )
At2g47730	-1.54	GST6 (Glutación Transferasa 6)	At3g04720	-1.25	PR4 (Prot. de respuesta a patogénesis 4)
At5g01600	-1.54	FER1 (Ferritina 1)	At1g71695	-1.25	PER12 (Peroxidasa 12)
At1g56600	-1.54	GOLS2 (Galactinol Sintasa 2)	At3g01650	-1.25	RGLG1 (Prot. de unión a zinc)
At3g44190	-1.53	F.P. oxidoreductasa	At1g27730	-1.25	STZ (F.T. tolerancia estrés salino)
At2g40300	-1.53	FER4 (Ferritina 4)	At2g38340	-1.25	F.T. con dominio AP2, posible DRE2B
At5g48180	-1.53	Función desconocida	At5g39520	-1.23	Función desconocida
At5g53588 At5g53590	-1.52	F.P. respuesta a auxinas	At2g30040	-1.23	Proteín-kinasa
At5g67080	-1.52	MAP kinasa kinasa kinasa 19	At5g13200	-1.23	Dominio GRAM de respuesta a ABR
At2g39110	-1.51	Proteín-kinasa	At3g03150	-1.23	Función desconocida
At4g02390	-1.46	APP (ADP-ribosiltransferasa)	At1g51960	-1.23	Prot. de unión a calmodulina
At1g15960	-1.46	NRAMP (Transport. de metales 6)	At2g18340	-1.23	Prot. LEA
At1g80240	-1.45	Función desconocida	At4g35180	-1.22	Prot. transportadora de aa
At2g42560	-1.45	Proteína LEA	At4g37370	-1.22	F.P. citocromo P450
At3g62100	-1.45	IAA30 (F.T inducido por IAA 30)	At4g36360	-1.22	Posible Beta-galactosidasa
At5g22880	-1.44	Histona H2B	At4g31550	-1.22	F.P. de la familia WRKY

AGI	log <sub>2</sub> Ratio (M)	Descripción de la proteína	AGI	log <sub>2</sub> Ratio (M)	Descripción de la proteína
At1g14960	-1.22	F.P. MLP	At3g57120	-1.04	Proteín-kinasa
At2g36770 At2g36780	-1.20	F.P. UDP-glucosil transferasa	At4g27470	-1.04	F.P. dedos de zinc
At2g16890	-1.19	F.P. UDP-glucosil transferasa	At2g19570	-1.04	CDD (Citidina deaminasa)
At5g62480	-1.19	Glutatión S-transferasa	At5g13700	-1.04	Poliamina oxidasa
At3g04640	-1.19	Función desconocida	At3g06420	-1.04	APG8H (proteína de unión a microtúbulos)
At1g68690	-1.19	Proteín-kinasa	At1g20870	-1.04	Función desconocida
At5g64230	-1.19	Función desconocida	At5g65660	-1.03	Glicoproteína
At5g48720	-1.18	Función desconocida	At1g74710	-1.03	ICS1 (Isocorismato sintasa 1)
At5g07190	-1.18	ATS3 ( <i>Arabidopsis thaliana seed protein 3</i> )	At1g50020	-1.03	Función desconocida
At5g24970	-1.18	F.P. ABC1	At3g22740	-1.02	HMT-3 (Homocisteína S-metiltransferasa 3)
At5g64240	-1.16	Metacaspa3	At5g64660	-1.02	Proteína con dominio U-box
At5g01730	-1.14	Función desconocida	At5g64250	-1.02	2-nitropropano dioxigenasa
At2g36490	-1.14	ROS1 ( <i>Repressor of silencing 1</i> )	At3g27880	-1.02	Función desconocida
At3g48510	-1.13	Función desconocida	At5g05220	-1.01	Función desconocida
At1g05340	-1.13	Función desconocida	At4g35770	-1.01	SEN1 (Proteína asociada a senescencia1)
At4g20320	-1.12	CTP sintase	At2g25625	-1.01	Función desconocida
At2g15490	-1.12	F.P. UDP-glucosil transferasa	At1g08170	-1.00	Histona H2B
At5g13750	-1.12	ZIFL1 ( <i>Zinc Induced Facilitator-Like1</i> )	At2g18700	-1.00	TPS11 (Trehalosa Fosfatasa/Sintasa 11)
At4g27350	-1.12	Función desconocida			
At2g39650	-1.12	Función desconocida			
At3g44880	-1.11	ACDI ( <i>Accelerated Cell Death1</i> )			
At1g47540	-1.11	Inhibidor de tripsina			
At5g07870	-1.10	F.P. transferasas			
At4g21680	-1.10	POT (transportador de oligopéptidos depend. de protones)			
At3g13020	-1.10	Proteína con dominio de dimerización hAT			
At1g59590	-1.10	Función desconocida			
At2g22470	-1.10	Proteína arabinogalactan (AGP2)			
At3g11340	-1.10	F.P. UDP-glucosil transferasa			
At2g34740	-1.10	PP2C (Proteín-fosfatasa 2C)			
At5g52300	-1.09	RD29B (proteína de respuesta a deshidratación)			
At5g50760	-1.09	F.P. de respuesta a auxinas			
At1g19020	-1.09	Función desconocida			
At1g77450	-1.09	ANAC032			
At1g22410	-1.09	DAHP sintetasa			
At2g28400	-1.09	Función desconocida			
At4g02410	-1.08	Lectin proteín-kinasa			
At3g02480	-1.08	Proteína de respuesta a ABA			
At1g76600	-1.08	Función desconocida			
At4g34890 At4g34900	-1.08	XDH1 (xantina deshidrogenasa 1)			
At4g25580	-1.07	Proteína de respuesta a estrés			
At2g29550	-1.07	TUB7 (Tubulina7)			
At2g34660	-1.07	MRP2 ( <i>Multidrug Resistance-Associated Protein2</i> )			
At1g30860	-1.07	Función desconocida			
At5g57560	-1.05	TCH4 (Xiloglucano endotransglicosilasa 4)			
At1g32550	-1.05	Ferredoxina			
At5g62640	-1.04	ELF5 ( <i>Early Flowering5</i> )			
At5g54940	-1.04	Factor de inicio de la transcripción SUI1			

**Tabla A.III.** Lista de genes reprimidos en el mutante *anac089-2* en comparación con el tipo silvestre Col-0 tras el tratamiento con ABA. Se incluyen aquellos genes con diferencias estadísticas significativas siguiendo los criterios independientes de *p-value* <0.05 y *M*≥1.

AGI	log <sub>2</sub> Ratio (M)	Descripción de la proteína	AGI	log <sub>2</sub> Ratio (M)	Descripción de la proteína
At1g60740 At1g65970	+2.09	Posible peroxirredoxina tipo 2	At2g01940	+1.31	IDD15 ( <i>Indeterminate domain 15</i> )
At2g35750	+2.09	Función desconocida	At3g52170	+1.30	Prot. de unión a DNA
At2g29980	+2.03	FAD3 (Ácido Graso Desaturasa 3)	At1g27400	+1.30	RPL17A (Prot. ribosomal)
At5g52450	+1.94	Prot. transportadora	At5g62350	+1.28	Invertasa/pectin metilesterasa inhibidor
At1g71250	+1.91	Lipasa con dominio GDSL	At1g17200	+1.28	Prot. integral de membrana
At4g37580	+1.86	<i>HOOKLESS1</i> (N-acetiltransferasa)	At3g09820	+1.27	ADK1 (Adenosina Kinasa)
At1g01300	+1.82	Aspartil proteasa	At5g22440	+1.27	RPL10aC (Prot. ribosomal)
At3g14220	+1.80	Lipasa con dominio GDSL	At3g54720	+1.26	AMP1 ( <i>Altered Meristem Program1</i> )
At5g14450	+1.78	Lipasa con dominio GDSL	At3g18080	+1.26	Glicosil hidrolasa
At3g61440	+1.75	BSAS3;1 ( <i>Beta-Substituted Ala Synthase3;1</i> )	At2g32180 At2g32650	+1.26	PTAC18 ( <i>Plastid Transcriptionally Active18</i> )
At5g11420	+1.74	Función desconocida	At3g14060	+1.25	Función desconocida
At1g69530	+1.74	Expansina 1	At1g02920 At1g02930	+1.25	GSTF7 (Glutati6n Transferasa 11)
At1g54000 At1g54010	+1.70	Prot. de asociaci6n a mirosinasa	At5g49560	+1.25	Funci6n desconocida
At5g44700	+1.64	EDA23 ( <i>Embryo Sac Development Arrest 23</i> )	At1g13380	+1.25	Funci6n desconocida
At4g30810	+1.59	SCPL29 ( <i>Serine Carboxypeptidase-Like 29</i> )	At1g09390	+1.24	Lipasa con dominio GDSL
At4g24190	+1.59	SHD ( <i>Sepherd</i> , prot. de uni6n a ATP9)	At3g56340	+1.24	S26 (RPS26C, prot. ribosomal)
At2g39420	+1.58	Esterasa	At1g15930	+1.24	S12 (RPS12A, prot. ribosomal)
At1g28580	+1.56	Lipasa con dominio GDSL	At5g20950	+1.24	Glicosil hidrolasa
At2g16430	+1.56	PAP10 (Serina/treonina fosfatasa)	At4g25080	+1.24	CHLM (Magnesio Protoporfirina IX Metiltransferasa)
At3g23830	+1.54	GRP4 (Prot. de uni6n a RNA)	At2g17230	+1.23	Prot. respuesta a fosfato
At3g18130	+1.52	RACK1 (Prote6n-kinasa)	At5g16130	+1.23	RPS7C (Prot. ribosomal)
At1g22570	+1.52	Transportador de protones	At1g20050	+1.23	HYD1 ( <i>Hydra 1</i> )
At5g60670	+1.51	RPL12C (Prot. ribosomal)	At4g17560	+1.23	Prot. ribosomal
At1g23020	+1.51	FRO3 ( <i>Ferric Reduction Oxidase 3</i> )	At4g05400	+1.22	Prot. funci6n desconocida
At5g25190	+1.50	Prot. respuesta etileno	At3g28900	+1.22	RPL34C (Prot. ribosomal)
At3g45310	+1.48	Posible ciste6n-proteasa	At2g30130	+1.22	Fosfoenolpiruvato carboxikinasa 1
At4g02380	+1.47	SAG21 ( <i>Senescence Associated Gene21</i> )	At1g04550	+1.21	IAA12 ( <i>Auxin -Induced Protein12</i> )
At1g15670	+1.46	F-box	At5g01950	+1.21	Serina/treonina-kinasa
At3g18830	+1.43	PLT5 ( <i>Polyol Transporter5</i> )	At2g39890	+1.20	PROT1 (Transportador de Prolina)
At2g28840	+1.42	Familia de prot. ankirinas	At3g11510	+1.20	S14 RPS14B prot. Ribosomal
At2g41650	+1.41	Funci6n desconocida	At5g32450	+1.19	Prot. con dominio de reconocimiento a RNA
At2g37600	+1.41	RPL36A (Prot. ribosomal)	At2g20060	+1.19	Prot. ribosomal
At1g28395	+1.41	Funci6n desconocida	At2g36620	+1.19	RPL24 (Prot. ribosomal)
At3g13960	+1.40	GRF5 ( <i>Growth Regulating Factor5</i> )	At2g26710	+1.19	BAS1 CYP734A1 ( <i>Phyb Activation Tagged Suppressor1</i> )
At5g16290	+1.39	Cetotactato sintasa	At1g29980	+1.18	Funci6n desconocida
At2g41560	+1.36	ACA4 ( <i>Autoinhibited CA(2+)ATPase Isoform 4</i> )	At5g53420	+1.18	Funci6n desconocida
At3g15530	+1.35	Metiltransferasa	At4g34680	+1.18	Posible factor transcripcional GATA 3
At5g08260	+1.34	SCPL35 ( <i>Serine Carboxypeptidase-Like 35</i> )	At1g72050	+1.18	Prot. C2H2
At4g14960	+1.34	TUA6 (Tubulina alpha-6 chain)	At3g10520	+1.18	NSHB2 ( <i>Non -Symbiotic Haemoglobin2</i> )
At1g32090	+1.34	ERD ( <i>Early-Responsive to Dehydration protein-related</i> )	At2g27590	+1.17	Funci6n desconocida
At4g37550	+1.33	Posible formamidasa	At5g61130	+1.17	Glicosil hidrolasa 17
At3g13580	+1.33	RPL7D (Prot. ribosomal)	At4g25890	+1.17	RPP3A (Prot. ribosomal)
At2g40010	+1.32	RPP0A (Prot. ribosomal)	At4g25630	+1.17	FIB2 (Fibrilarina 2)

AGI	log <sub>2</sub> Ratio (M)	Descripción de la proteína	AGI	log <sub>2</sub> Ratio (M)	Descripción de la proteína
At1g07650	+1.16	Posible proteína-kinasa transmembrana	At2g45990	+1.05	Función desconocida
At3g58060	+1.16	Posible transportador de cationes	At1g21980	+1.05	PIP5K1 (Fosfatidilinositol4-Fosfato5-kinasa1)
At3g16080	+1.16	RPL37C (Prot. ribosomal)	At1g75240	+1.04	HB33 (Prot. Homeobox 33)
At4g30290	+1.16	XTH19 (Xiloglucano Endotransglucosilasa/Hidrolasa 19)	At4g24670	+1.04	Alinasa
At4g08150	+1.15	KNAT1_BP (Brevipedicellus1)	At4g01610	+1.04	Posible catepsina
At4g35020	+1.15	RHO1PS (Rho-Related Protein from Plants)	At3g24240	+1.04	Proteín-kinasa transmembrana
At3g07140	+1.14	GPI transamidasa	At5g65510	+1.04	AIL7 (Aintegumenta-Like7)
At5g46160	+1.14	Prot. ribosomal	At5g18590	+1.04	Función desconocida
At4g25740	+1.14	RPS10A (Prot. ribosomal)	At3g44750	+1.04	HD2A (Histona Deacetilasa 2A)
At1g57620	+1.13	Prot. de familia emp24	At4g32650	+1.04	KC1 ( <i>Rectifying Channel 1</i> )
At2g17710	+1.13	Función desconocida	At4g27730	+1.04	OPT6 (Transportador de Oligopéptidos 6)
At4g18730 At5g45775	+1.13	RPL16B (Prot. ribosomal)	At1g26740	+1.04	Prot. ribosomal
At4g18030	+1.13	Prot. de respuesta a sequía	At1g14360	+1.04	UTR3 (Transportador de UDP-galactosa 3)
At3g18800	+1.13	Función desconocida	At1g18330	+1.04	EPR1 ( <i>Early-Phytohormone-Responsive 1</i> )
At3g23390	+1.13	RPL36aA (Prot. ribosomal)	At2g30870	+1.03	ERD13 ( <i>Early Dehydration-Induced 13</i> )
At3g08030	+1.13	Función desconocida	At5g60730	+1.03	Prot. transportadora de aniones
At2g22670	+1.13	IAA8 (Auxin -Induced Protein8)	At1g55805	+1.03	Prot. BoA
At2g27300	+1.12	F.T. ANAC040	At2g24280	+1.03	Serina carboxipeptidasa S28
At3g53210	+1.12	Nodulina MtN21	At5g61330	+1.03	Prot. procesadora de rRNA
At1g14620	+1.12	DECOY (Endoxiloglucano transferasa A2)	At3g25040	+1.02	Posible receptor HDEL
At2g20020	+1.12	Función desconocida	At5g61170	+1.02	RPS19C (Prot. ribosomal)
At5g17230	+1.11	PSY (Fitoeno Sintasa)	At1g60550	+1.02	Posible ácido dihidroxinaftoico sintasa
At3g17780	+1.11	Función desconocida	At5g56950	+1.02	NAP1;3 (Nucleosome Assembly protein 13)
At2g41230	+1.11	Función desconocida	At5g23740	+1.01	RPS11-BETA (Prot. ribosomal)
At4g09550	+1.11	Función desconocida	At5g07090	+1.01	RPS4B (Prot. ribosomal)
At3g20820	+1.11	Prot. repeticiones leucina	At3g57490	+1.01	RPS2D (Prot. ribosomal)
At3g21190	+1.11	Función desconocida	At1g07070	+1.01	RPL35aA (Prot. ribosomal)
At1g11580	+1.11	Pectinesterasa PMEPCRA	At2g37190	+1.01	RPL12A (Prot. ribosomal)
At1g64220	+1.10	TOM7-2 ( <i>Translocase of Outer Membrane7</i> )	At2g44120	+1.01	RPL7C (Prot. ribosomal)
At1g02900	+1.10	RALFL1 ( <i>Ralf Like1</i> )	At3g48410	+1.01	Alpha/beta hidrolasa
At5g56260	+1.10	Dimetilmenaquinona metiltransferasa	At1g47960	+1.01	C/WIF1 ( <i>Cell Wall/ Vacuolar Inhibitor of fructosidase1</i> )
At3g61580	+1.10	SLD1 (Delta-8-Esfingolípido Desaturasa)	At1g49600	+1.01	RBP47A (Prot. de unión a RNA 47A)
At1g74940	+1.09	Prot. asociada a senescencia	At1g15250	+1.01	RPL37A (Prot. ribosomal)
At3g16500	+1.08	PAP1 (Prot. Asociada a Fitocromo 1)	At2g36160	+1.01	RPS14A (Prot. ribosomal)
At4g27260	+1.08	Indol-3-ácido acético amido sintasa	At1g60090	+1.00	Glicosil hidrolasa 1
At1g13080	+1.08	CYP71B2 (Citocromo P450 71B2)	At2g18050	+1.00	HIS1-3 (Histona H1-3)
At5g67070	+1.08	RALFL34 ( <i>Ralf LikeE 34</i> )	At3g16120	+1.00	Posible cadena ligera de dineína
At1g73120	+1.07	Función desconocida	At1g10210	+1.00	MPK1 ( <i>Mitogen Activated Protein Kinase 1</i> )
At5g54980	+1.07	Prot. integral de membrana	At1g55450	+1.00	Prot. abundante en la embriogénesis
At3g61100	+1.07	Función desconocida	At2g44640	+1.00	Similar a PDE320 ( <i>Pigment Defective 320</i> )
At1g76500	+1.07	Prot. de unión a DNA			
At1g33790	+1.07	Jacalina			
At1g08980	+1.07	AMI1 (Prot. tipo amidasa1)			



# Bibliografica

Bibliografica





- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2003). Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant Cell* **15**, 63-78.
- Abeles, F.B.** (1986). Role of Ethylene in *Lactuca sativa* cv. 'Grand Rapids' Seed Germination. *Plant Physiology* **81**, 780-787.
- Abrams, S.R., Reaney, M.J.T., Abrams, G.D., Mazurek, T., Shaw, A.C., and Gusta, L.V.** (1989). Ratio of (S)- to (R)-abscisic acid from plant cultures supplied with racemic ABA. *Phytochemistry* **28**, 2885-2889.
- Abuqamar, S., Luo, H., Laluk, K., Mickelbart, M.V., and Mengiste, T.** (2009). Crosstalk between biotic and abiotic stress responses in tomato is mediated by the AIM1 transcription factor. *Plant J* **58**, 347-360.
- Adie, B.A., Pérez-Pérez, J., Pérez-Pérez, M.M., Godoy, M., Sánchez-Serrano, J.J., Schmelz, E.A., and Solano, R.** (2007). ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in Arabidopsis. *The Plant Cell* **19**, 1665-1681.
- Agrawal, A.A.** (1998). Induced responses to herbivory and increased plant performance. *Science* **279**, 1201-1202.
- Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H., and Tasaka, M.** (1997). Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *The Plant Cell* **9**, 841-857.
- Aida, M., Ishida, T., and Tasaka, M.** (1999). Shoot apical meristem and cotyledon formation during Arabidopsis embryogenesis: interaction among the CUP-SHAPED COTYLEDON and SHOOT MERISTEMLESS genes. *Development* **126**, 1563-1570.
- Aida, M., Beis, D., Heidstra, R., Willemsen, V., Blilou, I., Galinha, C., Nussaume, L., Noh, Y.S., Amasino, R., and Scheres, B.** (2004). The PLETHORA genes mediate patterning of the Arabidopsis root stem cell niche. *Cell* **119**, 109-120.
- Aitchitt, M., Ainsworth, C. and Thangavelu, M.** (1993). A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from mature leaves of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Plant Molecular Biology* **11**, (4) 317-319.
- Ali-Rachedi, S., Bouinot, D., Wagner, M.H., Bonnet, M., Sotta, B., Grappin, P., and 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, J.M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S., and Ecker, J.R.** (1999). EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. *Science* **284**, 2148-2152.
- Anderson, J.P., Badruzaufari, E., Schenk, P.M., Manners, J.M., Desmond, O.J., Ehlert, C., Maclean, D.J., Ebert, P.R., and Kazan, K.** (2004). Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell* **16**, 3460-3479.

- Apuya, N.R., Yadegari, R., Fischer, R.L., Harada, J.J., and Goldberg, R.B.** (2002). RASPBERRY3 gene encodes a novel protein important for embryo development. *Plant Physiology* **129**, 691-705.
- Arenas-Huertero, F., Arroyo, A., Zhou, L., Sheen, J., and León, P.** (2000). Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes & Development* **14**, 2085-2096.
- Armstrong, F., Leung, J., Grabov, A., Brearley, J., Giraudat, J., and Blatt, M.R.** (1995). Sensitivity to abscisic acid of guard-cell K<sup>+</sup> channels is suppressed by *abi1-1*, a mutant Arabidopsis gene encoding a putative protein phosphatase. *Proc Natl Acad Sci* **92**, 9520-9524.
- Asselbergh, B., De Vleeschauwer, D., and Hofte, M.** (2008). Global switches and fine-tuning-ABA modulates plant pathogen defense. *Mol Plant Microbe Interact* **21**, 709-719.
- Assmann, S.M.** (2004). Plant G proteins, phytohormones, and plasticity: three questions and a speculation. *Sci STKE:re20*.
- Audenaert, K., Pattery, T., Cornelis, P., and Hofte, M.** (2002). Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 1147-1156.
- Azcón-Bieto, J. and Talón, M.** (2000). Fundamentos de Fisiología Vegetal. Interamericana McGraw-Hill, Madrid.
- Azcón-Bieto, J., and Talón, M.** (2008). Fundamentos de Fisiología Vegetal. Interamericana McGraw-Hill, Madrid.
- Backhouse, D., and Willetts, H.J.** (1987). Development and structure of infection cushions of *Botrytis cinerea*. *Transactions of the British Mycological Society* **89**, 89-95.
- Barrero, J.M., Piqueras, P., González-Guzmán, M., Serrano, R., Rodríguez, P.L., Ponce, M.R., and Micol, J.L.** (2005). A mutational analysis of the *ABAI* gene of *Arabidopsis thaliana* highlights the involvement of ABA in vegetative development. *Journal of Experimental Botany* **56**, 2071-2083.
- Barrero, J.M., Rodríguez, P.L., Quesada, V., Piqueras, P., Ponce, M.R., and Micol, J.L.** (2006). Both abscisic acid (ABA)-dependent and ABA-independent pathways govern the induction of *NCED3*, *AAO3* and *ABAI* in response to salt stress. *Plant, Cell & Environment* **29**, 2000-2008.
- Bartel, B., and Fink, G.R.** (1994). Differential regulation of an auxin-producing nitrilase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci* **91**, 6649-6653.
- Bartel, B.** (1997). Auxin Biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**, 51-66.
- Barthe, P., and Le Page-Degivry, M.T.** (1991). The resolution by HPLC of (R,S)-abscisic acid methyl ester and the metabolism of (-)-R-and (+)-S-abscisic acid by sunflower embryos. In abstracts of the 14th International Conference on Plant Growth Substances, Amsterdam, 68.

- Beck, E.H., Fettig, S., Knake, C., Hartig, K., and Bhattarai, T.** (2007). Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of biosciences* **32**, 501-510.
- Belin, C., de Franco, P.O., Bourbousse, C., Chaignepain, S., Schmitter, J.M., Vavasseur, A., Giraudat, J., Barbier-Brygoo, H., and Thomine, S.** (2006). Identification of features regulating OST1 kinase activity and OST1 function in guard cells. *Plant Physiology* **141**, 1316-1327.
- Bell, E., Creelman, R.A., and Mullet, J.E.** (1995). A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci* **92**, 8675-8679.
- Benedetti, C.E., Xie, D., and Turner, J.G.** (1995). Coil-dependent expression of an Arabidopsis vegetative storage protein in flowers and siliques and in response to coronatine or methyl jasmonate. *Plant Physiology* **109**, 567-572.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y.** (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society* **57**, 289-300.
- Bentsink, L., and Koornneef, M.** (2002). Seed dormancy and germination. *The Arabidopsis Book*. 1-18.
- Berger, S., Bell, E., and Mullet, J.E.** (1996). Two methyl jasmonate-insensitive mutants show altered expression of *AtVsp* in response to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiology* **111**, 525-531.
- Berleth, T., and Jürgens, G.** (1993). The role of the *monopteros* gene in organising the basal body region of the Arabidopsis embryo. *Development* **118**, 575-587.
- Bewley, J.D., and Black, M.** (1983). Physiology and Biochemistry of seeds. Springer-Verlag, Berlín, Heidelberg, Nueva York. Vol. I y II.
- Bewley, J.D., Black, M.** (1994). Seeds: Physiology of development and germination. Plenum Press, New York. 199-272
- Bewley, J.D.** (1997). Seed germination and dormancy. *The Plant Cell* **9**, 1055-1066.
- Blatt, M.R.** (2000). Cellular signaling and volume control in stomatal movements in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **16**, 221-241.
- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K., and Scheres, B.** (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature* **433**, 39-44.
- Borsani, O., Valpuesta, V., and Botella, M.A.** (2001). Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in Arabidopsis seedlings. *Plant Physiology* **126**, 1024-1030.

- Boter, M., Ruiz-Rivero, O., Abdeen, A., and Prat, S. (2004).** Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and Arabidopsis. *Genes & Development* **18**, 1577-1591.
- Brady, S.M., Sarkar, S.F., Bonetta, D., and McCourt, P. (2003).** The *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3)* gene is modulated by farnesylation and is involved in auxin signaling and lateral root development in Arabidopsis. *Plant J* **34**, 67-75.
- Braybrook, S.A., and Harada, J.J. (2008).** LECs go crazy in embryo development. *Trends in Plant Science* **13**, 624-630.
- Brocard-Gifford, I., Lynch, T.J., Garcia, M.E., Malhotra, B., and Finkelstein, R.R. (2004).** The *Arabidopsis thaliana ABSCISIC ACID-INSENSITIVE8* encodes a novel protein mediating abscisic acid and sugar responses essential for growth. *The Plant Cell* **16**, 406-421.
- Busk, P.K., and Pages, M. (1998).** Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Molecular Biology* **37**, 425-435.
- Cadle, M.M., Rayfuse, L.M., Walker-Simmons, M.K., and Jones, S.S. (1994).** Mapping of abscisic acid responsive genes and *vp1* to chromosomes in wheat and *Lophopyrum elongatum*. *Genome / National Research Council Canada* **37**, 129-132.
- Carles, C., Bies-Etheve, N., Aspart, L., Leon-Kloosterziel, K.M., Koornneef, M., Echeverria, M., and Delseny, M. (2002).** Regulation of *Arabidopsis thaliana* Em genes: role of *ABI5*. *Plant J* **30**, 373-383.
- Carrera, E., and Prat, S. (1998).** Expression of the *Arabidopsis abil-1* mutant allele inhibits proteinase inhibitor wound-induction in tomato. *Plant Journal* **15**, 765-771.
- Carrera, E., Holman, T., Medhurst, A., Dietrich, D., Footitt, S., Theodoulou, F.L., and Holdsworth, M.J. (2008).** Seed after-ripening is a discrete developmental pathway associated with specific gene networks in Arabidopsis. *Plant J* **53**, 214-224.
- Chen, T.H., and Gusta, L.V. (1983).** Abscisic acid-induced freezing resistance in cultured plant cells. *Plant Physiology* **73**, 71-75.
- Chen, J.G., Pandey, S., Huang, J., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Assmann, S.M., and Jones, A.M. (2004).** GCR1 can act independently of heterotrimeric G-protein in response to brassinosteroids and gibberellins in Arabidopsis seed germination. *Plant Physiology* **135**, 907-915.
- Cheng, W.H., Endo, A., Zhou, L., Penney, J., Chen, H.C., Arroyo, A., León, P., Nambara, E., Asami, T., Seo, M., Koshiba, T., and Sheen, J. (2002).** A unique short-chain dehydrogenase/reductase in Arabidopsis glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *The Plant Cell* **14**, 2723-2743.
- Cheong, Y.H., Chang, H.S., Gupta, R., Wang, X., Zhu, T., and Luan, S. (2002).** Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in Arabidopsis. *Plant Physiology* **129**, 661-677.

- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., García-Casado, G., López-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., Micol, J.L., and Solano, R.** (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**, 666-671.
- Chini, A., Boter, M., and Solano, R.** (2009). Plant oxylipins: COI1/JAZs/MYC2 as the core jasmonic acid-signalling module. *The FEBS Journal* **276**, 4682-4692.
- Chiwocha, S.D., Cutler, A.J., Abrams, S.R., Ambrose, S.J., Yang, J., Ross, A.R., and Kermode, A.R.** (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.
- Christensen, S.K., Dagenais, N., Chory, J., and Weigel, D.** (2000). Regulation of auxin response by the protein kinase PINOID. *Cell* **100**, 469-478.
- Church, G.y.G., W.** (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci* **81**, (7) 1991-1995.
- Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735-743.
- Collinge, M., and Boller, T.** (2001). Differential induction of two potato genes, *Stprx2* and *StNAC*, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. *Plant Molecular Biology* **46**, 521-529.
- Corbineau, F., Bianco, J., Garello, G., and 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.
- Creelman, R.A., and Mullet, J.E.** (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**, 355-381.
- Cruz Castillo, M., Martínez, C., Buchala, A., Métraux, J.P., and León, J.** (2004). Gene-specific involvement of beta-oxidation in wound-activated responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **135**, 85-94.
- Cummins, W.R., and Sondheimer, E.** (1973). Activity of the asymmetric isomers of abscisic acid in a rapid bioassay. *Planta* **111**, 365-369.
- Curtis, M.D., and Grossniklaus, U.** (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiology* **133**, 462-469.
- Cutler, A.J., Ghassemian, M., Bonnetta, D., Cooney, S. and McCourt, P.** (1996). A protein farnesyl transferase involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Science* **273**, 1239-1241.
- Cutler, A.J., and Krochko, J.E.** (1999). Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Science* **4**, 472-478.
- Cutler, S.R., Rodríguez, P.L., Finkelstein, R.R., and Abrams, S.R.** (2010). Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol* **61**, 651-679.

- Daie, J., and Campbell, W.F.** (1981). Response of tomato plants to stressful temperatures: increase in abscisic acid concentrations. *Plant Physiology* **67**, 26-29.
- Das, A.K., Helps, N.R., Cohen, P.T., and Barford, D.** (1996). Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *The EMBO Journal* **15**, 6798-6809.
- Davies, J.K., Jensen, E., Junttila, O., Rivier, L., and Crozier, A.** (1985). Identification of endogenous gibberellins from *Salix pentandra*. *Plant Physiology* **78**, 473-476.
- de Torres-Zabala, M., Truman, W., Bennett, M.H., Lafforgue, G., Mansfield, J.W., Rodriguez Egea, P., Bogre, L., and Grant, M.** (2007). *Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease. *The EMBO Journal* **26**, 1434-1443.
- Debeaujon, I., and Koornneef, M.** (2000). Gibberellin requirement for Arabidopsis seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid. *Plant Physiology* **122**, 415-424.
- Debeaujon, I., Leon-Kloosterziel, K.M., and Koornneef, M.** (2000). Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in Arabidopsis. *Plant Physiology* **122**, 403-414.
- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M., and Leemans, J.** (1985). Efficient octopine Ti plasmid vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. *Nucl. Acids Res* **13**, 4777- 4788.
- Delker, C., Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O., Feussner, I., and Wasternack, C.** (2006). Jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* enzymes, products, regulation. *Plant Biology* **8**, 297-306.
- Desikan, R., Cheung, M.K., Bright, J., Henson, D., Hancock, J.T., and Neill, S.J.** (2004). ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *Journal of Experimental Botany* **55**, 205-212.
- Devoto, A., Nieto-Rostro, M., Xie, D., Ellis, C., Harmston, R., Patrick, E., Davis, J., Sherratt, L., Coleman, M., and Turner, J.G.** (2002). COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in Arabidopsis. *Plant J* **32**, 457-466.
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., and Scheres, B.** (1993). Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development*. **119**, 71-84.
- Dommes, J.y.N., D.H.** (1985). The action of exogenous abscisic acid and gibberellic acid on gene expression in germinating castor bean. *Planta* **165**, 513-521.
- Dorffling, K., Schulenburg, S., Lesselich, G., and Dorffling, H.** (1990). Abscisic acid and proline levels in cold hardened winter wheat leaves in relation to variety-specific difference in freezing resistance. *J. Agron Crop Sci* **165**, 230-239.

- Duval, M., Hsieh, T.F., Kim, S.Y., and Thomas, T.L.** (2002). Molecular characterization of AtNAM: a member of the Arabidopsis NAC domain superfamily. *Plant Molecular Biology* **50**, 237-248.
- Ellis, C., and Turner, J.G.** (2001). The Arabidopsis mutant *cevl* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *The Plant Cell* **13**, 1025-1033.
- Ellis, C., Karafyllidis, I., Wasternack, C., and Turner, J.G.** (2002). The Arabidopsis mutant *cevl* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *The Plant Cell* **14**, 1557-1566.
- Ellis, C., and Turner, J.G.** (2002). A conditionally fertile *coil* allele indicates cross-talk between plant hormone signalling pathways in *Arabidopsis thaliana* seeds and young seedlings. *Planta* **215**, 549-556.
- Epple, P., Apel, K., and Bohlmann, H.** (1995). An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiology* **109**, 813-820.
- Ernst, H.A., Olsen, A.N., Larsen, S., and Lo Leggio, L.** (2004). Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors. *EMBO reports* **5**, 297-303.
- Fan, L.M., Zhao, Z., and Assmann, S.M.** (2004). Guard cells: a dynamic signaling model. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 537-546.
- Farmer, E.E., Johnson, R.R., and Ryan, C.A.** (1992). Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiology* **98**, 995-1002.
- Feng, S., Ma, L., Wang, X., Xie, D., Dinesh-Kumar, S.P., Wei, N., and Deng, X.W.** (2003). The COP9 signalosome interacts physically with SCF CO11 and modulates jasmonate responses. *The Plant Cell* **15**, 1083-1094.
- Fernández, A.P., and Strand, A.** (2008). Retrograde signaling and plant stress: plastid signals initiate cellular stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 509-513.
- Fernández-Arbaizar, A.** (2008). Interacción entre las rutas de señalización del ácido abscísico (ABA) y ácido jasmónico (JA) en la germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana*. Trabajo de Grado. Universidad de Salamanca.
- Feurtado, J.A., Ambrose, S.J., Cutler, A.J., Ross, A.R., Abrams, S.R., and Kermode, A.R.** (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.
- Feys, B., Benedetti, C.E., Penfold, C.N., and Turner, J.G.** (1994). Arabidopsis mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *The Plant Cell* **6**, 751-759.
- Finch-Savage, W.E., and Leubner-Metzger, G.** (2006). Seed dormancy and the control of germination. *The New Phytologist* **171**, 501-523.

- Finkelstein, R.R., Tenbarger, K.M., Shumway, J.E., and Crouch, M.L. (1985). Role of ABA in maturation of rapeseed embryos. *Plant Physiology* **78**, 630-636.
- Finkelstein, R.R. (1994). Maternal effects govern variable dominance of two abscisic acid response mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **105**, 1203-1208.
- Finkelstein, R.R., Wang, M.L., Lynch, T.J., Rao, S., and Goodman, H.M. (1998). The *Arabidopsis* abscisic acid response locus *ABI4* encodes an APETALA 2 domain protein. *The Plant Cell* **10**, 1043-1054.
- Finkelstein, R.R., and Lynch, T.J. (2000). The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *The Plant Cell* **12**, 599-609.
- Finkelstein, R.R., Gampala, S.S., and Rock, C.D. (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *The Plant Cell* **14 Suppl**, S15-45.
- Fischer, C., and Neuhaus, G. (1996). Influence of auxin on the establishment of bilateral symmetry in monocots. *Plant Journal* **9**, 659-669.
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., Miersch, O., Wasternack, C., and Solano, R. (2009). (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology* **5**, 344-350.
- Fonseca, S., Chico, J.M., and Solano, R. (2009). The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core signalling module. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 539-547.
- Footitt, S., Slocombe, S.P., Larner, V., Kurup, S., Wu, Y., Larson, T., Graham, I., Baker, A., and Holdsworth, M. (2002). Control of germination and lipid mobilization by COMATOSE, the *Arabidopsis* homologue of human ALDP. *The EMBO Journal* **21**, 2912-2922.
- Footitt, S., Dietrich, D., Fait, A., Fernie, A.R., Holdsworth, M.J., Baker, A., and Theodoulou, F.L. (2007). The COMATOSE ATP-binding cassette transporter is required for full fertility in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **144**, 1467-1480.
- Friml, J., Benkova, E., Blilou, I., Wisniewska, J., Hamann, T., Ljung, K., Woody, S., Sandberg, G., Scheres, B., Jurgens, G., and Palme, K. (2002). *AtPIN4* mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell* **108**, 661-673.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R., and Jurgens, G. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* **426**, 147-153.
- Fujii, H., Verslues, P.E., and Zhu, J.K. (2007). Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**, 485-494.
- Fujii, H., Chinnusamy, V., Rodrigues, A., Rubio, S., Antoni, R., Park, S.Y., Cutler, S.R., Sheen, J., Rodriguez, P.L., and Zhu, J.K. (2009). In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature* **462**, 660-664.

- Fujita, M., Fujita, Y., Maruyama, K., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Tran, L.S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2004).** A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *Plant J* **39**, 863-876.
- Furihata, T., Maruyama, K., Fujita, Y., Umezawa, T., Yoshida, R., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006).** Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc Natl Acad Sci* **103**, 1988-1993.
- Gao, Y., Zeng, Q., Guo, J., Cheng, J., Ellis, B.E., and Chen, J.G. (2007).** Genetic characterization reveals no role for the reported ABA receptor, GCR2, in ABA control of seed germination and early seedling development in Arabidopsis. *Plant J* **52**, 1001-1013.
- Garcia-Mata, C., and Lamattina, L. (2007).** Abscisic acid (ABA) inhibits light-induced stomatal opening through calcium- and nitric oxide-mediated signaling pathways. *Nitric Oxide* **17**, 143-151.
- Gazzarrini, S., and McCourt, P. (2003).** Cross-talk in plant hormone signalling: what Arabidopsis mutants are telling us. *Annals of Botany* **91**, 605-612.
- Ghassemian, M., Nambara, E., Cutler, S., Kawaide, H., Kamiya, Y., and McCourt, P. (2000).** Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in Arabidopsis. *The Plant Cell* **12**, 1117-1126.
- Gilmartin, P.M., Sarokin, L., Memelink, J., and Chua, N.H. (1990).** Molecular light switches for plant genes. *The Plant Cell* **2**, 369-378.
- Giraudat, J., Hauge, B.M., Valon, C., Smalle, J., Parcy, F., and Goodman, H.M. (1992).** Isolation of the Arabidopsis *ABI3* gene by positional cloning. *The Plant Cell* **4**, 1251-1261.
- Godoy, M., Franco-Zorrilla, J.M., Pérez-Pérez, J., Oliveros, J.C., Lorenzo, O., and Solano, R. (2010).** Identification of DNA-binding specificities of transcription factors by combined high-throughput Protein-Binding-Microarrays, transcriptomic data and phylogenomic footprinting. *Plant Journal*. Enviado.
- Gómez-Cadenas, A., Verhey, S.D., Holappa, L.D., Shen, Q., Ho, T.H., and Walker-Simmons, M.K. (1999).** An abscisic acid-induced protein kinase, PKABA1, mediates abscisic acid-suppressed gene expression in barley aleurone layers. *Proc Natl Acad Sci* **96**, 1767-1772.
- Gómez-Cadenas, A., Zentella, R., Sutliff, T.D., and Ho, T.H. (2001).** Involvement of multiple cis-elements in the regulation of GA responsive promoters: definition of a new cis-element in the *Amy32b* gene promoter of barley (*Hordeum vulgare*). *Physiol Plant* **112**, 211-216.
- González-García, M.P., Rodríguez, D., Nicolás, C., Rodríguez, P.L., Nicolás, G., and 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 Physiology* **133**, 135-144.

- González-García, M.P.** (2005). 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. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- González-García, M.P., Rodríguez, D., Nicolás, C., Nicolás, G. and Lorenzo, O.** (2006). A protein phosphatase 2A from *Fagus sylvatica* is regulated by GA3 and okadaic acid in seeds and related to the transition from dormancy to germination. *Physiol Plant* **128**, 153-162.
- González-Guzmán, M., Abia, D., Salinas, J., Serrano, R., and Rodríguez, P.L.** (2004). Two new alleles of the *ABSCISIC ALDEHYDE OXIDASE 3* gene reveal its role in abscisic acid biosynthesis in seeds. *Plant Physiology* **135**, 325-333.
- González-Guzmán, M., Apostolova, N., Belles, J.M., Barrero, J.M., Piqueras, P., Ponce, M.R., Micol, J.L., Serrano, R., and Rodríguez, P.L.** (2002). The short-chain alcohol dehydrogenase *ABA2* catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. *The Plant Cell* **14**, 1833-1846.
- Gosti, F., Beaudoin, N., Serizet, C., Webb, A.A., Vartanian, N., and Giraudat, J.** (1999). *ABI1* protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *The Plant Cell* **11**, 1897-1910.
- Grabov, A., and Blatt, M.R.** (1998). Membrane voltage initiates  $Ca^{2+}$  waves and potentiates  $Ca^{2+}$  increases with abscisic acid in stomatal guard cells. *Proc Natl Acad Sci* **95**, 4778-4783.
- Grappin, P., Bouinot, D., Sotta, B., Miginiac, E., and Jullien, M.** (2000). Control of seed dormancy in *Nicotiana plumbaginifolia*: post-imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. *Planta* **210**, 279-285.
- Gubler, F., Kalla, R., Roberts, J.K., and Jacobsen, J.V.** (1995). Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pI alpha-amylase gene promoter. *The Plant Cell* **7**, 1879-1891.
- Gubler, F., Millar, A.A., and Jacobsen, J.V.** (2005). Dormancy release, ABA and pre-harvest sprouting. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 183-187.
- Gundlach, H., Muller, M.J., Kutchan, T.M., and Zenk, M.H.** (1992). Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc Natl Acad Sci* **89**, 2389-2393.
- Gutiérrez, L., Van Wuytswinkel, O., Castelain, M., and Bellini, C.** (2007). Combined networks regulating seed maturation. *Trends in Plant Science* **12**, 294-300.
- Hadfi, K., Speth, V., and Neuhaus, G.** (1998). Auxin-induced developmental patterns in *Brassica juncea* embryos. *Development* **125**, 879-887.
- Haecker, A., Gross-Hardt, R., Geiges, B., Sarkar, A., Breuninger, H., Herrmann, M., and Laux, T.** (2004). Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development*. **131**, 657-668.

- Hagenbeek, D., Quatrano, R.S., and Rock, C.D.** (2000). Trivalent ions activate abscisic acid-inducible promoters through an ABI1-dependent pathway in rice protoplasts. *Plant Physiology* **123**, 1553-1560.
- Hamann, T., Mayer, U., and Jurgens, G.** (1999). The auxin-insensitive *bodenlos* mutation affects primary root formation and apical-basal patterning in the Arabidopsis embryo. *Development*. **126**, 1387-1395.
- Hamann, T., Benkova, E., Baurle, I., Kientz, M., and Jurgens, G.** (2002). The Arabidopsis *BODENLOS* gene encodes an auxin response protein inhibiting *MONOPTEROS*-mediated embryo patterning. *Genes & Development* **16**, 1610-1615.
- Hamilton, D.W., Hills, A., Kohler, B., and Blatt, M.R.** (2000). Ca<sup>2+</sup> channels at the plasma membrane of stomatal guard cells are activated by hyperpolarization and abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci* **97**, 4967-4972.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**, 557-580.
- Hao, D., Ohme-Takagi, M., and Sarai, A.** (1998). Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plant. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 26857-26861.
- Hao, Y.J., Song, Q.X., Chen, H.W., Zou, H.F., Wei, W., Kang, X.S., Ma, B., Zhang, W.K., Zhang, J.S., and Chen, S.Y.** (2010). Plant NAC-type transcription factor proteins contain a NARD domain for repression of transcriptional activation. *Planta* **232**, 1033-1043.
- Harada, J.J.** (1997). Seed maturation and control of germination. In *Advances in Cellular and Molecular Biology of Seed Development*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 545-592.
- Hardtke, C.S., and Berleth, T.** (1998). The Arabidopsis gene *MONOPTEROS* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *The EMBO Journal* **17**, 1405-1411.
- Hare, P.D., Cress, W.A., and van Staden, J.** (1999). Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. *Journal of Experimental Botany* **50**, 413-434.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., and Bohnert, H.J.** (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**, 463-499.
- Hays, D.B., Wilen, R.W., Sheng, C., Moloney, M.M., and Pharis, R.P.** (1999). Embryo-specific gene expression in microspore-derived embryos of *Brassica napus*. An interaction between abscisic acid and jasmonic acid1,2. *Plant Physiology* **119**, 1065-1072.
- Hays, D.B., Mandel, R.M., and Pharis, R.P.** (2001). Hormones in zygotic and microspore embryos of *Brassica napus*. *Plant Growth Regu* **35**, 47-58.

- He, Y., Fukushige, H., Hildebrand, D.F., and Gan, S. (2002). Evidence supporting a role of jasmonic acid in Arabidopsis leaf senescence. *Plant Physiology* **128**, 876-884.
- He, X.J., Mu, R.L., Cao, W.H., Zhang, Z.G., Zhang, J.S., and Chen, S.Y. (2005). AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. *Plant J* **44**, 903-916.
- Heino, P., Sandman, G., Lang, V., Nordin, K., and Palva, E.T. (1990). Abscisic acid deficiency prevents development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *TAG Theoretical and Applied Genetics*. **79**, 801-806.
- Hernández-Blanco, C., Feng, D.X., Hu, J., Sánchez-Vallet, A., Deslandes, L., Llorente, F., Berrocal-Lobo, M., Keller, H., Barlet, X., Sánchez-Rodríguez, C., Anderson, L.K., Somerville, S., Marco, Y., and Molina, A. (2007). Impairment of cellulose synthases required for Arabidopsis secondary cell wall formation enhances disease resistance. *The Plant Cell* **19**, 890-903.
- Hilpert, B., Bohlmann, H., op den Camp, R.O., Przybyla, D., Miersch, O., Buchala, A., and Apel, K. (2001). Isolation and characterization of signal transduction mutants of *Arabidopsis thaliana* that constitutively activate the octadecanoid pathway and form necrotic microlesions. *Plant J* **26**, 435-446.
- Himmelbach, A., Iten, M., and Grill, E. (1998). Signalling of abscisic acid to regulate plant growth. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **353**, 1439-1444.
- Himmelbach, A., Hoffmann, T., Leube, M., Hohener, B., and Grill, E. (2002). Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in Arabidopsis. *The EMBO Journal* **21**, 3029-3038.
- Hobbie, L., McGovern, M., Hurwitz, L.R., Pierro, A., Liu, N.Y., Bandyopadhyay, A., and Estelle, M. (2000). The axr6 mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene involved in auxin response and early development. *Development* **127**, 23-32.
- Howe, G.A., and Jander, G. (2008). Plant Immunity to insect herbivores. *Annu Rev Plant Biol* **59**, 41-66.
- Hu, W., and Ma, H. (2006). Characterization of a novel putative zinc finger gene *MIF1*: involvement in multiple hormonal regulation of Arabidopsis development. *Plant J* **45**, 399-422.
- Hu, J., Mitchum, M.G., Barnaby, N., Ayele, B.T., Ogawa, M., Nam, E., Lai, W.C., Hanada, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Swain, S.M., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., and Sun, T.P. (2008). Potential sites of bioactive gibberellin production during reproductive growth in Arabidopsis. *The Plant Cell* **20**, 320-336.
- Huffaker, A., Pearce, G., and Ryan, C.A. (2006). An endogenous peptide signal in Arabidopsis activates components of the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci* **103**, 10098-10103.
- Hugouvieux, V., Kwak, J.M., and Schroeder, J.I. (2001). An mRNA cap binding protein, ABH1, modulates early abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *Cell* **106**, 477-487.

- Huijser, C., Kortstee, A., Pego, J., Weisbeek, P., Wisman, E., and Smeekens, S. (2000). The *Arabidopsis* *SUCROSE UNCOUPLED-6* gene is identical to *ABSCISIC ACID INSENSITIVE-4*: involvement of abscisic acid in sugar responses. *Plant J* **23**, 577-585.
- Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U., and Speed, T.P. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**, 249-264.
- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I., and Okada, K. (2001). The *DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE* gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **13**, 2191-2209.
- Ishitani, M., Xiong, L., Stevenson, B., and Zhu, J.K. (1997). Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in *Arabidopsis*: interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways. *The Plant Cell* **9**, 1935-1949.
- Israelsson, M., Siegel, R.S., Young, J., Hashimoto, M., Iba, K., and Schroeder, J.I. (2006). Guard cell ABA and CO<sub>2</sub> signaling network updates and Ca<sup>2+</sup> sensor priming hypothesis. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 654-663.
- Jacobsen, S.E., and Olszewski, N.E. (1993). Mutations at the *SPINDLY* locus of *Arabidopsis* alter gibberellin signal transduction. *The Plant Cell* **5**, 887-896.
- Jacobsen, J.V., Pearce, D.W., Paris, R.P., and Mander, L.N. (2004). Abscisic acid, phaseic acid and gibberellin contents associated with dormancy and germination in barley. *Plant Physiology* **115**, 428-441.
- Jakab, G., Ton, J., Flors, V., Zimmerli, L., Mettraux, J.P., and Mauch-Mani, B. (2005). Enhancing *Arabidopsis* salt and drought stress tolerance by chemical priming for its abscisic acid responses. *Plant Physiology* **139**, 267-274.
- Jeannette, E., Rona, J.P., Bardat, F., Cornel, D., Sotta, B., and Miginiac, E. (1999). Induction of *RABI8* 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.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., and Bevan, M.W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* **6**, 3901-3907.
- Jensen, A.B., Raventos, D., and Mundy, J. (2002). Fusion genetic analysis of jasmonate-signalling mutants in *Arabidopsis*. *Plant J* **29**, 595-606.
- Jiang, H., Li, H., Bu, Q., and Li, C. (2009). The RHA2a-interacting proteins ANAC019 and ANAC055 may play a dual role in regulating ABA response and jasmonate response. *Plant Signaling & Behavior* **4**, 464-466.
- Jurado, O., Albacete, A., Martínez-Ballesta, M.C., Carvajal, M., Pérez-Alfocea, F., Dodd, I.C., and Romero-Aranda, M.R. (2009). Water relations of the *tos1* tomato mutant at contrasting evaporative demand. *Physiol Plant*.

- Kagaya, Y., Toyoshima, R., Okuda, R., Usui, H., Yamamoto, A., and Hattori, T. (2005).** LEAFY COTYLEDON1 controls seed storage protein genes through its regulation of FUSCA3 and ABSCISIC ACID INSENSITIVE3. *Plant & Cell Physiology* **46**, 399-406.
- Kaliff, M., Staal, J., Myrenas, M., and Dixelius, C. (2007).** ABA is required for *Leptosphaeria maculans* resistance via ABI1- and ABI4-dependent signaling. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 335-345.
- Karssen, C., Brinkhorst-van der Swan, D.C.L., Breekland, A.E., and M., K. (1983).** Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* **157**, 158-165.
- Karssen, C., and Lacka, E. (1986).** A revision of the hormone balance theory of seed dormancy: studies on gibberellin and/or abscisic acid deficient mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Substances*, 315-323.
- Katsir, L., Chung, H.S., Koo, A.J., and Howe, G.A. (2008).** Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing. *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 428-435.
- Katsir, I., Schillmiller, A.L., Staswick, P.E., He, S.Y., and Howe, G.A. (2008).** COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *PNAS* **105**, 7100-7105.
- Keith, K., Kraml, M., Dengler, N.G., and McCourt, P. (1994).** *fusca3*: a heterochronic mutation affecting late embryo development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **6**, 589-600.
- Kim, S.G., Lee, A.K., Yoon, H.K., and Park, C.M. (2008).** A membrane-bound NAC transcription factor NTL8 regulates gibberellic acid-mediated salt signaling in *Arabidopsis* seed germination. *Plant J* **55**, 77-88.
- Klein, T.M., Fromm, M., Weissinger, A., Tomes, D., Schaaf, S., Sletten, M., and Sanford, J.C. (1987).** High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* **327**, 70-73.
- Kohler, B., and Blatt, M.R. (2002).** Protein phosphorylation activates the guard cell Ca<sup>2+</sup> channel and is a prerequisite for gating by abscisic acid. *Plant J* **32**, 185-194.
- Komatsu, K., Nishikawa, Y., Ohtsuka, T., Taji, T., Quatrano, R.S., Tanaka, S., and Sakata, Y. (2009).** Functional analyses of the ABI1-related protein phosphatase type 2C reveal evolutionarily conserved regulation of abscisic acid signaling between *Arabidopsis* and the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Molecular Biology* **70**, 327-340.
- Kong, Z., Li, M., Yang, W., Xu, W., and Xue, Y. (2006).** A novel nuclear-localized CCCH-type zinc finger protein, OsDOS, is involved in delaying leaf senescence in rice. *Plant Physiology* **141**, 1376-1388.
- Koornneef, M., Dellaert, L.W., and van der Veen, J.H. (1982).** EMS- and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Mutation research* **93**, 109-123.

- Koornneef, M., Hanhart, C.J., Hilhorst, H.W., and Karssen, C.M.** (1989). In vivo inhibition of seed development and reserve protein accumulation in recombinants of abscisic acid biosynthesis and responsiveness mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **90**, 463-469.
- Koornneef, M., and Karssen, C.** (1994). Seed dormancy and germination. Cold Spring Harbor Laboratory Press (ed. E. M. Meyerowitz and C. Somerville).
- Koornneef, M., León-Kloosterziel, K.M., Schwartz, S.H., and Zeevaart, J.A.** (1998). The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* **36**, 83-89.
- Koornneef M., H.C.** (1984). The localization of two ABA-insensitive genes. *Arabid Inf Serv* **21**, 5-9.
- Kramell, R., Miersch, O., Hause, B., Ortel, B., Parthier, B., and Wasternack, C.** (1997). Amino acid conjugates of jasmonic acid induce jasmonate-responsive gene expression in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *FEBS letters* **414**, 197-202.
- Krochko, J.E., Abrams, G.D., Loewen, M.K., Abrams, S.R., and Cutler, A.J.** (1998). (+)-Abscisic acid 8'-hydroxylase is a cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Physiology* **118**, 849-860.
- Kushiro, T., Okamoto, M., Nakabayashi, K., Yamagishi, K., Kitamura, S., Asami, T., Hirai, N., Koshiba, T., Kamiya, Y., and Nambara, E.** (2004). The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *The EMBO Journal* **23**, 1647-1656.
- Laby, R.J., Kincaid, M.S., Kim, D., and Gibson, S.I.** (2000). The *Arabidopsis* sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. *Plant J* **23**, 587-596.
- Lamb, P., and McKnight, S.L.** (1991). Diversity and specificity in transcriptional regulation: the benefits of heterotypic dimerization. *Trends in Biochemical Sciences* **16**, 417-422.
- Lang, V., and Palva, E.T.** (1992). The expression of a rab-related gene, *RAB18*, is induced by abscisic acid during the cold acclimation process of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Molecular Biology* **20**, 951-962.
- Lang, V., Mantyla, E., Welin, B., Sundberg, B., and Palva, E.T.** (1994). Alterations in water status, endogenous abscisic acid content, and expression of *RAB18* gene during the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **104**, 1341-1349.
- Lara, P., Oñate-Sánchez, L., Abraham, Z., Ferrándiz, C., Díaz, I., Carbonero, P., and Vicente-Carbajosa, J.** (2003). Synergistic activation of seed storage protein gene expression in *Arabidopsis* by *ABI3* and two bZIPs related to *OPAQUE2*. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 21003-21011.
- Laudert, D., Pfannschmidt, U., Lottspeich, F., Hollander-Czytka, H., and Weiler, E.W.** (1996). Cloning, molecular and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase (CYP 74), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates. *Plant molecular biology* **31**, 323-335.

- Laux, T., Wurschum, T., and Breuninger, H.** (2004). Genetic regulation of embryonic pattern formation. *The Plant Cell* **16 Suppl**, S190-202.
- Le Page-Degivry, M.T., and Garello, G.** (1992). In situ abscisic acid synthesis : a requirement for induction of embryo dormancy in *Helianthus annuus*. *Plant Physiology* **98**, 1386-1390.
- Lee, J., Parthier, B., and Lobler, M.** (1996). Jasmonate signalling can be uncoupled from abscisic acid signalling in barley: identification of jasmonate-regulated transcripts which are not induced by abscisic acid. *Planta* **199**, 625-632.
- Lee, S., Cheng, H., King, K.E., Wang, W., He, Y., Hussain, A., Lo, J., Harberd, N.P., and Peng, J.** (2002). Gibberellin regulates Arabidopsis seed germination via *RGL2*, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes & Development* **16**, 646-658.
- León, J., Rojo, E., and Sánchez-Serrano, J.J.** (2001). Wound signalling in plants. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1-9.
- León-Kloosterziel, K.M., van de Bunt, G.A., Zeevaert, J.A., and Koornneef, M.** (1996). Arabidopsis mutants with a reduced seed dormancy. *Plant Physiology* **110**, 233-240.
- León-Kloosterziel, K.M., Gil, M.A., Rujis, G.J., Jacobsen, S.E., Olszewski, N.E., Schwartz, S.H., Zeevaert, J.A., and M, K.** (1996). Isolation and characterization of abscisic acid-deficient Arabidopsis mutants at two new loci. *Plant Journal* **10**, 655-661.
- Leung, J., Bouvier-Durand, M., Morris, P.C., Guerrier, D., Cheddor, F., and Giraudat, J.** (1994). Arabidopsis ABA response gene *ABII*: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* **264**, 1448-1452.
- Leung, J., Merlot, S., and Giraudat, J.** (1997). The Arabidopsis *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (ABI2)* and *ABII* genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *The Plant Cell* **9**, 759-771.
- Leung, J., and Giraudat, J.** (1998). Abscisic acid tignal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**, 199-222.
- Li, L., Li, C., and Howe, G.A.** (2001). Genetic analysis of wound signaling in tomato. Evidence for a dual role of jasmonic acid in defense and female fertility. *Plant Physiology* **127**, 1414-1417.
- Li, H., Shen, J.J., Zheng, Z.L., Lin, Y., and Yang, Z.** (2001). The Rop GTPase switch controls multiple developmental processes in Arabidopsis. *Plant Physiology* **126**, 670-684.
- Li, L., Zhao, Y., McCaig, B.C., Wingerd, B.A., Wang, J., Whalon, M.E., Pichersky, E., and Howe, G.A.** (2004). The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *The Plant Cell* **16**, 126-143.

- Li, C., Schilmiller, A.L., Liu, G., Lee, G.I., Jayanty, S., Sageman, C., Vrebalov, J., Giovannoni, J.J., Yagi, K., Kobayashi, Y., and Howe, G.A. (2005). Role of beta-oxidation in jasmonate biosynthesis and systemic wound signaling in tomato. *The Plant Cell* **17**, 971-986.
- Li, C., Zhao, J., Jiang, H., Wu, X., Sun, J., Zhang, C., Wang, X., Lou, Y., and Li, C. (2006). The wound response mutant *suppressor of prosystemin-mediated responses 6* (*spr6*) is a weak allele of the tomato homolog of *CORONATINE-INSENSITIVE1* (*COI1*). *Plant & Cell Physiology* **47**, 653-663.
- Li, F., Asami, T., Wu, X., Tsang, E.W., and Cutler, A.J. (2007). A putative hydroxysteroid dehydrogenase involved in regulating plant growth and development. *Plant Physiology* **145**, 87-97.
- Liu, Y., van der Burg, J., Aartse, J., Van Zwol, R., Jalink, H., and Bino, R. (1993). X-ray studies on changes in embryo and endosperm morphology during priming and imbibition of tomato seeds. *Seed Science Research* **3**, 171-178.
- Liu, Y., Bergervoet, J., Ric de Vos, C., Hilhorst, H., Kraak, H., Karssen, C., and Bino, R. (1994). Nuclear replication activities during imbibition of abscisic acid- and gibberellin-deficient tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed. *Planta* **194**, 368-373.
- Liu, X., Yue, Y., Li, B., Nie, Y., Li, W., Wu, W.H., and Ma, L. (2007). A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science* **315**, 1712-1716.
- Llorente, F., Oliveros, J.C., Martínez-Zapater, J.M., and Salinas, J. (2000). A freezing-sensitive mutant of *Arabidopsis*, *frs1*, is a new *aba3* allele. *Planta* **211**, 648-655.
- López-Molina, L., and Chua, N.H. (2000). A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology* **41**, 541-547.
- López-Molina, L., Mongrand, S., and Chua, N.H. (2001). A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci* **98**, 4782-4787.
- López-Molina, L., Mongrand, S., McLachlin, D.T., Chait, B.T., and Chua, N.H. (2002). ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. *Plant J* **32**, 317-328.
- Lorenzo, O. (2000). Regulación hormonal de la dormición de semillas de haya (*Fagus sylvatica* L): Expresión de proteínas específicas relacionadas con la transducción de señales. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- Lorenzo, O., Rodríguez, D., Nicolás, G., Rodríguez, P.L. and Nicolás, C. (2001). A new protein phosphatase 2C (*FsPP2C1*) induced by ABA is specifically expressed in dormant seeds of *Fagus sylvatica* L. *Plant Physiology* **125**, 1949-1956.
- Lorenzo, O., Nicolás, C., Nicolás, G., and Rodríguez, D. (2002). GA(3)-induced expression of a new functional AAA-ATPase (*FsA1*) is correlated with the onset of germination in *Fagus sylvatica* L. seeds (beechnuts). *Plant & Cell Physiology* **43**, 27-34.

- Lorenzo, O., Nicolás, C., Nicolás, G., and Rodríguez, D. (2002). Molecular cloning of a functional protein phosphatase 2C (FsPP2C2) with unusual features and synergistically up-regulated by ABA and calcium in dormant seeds of *Fagus sylvatica*. *Physiol Plant* **114**, 482-490.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J.J., and Solano, R. (2003). ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *The Plant Cell* **15**, 165-178.
- Lorenzo, O., Chico, J.M., Sánchez-Serrano, J.J., and Solano, R. (2004). JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. *The Plant Cell* **16**, 1938-1950.
- Lorenzo, O., and Solano, R. (2005). Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 532-540.
- Loscos, J., Matamoros, M.A., and Becana, M. (2008). Ascorbate and homoglutathione metabolism in common bean nodules under stress conditions and during natural senescence. *Plant Physiology* **146**, 1282-1292.
- Lovegrove, A., and Hooley, R. (2000). Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. *Trends in Plant Science* **5**, 102-110.
- Lu, P., Porat, R., Nadeau, J.A., and O'Neill, S.D. (1996). Identification of a meristem L1 layer-specific gene in Arabidopsis that is expressed during embryonic pattern formation and defines a new class of homeobox genes. *The Plant Cell* **8**, 2155-2168.
- Lu, P.L., Chen, N.Z., An, R., Su, Z., Qi, B.S., Ren, F., Chen, J., and Wang, X.C. (2007). A novel drought-inducible gene, ATAF1, encodes a NAC family protein that negatively regulates the expression of stress-responsive genes in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* **63**, 289-305.
- Lukowitz, W., Mayer, U., and Jurgens, G. (1996). Cytokinesis in the Arabidopsis embryo involves the syntaxin-related KNOLLE gene product. *Cell* **84**, 61-71.
- Lukowitz, W., Roeder, A., Parmenter, D., and Somerville, C. (2004). A MAPKK kinase gene regulates extra-embryonic cell fate in Arabidopsis. *Cell* **116**, 109-119.
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., and Grill, E. (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* **324**, 1064-1068.
- Magome, H., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kamiya, Y., and 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.
- Mantyla, E., Lang, V., and Palva, E.T. (1995). Role of abscisic acid in drought-induced freezing tolerance, cold acclimation, and accumulation of LT178 and RAB18 proteins in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiology* **107**, 141-148.
- Manz, B., Muller, K., Kucera, B., Volke, F., and Leubner-Metzger, G. (2005). Water uptake and distribution in germinating tobacco seeds investigated in vivo by nuclear magnetic resonance imaging. *Plant Physiology* **138**, 1538-1551.

- Matakiadis, T., Alboresi, A., Jikumaru, Y., Tatematsu, K., Pichon, O., Renou, J.P., Kamiya, Y., Nambara, E., and Truong, H.N.** (2009). The *Arabidopsis* abscisic acid catabolic gene CYP707A2 plays a key role in nitrate control of seed dormancy. *Plant Physiology* **149**, 949-960.
- Mauch-Mani, B., and Mauch, F.** (2005). The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 409-414.
- Mayer, U., Büttner, G., and Jürgens, G.** (1993). Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo: studies on the role of the *gnom* gene. *Development* **117**, 149-162.
- McCarty, D.R., Hattori, T., Carson, C.B., Vasil, V., Lazar, M., and Vasil, I.K.** (1991). The *Viviparous-1* developmental gene of maize encodes a novel transcriptional activator. *Cell* **66**, 895-905.
- McConn, M., and Browse, J.** (1996). The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an *Arabidopsis* mutant. *The Plant Cell* **8**, 403-416.
- McConn, M., Creelman, R.A., Bell, E., Mullet, J.E., and Browse, J.** (1997). Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci* **94**, 5473-5477.
- Meinke, D.W., Franzmann, L.H., Nickle, T.C., and Yeung, E.C.** (1994). Leafy cotyledon mutants of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **6**, 1049-1064.
- Melan, M.A., Dong, X., Endara, M.E., Davis, K.R., Ausubel, F.M., and Peterman, T.K.** (1993). An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. *Plant Physiology* **101**, 441-450.
- Melcher, K., Ng, L.M., Zhou, X.E., Soon, F.F., Xu, Y., Suino-Powell, K.M., Park, S.Y., Weiner, J.J., Fujii, H., Chinnusamy, V., Kovach, A., Li, J., Wang, Y., Li, J., Peterson, F.C., Jensen, D.R., Yong, E.L., Volkman, B.F., Cutler, S.R., Zhu, J.K., and Xu, H.E.** (2009). A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature* **462**, 602-608.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., and He, S.Y.** (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**, 969-980.
- Melotto, M., Mecey, C., Niu, Y., Chung, H.S., Katsir, L., Yao, J., Zeng, W., Thines, B., Staswick, P., Browse, J., Howe, G.A., and He, S.Y.** (2008). A critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of *Arabidopsis* JAZ proteins in mediating coronatine- and jasmonoyl isoleucine-dependent interactions with the COI1 F-box protein. *Plant J* **55**, 979-988.
- Merlot, S., Gosti, F., Guerrier, D., Vavasseur, A., and 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.
- Mertens, R., Suning, M., and Weiler, E.W.** (1982). Metabolism of tritiated enantiomers of abscisic acid prepared by immunoaffinity chromatography. *Naturwissenschaften* **69**, 595-597.
- Meyer, K., Leube, M.P., and Grill, E.** (1994). A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **264**, 1452-1455.

- Miki, T., Park, J.A., Nagao, K., Murayama, N., and Horiuchi, T.** (1992). Control of segregation of chromosomal DNA by sex factor F in *Escherichia coli*. Mutants of DNA gyrase subunit A suppress letD (*ccdB*) product growth inhibition. Journal of Molecular Biology **225**, 39-52.
- Milborrow, B.V., and Rubery, P.H.** (1985). The specificity of the carrier-mediated uptake of ABA by root segments of *Phaseolus coccineus*. L. J Exp Bot. **36**, 807-822.
- Miyazono, K., Miyakawa, T., Sawano, Y., Kubota, K., Kang, H.J., Asano, A., Miyauchi, Y., Takahashi, M., Zhi, Y., Fujita, Y., Yoshida, T., Kodaira, K.S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Tanokura, M.** (2009). Structural basis of abscisic acid signalling. Nature **462**, 609-614.
- Moes, D., Himmelbach, A., Korte, A., Haberer, G., and Grill, E.** (2008). Nuclear localization of the mutant protein phosphatase *abi1* is required for insensitivity towards ABA responses in *Arabidopsis*. Plant J **54**, 806-819.
- Mohapatra, S.S., Poole, R.J., and Dhindsa, R.S.** (1988). Abscisic acid-regulated gene expression in relation to freezing tolerance in alfalfa. Plant Physiology **87**, 468-473.
- Moore, R., and Smith, J.D.** (1984). Growth, graviresponsiveness and abscisic-acid content of *Zea mays* seedlings treated with fluridone. Planta **162**, 342-344.
- Moore, R., and Smith, J.D.** (1985). Graviresponsiveness and abscisic-acid content of roots of carotenoid-deficient mutants of *Zea mays* L. Planta **164**, 126-128.
- Moreno-Risueño, M.A., González, N., Díaz, I., Parcy, F., Carbonero, P., and Vicente-Carbajosa, J.** (2008). FUSCA3 from barley unveils a common transcriptional regulation of seed-specific genes between cereals and *Arabidopsis*. Plant J **53**, 882-894.
- Mosher, S., Moeder, W., Nishimura, N., Jikumaru, Y., Joo, S.H., Urquhart, W., Klessig, D.F., Kim, S.K., Nambara, E., and Yoshioka, K.** (2010). The lesion-mimic mutant *cpr22* shows alterations in abscisic acid signaling and abscisic acid insensitivity in a salicylic acid-dependent manner. Plant Physiology **152**, 1901-1913.
- Mosolov, V.V., Fedurkina, N.V., Valueva, T.A., and Sokolova, E.V.** (1976). An alcohol-soluble trypsin inhibitor from beans. Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiya **12**, 37-44.
- Müller, A.H., and Hansson, M.** (2009). The barley magnesium chelatase 150-kd subunit is not an abscisic acid receptor. Plant Physiology **150**, 157-166.
- Munemasa, S., Oda, K., Watanabe-Sugimoto, M., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., and Murata, Y.** (2007). The *coronatine-insensitive 1* mutation reveals the hormonal signaling interaction between abscisic acid and methyl jasmonate in *Arabidopsis* guard cells. Specific impairment of ion channel activation and second messenger production. Plant Physiology **143**, 1398-1407.
- Murashige, T.a.S., F.** (1962). Arevised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant **15**, 437-497.
- Nakamura, S., and Toyama, T.** (2001). Isolation of a VP1 homologue from wheat and analysis of its expression in embryos of dormant and non-dormant cultivars. Journal of Experimental Botany **52**, 875-876.

- Nakamura, S., Lynch, T.J., and Finkelstein, R.R. (2001). Physical interactions between ABA response loci of Arabidopsis. Plant J **26**, 627-635.
- Nakashima, K., Tran, L.S., Van Nguyen, D., Fujita, M., Maruyama, K., Todaka, D., Ito, Y., Hayashi, N., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. Plant J **51**, 617-630.
- Nakashima, K., Fujita, Y., Kanamori, N., Katagiri, T., Umezawa, T., Kidokoro, S., Maruyama, K., Yoshida, T., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). Three Arabidopsis SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy. Plant & Cell Physiology **50**, 1345-1363.
- Nambara, E., Akazawa, T., and McCourt, P. (1991). Effects of the gibberellin biosynthetic inhibitor uniconazol on mutants of Arabidopsis. Plant Physiology **97**, 736-738.
- Nambara, E., Naito, S., and McCourt, P. (1992). A mutant of Arabidopsis which is defective in seed development and storage protein accumulation is a new *abi3* allele. Plant Journal **2**, 435-441.
- Nambara, E., Keith, K., McCourt, P., and Naito, S. (1994). Isolation of an internal deletion mutant of the *Arabidopsis thaliana* *ABI3* gene. Plant & Cell Physiology **35**, 509-513.
- Nambara, E., Suzuki, M., Abrams, S., McCarty, D.R., Kamiya, Y., and McCourt, P. (2002). A screen for genes that function in abscisic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. Genetics **161**, 1247-1255.
- Nambara, E., and Marion-Poll, A. (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. Annu Rev Plant Biol **56**, 165-185.
- Neill, S.J., Horgan, R. and Parry, A.D. . (1986). The carotenoid and abscisic acid content of viviparous kernels and seedlings of *Zea mays* L. Planta **169**, 87-96.
- Neill, S., Barros, R., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., Morris, P., Ribeiro, D., and Wilson, I. (2008). Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. Journal of Experimental Botany **59**, 165-176.
- Nemhauser, J.L., Hong, F., and Chory, J. (2006). Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. Cell **126**, 467-475.
- Nishimura, N., Okamoto, M., Narusaka, M., Yasuda, M., Nakashita, H., Shinozaki, K., Narusaka, Y., and Hirayama, T. (2009). ABA hypersensitive germination2-1 causes the activation of both abscisic acid and salicylic acid responses in Arabidopsis. Plant & Cell Physiology **50**, 2112-2122.
- Nishimura, N., Sarkeshik, A., Nito, K., Park, S.Y., Wang, A., Carvalho, P.C., Lee, S., Caddell, D.F., Cutler, S.R., Chory, J., Yates, J.R., and Schroeder, J.I. (2010). PYR/PYL/RCAR family members are major in-vivo ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in Arabidopsis. Plant J **61**, 290-299.

- Niyogi, K.K., Grossman, A.R., and Bjorkman, O.** (1998). Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. The Plant Cell **10**, 1121-1134.
- Normanly, J., and Bartel, B.** (1999). Redundancy as a way of life - IAA metabolism. Current Opinion in Plant Biology **2**, 207-213.
- Novikova, G.V., Stepanchenko, N.S., A.V., N., and Moshkov, I.E.** (2009). At the beginning of the route: ABA perception and signal transduction in plants. Russian Journal of Plant Physiology **56**, 727-741.
- Nylander, M., Svensson, J., Palva, E.T., and Welin, B.V.** (2001). Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology **45**, 263-279.
- Ogo, Y., Kobayashi, T., Nakanishi Itai, R., Nakanishi, H., Kakei, Y., Takahashi, M., Toki, S., Mori, S., and Nishizawa, N.K.** (2008). A novel NAC transcription factor, IDEF2, that recognizes the iron deficiency-responsive element 2 regulates the genes involved in iron homeostasis in plants. The Journal of Biological Chemistry **283**, 13407-13417.
- Okada, K., Ueda, J., Komaki, M.K., Bell, C.J., and Shimura, Y.** (1991). Requirement of the auxin polar transport system in early stages of Arabidopsis floral bud formation. The Plant cell **3**, 677-684.
- Okamoto, M., Kuwahara, A., Seo, M., Kushiro, T., Asami, T., Hirai, N., Kamiya, Y., Koshiba, T., and Nambara, E.** (2006). CYP707A1 and CYP707A2, which encode abscisic acid 8'-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in Arabidopsis. Plant Physiology **141**, 97-107.
- Olsen, A.N., Ernst, H.A., Leggio, L.L., and Skriver, K.** (2005). NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. Trends in Plant Science **10**, 79-87.
- Oñate-Sánchez, L., and Vicente-Carbajosa, J.** (2008). DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques. BMC Research Notes **1**, 93.
- Ooka, H., Satoh, K., Doi, K., Nagata, T., Otomo, Y., Murakami, K., Matsubara, K., Osato, N., Kawai, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Suzuki, K., Kojima, K., Takahara, Y., Yamamoto, K., and Kikuchi, S.** (2003). Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. DNA Res **10**, 239-247.
- Orr, W., Singh, J., and Brown, D.C.W.** (1985). Induction of freezing tolerance in alfalfa cell suspension cultures. Plant Cell Reports **4**, 15-18.
- Palva, E.T.** (1994). Gene expression under low temperature stress. Harwood Academic, 103-130.
- Pandey, S., Nelson, D.C., and Assmann, S.M.** (2009). Two novel GPCR-type G proteins are abscisic acid receptors in Arabidopsis. Cell **136**, 136-148.
- Papp, I., Mur, L.A., Dalmadi, A., Dulai, S., and Koncz, C.** (2004). A mutation in the *Cap Binding Protein 20* gene confers drought tolerance to Arabidopsis. Plant Molecular Biology **55**, 679-686.

- Parchmann, S., Gundlach, H., and Mueller, M.J. (1997). Induction of 12-OXO-PHYTODIENOIC ACID in wounded plants and elicited plant cell cultures. *Plant Physiology* **115**, 1057-1064.
- Parcy, F., Valon, C., Kohara, A., Misera, S., and Giraudat, J. (1997). The *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE3*, *FUSCA3*, and *LEAFY COTYLEDON1* loci act in concert to control multiple aspects of Arabidopsis seed development. *The Plant Cell* **9**, 1265-1277.
- Park, S.Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D.R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T.F., Alfred, S.E., Bonetta, D., Finkelstein, R., Provart, N.J., Desveaux, D., Rodríguez, P.L., McCourt, P., Zhu, J.K., Schroeder, J.I., Volkman, B.F., and Cutler, S.R. (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* **324**, 1068-1071.
- Parker, R.E. (1989). Utilización de la chi-cuadrado. *Estadística para biólogos*. Ediciones Omega, Barcelona, 41-59.
- Pauwels, L., Barbero, G.F., Geerinck, J., Tilleman, S., Grunewald, W., Pérez, A.C., Chico, J.M., Bossche, R.V., Sewell, J., Gil, E., García-Casado, G., Witters, E., Inze, D., Long, J.A., De Jaeger, G., Solano, R., and Goossens, A. (2010). NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature* **464**, 788-791.
- Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G.J., Grill, E., and Schroeder, J.I. (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406**, 731-734.
- Penfield, S., Li, Y., Gilday, A.D., Graham, S., and Graham, I.A. (2006). Arabidopsis *ABA INSENSITIVE4* regulates lipid mobilization in the embryo and reveals repression of seed germination by the endosperm. *The Plant Cell* **18**, 1887-1899.
- Peng, H., Cheng, H.Y., Chen, C., Yu, X.W., Yang, J.N., Gao, W.R., Shi, Q.H., Zhang, H., Li, J.G., and Ma, H. (2009). A NAC transcription factor gene of Chickpea (*Cicer arietinum*), CarNAC3, is involved in drought stress response and various developmental processes. *Journal of Plant Physiology* **166**, 1934-1945.
- Penninckx, I.A., Eggermont, K., Terras, F.R., Thomma, B.P., De Samblanx, G.W., Buchala, A., Metraux, J.P., Manners, J.M., and Broekaert, W.F. (1996). Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in Arabidopsis follows a salicylic acid-independent pathway. *The Plant Cell* **8**, 2309-2323.
- Penninckx, I.A., Thomma, B.P., Buchala, A., Metraux, J.P., and Broekaert, W.F. (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant *DEFENSIN* gene in Arabidopsis. *The Plant Cell* **10**, 2103-2113.
- Peña-Cortés, H., Fisahn, J., and Willmitzer, L. (1995). Signals involved in wound-induced *proteinase inhibitor II* gene expression in tomato and potato plants. *Proc Natl Acad Sci* **92**, 4106-4113.
- Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H.B., Lacy, M., Austin, M.J., Parker, J.E., Sharma, S.B., Klessig, D.F., Martienssen, R., Mattsson, O., Jensen, A.B., and Mundy, J. (2000). Arabidopsis map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**, 1111-1120.

- Pieterse, C.M., van Wees, S.C., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J., and van Loon, L.C. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell* **10**, 1571-1580.
- Pieterse, C.M., and van Loon, L.C. (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Science* **4**, 52-58.
- Pieterse, C.M., and Dicke, M. (2007). Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology. *Trends in Plant Science* **12**, 564-569.
- Pilet, P.E., and Saugy, M. (1987). Effect on root growth of endogenous and applied IAA and ABA: a critical reexamination. *Plant Physiology* **83**, 33-38.
- Pirrello, J., Jaimes-Miranda, F., Sánchez-Ballesta, M.T., Tournier, B., Khalil-Ahmad, Q., Regad, F., Latche, A., Pech, J.C., and Bouzayen, M. (2006). Sl-ERF2, a tomato ethylene response factor involved in ethylene response and seed germination. *Plant & Cell Physiology* **47**, 1195-1205.
- Piskurewicz, U., Jikumaru, Y., Kinoshita, N., Nambara, E., Kamiya, Y., and López-Molina, L. (2008). The gibberellic acid signaling repressor RGL2 inhibits Arabidopsis seed germination by stimulating abscisic acid synthesis and ABI5 activity. *The Plant Cell* **20**, 2729-2745.
- Plaats-Niterink, A.J. (1981). Monograph of the genus *Pythium*. *Stud. Micol.* **21**, 1-242.
- Preston, J., Tatematsu, K., Kanno, Y., Hobo, T., Kimura, M., Jikumaru, Y., Yano, R., Kamiya, Y., and Nambara, E. (2009). Temporal expression patterns of hormone metabolism genes during imbibition of Arabidopsis thaliana seeds: a comparative study on dormant and non-dormant accessions. *Plant & Cell Physiology* **50**, 1786-1800.
- Probert, R. (2000). The role of temperature in the regulation of seed dormancy and germination. *Seeds: the ecology of regeneration in plants communities*. CAB International, Wallingford, UK., 261-292.
- Quesada, V., Ponce, M.R., and Micol, J.L. (2000). Genetic analysis of salt-tolerant mutants in Arabidopsis thaliana. *Genetics* **154**, 421-436.
- Raghavendra, A.S., Gonugunta, V.K., Christmann, A., and Grill, E. (2010). ABA perception and signalling. *Trends in Plant Science* **15**, 395-401.
- Rao, M.V., Lee, H., Creelman, R.A., Mullet, J.E., and Davis, K.R. (2000). Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *The Plant Cell* **12**, 1633-1646.
- Razem, F.A., El-Kereamy, A., Abrams, S.R., and Hill, R.D. (2006). The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature* **439**, 290-294.
- Reinbothe, S., Reinbothe, C., and Parthier, B. (1993). Methyl jasmonate-regulated translation of nuclear-encoded chloroplast proteins in barley (*Hordeum vulgare* L. cv. salome). *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 10606-10611.
- Reiner, A., Yekutieli, D., and Benjamini, Y. (2003). Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. *Bioinformatics* **19**, 368-375.

- Ren, T., Qu, F., and Morris, T.J.** (2000). HRT gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to turnip crinkle virus. *The Plant Cell* **12**, 1917-1926.
- Reyes, D., Rodríguez, D., González-García, M.P., Lorenzo, O., Nicolás, G., García-Martínez, J.L., and Nicolás, C.** (2006). Overexpression of a protein phosphatase 2C from beech seeds in Arabidopsis shows phenotypes related to abscisic acid responses and gibberellin biosynthesis. *Plant Physiology* **141**, 1414-1424.
- Reymond, P., Weber, H., Damond, M., and Farmer, E.E.** (2000). Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in Arabidopsis. *The Plant Cell* **12**, 707-720.
- Reymond, P., Bodenhausen, N., Van Poecke, R.M., Krishnamurthy, V., Dicke, M., and Farmer, E.E.** (2004). A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. *The Plant Cell* **16**, 3132-3147.
- Ribeiro, D.M., Desikan, R., Bright, J., Confraria, A., Harrison, J., Hancock, J.T., Barros, R.S., Neill, S.J., and Wilson, I.D.** (2009). Differential requirement for NO during ABA-induced stomatal closure in turgid and wilted leaves. *Plant, Cell & Environment* **32**, 46-57.
- Ribot, C., Zimmerli, C., Farmer, E.E., Reymond, P., and Poirier, Y.** (2008). Induction of the Arabidopsis PHO1/H10 gene by 12-oxo-phytodienoic acid but not jasmonic acid via a CORONATINE INSENSITIVE1-dependent pathway. *Plant Physiology* **147**, 696-706.
- Risk, J.M., Macknight, R.C., and Day, C.L.** (2008). FCA does not bind abscisic acid. *Nature* **456**, E5-6.
- Rivin, C.J., and Grudt, T.** (1991). Abscisic acid and the developmental regulation of embryo storage proteins in maize. *Plant Physiology* **95**, 358-365.
- Robert, N., Merlot, S., N'Guyen, V., Boisson-Dernier, A., and Schroeder, J.I.** (2006). A hypermorphic mutation in the protein phosphatase 2C HAB1 strongly affects ABA signaling in Arabidopsis. *FEBS Letters* **580**, 4691-4696.
- Robertson, D.S.** (1955). The genetics of vivipary in maize. *Genetics* **40**, 745-760.
- Rock, C., and Quatrano, R.S.** (1995). The role of hormones during seed development. *Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*. (Davies P.J. ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 671-697.
- Rock, C.D., and Ng, P.P.** (1999). Dominant wilty mutants of Zea mays (Poaceae) are not impaired in abscisic acid perception or metabolism. *Am J Bot* **86**, 1796-1800.
- Rodríguez, P.L., Benning, G., and Grill, E.** (1998). ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *FEBS Letters* **421**, 185-190.

- Rodríguez, D., Nicolás, G., Aldasoro, J.J., Hernández-Nistal, J., Babiano, M.J. y Matilla, A. (1985). Altered development of polysomal RNA activity in chick-pea (*Cicer arietinum*) embryonic axes. Effect of abscisic acid and temperature. *Planta* **164**, 517-523.
- Rodríguez-Navarro, A. (2000). Potassium transport in fungi and plants. *Biochimica et biophysica acta* **1469**, 1-30.
- Rohde, A., De Rycke, R., Beeckman, T., Engler, G., Van Montagu, M., and Boerjan, W. (2000). ABI3 affects plastid differentiation in dark-grown Arabidopsis seedlings. *The Plant Cell* **12**, 35-52.
- Rohde, A., Prinsen, E., De Rycke, R., Engler, G., Van Montagu, M., and Boerjan, W. (2002). PtABI3 impinges on the growth and differentiation of embryonic leaves during bud set in poplar. *The Plant Cell* **14**, 1885-1901.
- Rojo, E., León, J., and Sánchez-Serrano, J.J. (1999). Cross-talk between wound signalling pathways determines local versus systemic gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **20**, 135-142.
- Rojo, E., Zouhar, J., Carter, C., Kovaleva, V., and Raikhel, N.V. (2003). A unique mechanism for protein processing and degradation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci* **100**, 7389-7394.
- Rook, F., Corke, F., Card, R., Munz, G., Smith, C., and Bevan, M.W. (2001). Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. *Plant J* **26**, 421-433.
- Rouhier, N., and Jacquot, J.P. (2005). The plant multigenic family of thiol peroxidases. *Free Radical Biology & Medicine* **38**, 1413-1421.
- Rousselin, P., Kraepiel, Y., Maldiney, R., Miginiac, E. and Calboche, M. (1992). Characterization of three hormone mutants of *Nicotiana plumbaginifolia*, evidence for a common ABA deficiency. *Theor. Appl. Genet.* **85**, 213-221.
- Russell, L., Lerner, V., Kurup, S., Bougourd, S., and Holdsworth, M. (2000). The *Arabidopsis* COMATOSE locus regulates germination potential. *Development* **127**, 3759-3767.
- Saavedra, X., Modrego, A., Rodríguez, D., González-García, M.P., Sanz, L., Nicolás, G., and Lorenzo, O. (2010). The nuclear interactor PYL8/RCAR3 of *Fagus sylvatica* FsPP2C1 is a positive regulator of abscisic acid signaling in seeds and stress. *Plant Physiology* **152**, 133-150.
- Saeed, A.I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., Sturn, A., Snuffin, M., Rezantsev, A., Popov, D., Ryltsov, A., Kostukovich, E., Borisovsky, I., Liu, Z., Vinsavich, A., Trush, V., and Quackenbush, J. (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques* **34**, 374-378.

- Sáez, A., Apostolova, N., González-Guzman, M., González-García, M.P., Nicolás, C., Lorenzo, O., and Rodríguez, P.L. (2004). Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling. *Plant J* **37**, 354-369.
- Sáez, A., Robert, N., Maktabi, M.H., Schroeder, J.I., Serrano, R., and Rodríguez, P.L. (2006). Enhancement of abscisic acid sensitivity and reduction of water consumption in Arabidopsis by combined inactivation of the protein phosphatases type 2C ABI1 and HAB1. *Plant Physiology* **141**, 1389-1399.
- Sáez, A., Rodrigues, A., Santiago, J., Rubio, S., and Rodríguez, P.L. (2008). HAB1-SWI3B interaction reveals a link between abscisic acid signaling and putative SWI/SNF chromatin-remodeling complexes in Arabidopsis. *The Plant Cell* **20**, 2972-2988.
- Sakata, Y., Komatsu, K., Taji, T., and Tanaka, S. (2009). Role of PP2C-mediated ABA signaling in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Signaling & Behavior* **4**, 887-889.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning, a laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanders, P.M., Lee, P.Y., Biesgen, C., Boone, J.D., Beals, T.P., Weiler, E.W., and Goldberg, R.B. (2000). The Arabidopsis *DELAYED DEHISCENCE1* gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *The Plant Cell* **12**, 1041-1061.
- Santiago, J., Dupeux, F., Round, A., Antoni, R., Park, S.Y., Jamin, M., Cutler, S.R., Rodríguez, P.L., and Márquez, J.A. (2009). The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. *Nature* **462**, 665-668.
- Sasaki, Y., Asamizu, E., Shibata, D., Nakamura, Y., Kaneko, T., Awai, K., Amagai, M., Kuwata, C., Tsugane, T., Masuda, T., Shimada, H., Takamiya, K., Ohta, H., and Tabata, S. (2001). Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in Arabidopsis by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. *DNA Res* **8**, 153-161.
- Satler, S.O., and Kende, H. (1985). Ethylene and the growth of rice seedlings. *Plant Physiology* **79**, 194-198.
- Schaller, F., and Weiler, E.W. (1997). Enzymes of octadecanoid biosynthesis in plants 12-oxo-phytodienoate 10,11-reductase. *European Journal of Biochemistry / FEBS* **245**, 294-299.
- Schiavone, F.M., and Cooke, T.J. (1987). Unusual patterns of somatic embryogenesis in the domesticated carrot: developmental effects of exogenous auxins and auxin transport inhibitors. *Cell Differentiation* **21**, 53-62.
- Schwartz, B.W., E.C., Y., and D.W., M. (1994). Disruption of morphogenesis and transformation of the suspensor in abnormal suspensor mutants of Arabidopsis. *Development* **120**, 3235-3245.
- Schwartz, S.H., Tan, B.C., Gage, D.A., Zeevaart, J.A., and McCarty, D.R. (1997). Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* **276**, 1872-1874.

- Schwartz, S.H., Qin, X., and Loewen, M.C.** (2004). The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from *Arabidopsis* indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 46940-46945.
- Schweighofer, A., Hirt, H., and Meskiene, I.** (2004). Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends in Plant Science* **9**, 236-243.
- Schweighofer, A., and Meskiene, I.** (2008). Regulation of stress hormones jasmonates and ethylene by MAPK pathways in plants. *Molecular bioSystems* **4**, 799-803.
- Seo, M., Peeters, A.J., Koiwai, H., Oritani, T., Marion-Poll, A., Zeevaert, J.A., Koornneef, M., Kamiya, Y., and Koshiba, T.** (2000). The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (*AAO3*) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proc Natl Acad Sci* **97**, 12908-12913.
- Seo, H.S., Song, J.T., Cheong, J.J., Lee, Y.H., Lee, Y.W., Hwang, I., Lee, J.S., and Choi, Y.D.** (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc Natl Acad Sci* **98**, 4788-4793.
- Seo, M., Nambara, E., Choi, G., and Yamaguchi, S.** (2009). Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. *Plant Molecular Biology* **69**, 463-472.
- Serrano, R., Mulet, J., Ríos, G., Márquez, J., de Larrinoa, I., Leube, M., Mendizábal, I., Pascual-Ahuir, A., Proft, M., Ros, R., and Montesinos, C.** (1999). A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *Journal of Experimental Botany* **50**, 1023-1036.
- Sheen, J.** (1998). Mutational analysis of protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in higher plants. *Proc Natl Acad Sci* **95**, 975-980.
- Shen, Y.Y., Zhang, D.P., Chen, S.W., and Peng, Y.B.** (2001). Abscisic acid-specific binding sites in the flesh of developing apple fruit *Journal of Experimental Botany* **52**, 2097-2103.
- Shen, Y.Y., Wang, X.F., Wu, F.Q., Du, S.Y., Cao, Z., Shang, Y., Wang, X.L., Peng, C.C., Yu, X.C., Zhu, S.Y., Fan, R.C., Xu, Y.H., and Zhang, D.P.** (2006). The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* **443**, 823-826.
- Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 217-223.
- Smyth, G.K.** (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* **3**, Article 3.
- Soderman, E.M., Brocard, I.M., Lynch, T.J., and Finkelstein, R.R.** (2000). Regulation and function of the *Arabidopsis* *ABA-insensitive4* gene in seed and abscisic acid response signaling networks. *Plant Physiology* **124**, 1752-1765.
- Sondheimer, E., Galson, E.C., Chang, Y.P., and Walton, D.C.** (1971). Asymmetry, its importance to the action and metabolism of abscisic acid. *Science* **174**, 829-831.

- Souer, E., van Houwelingen, A., Kloos, D., Mol, J., and Koes, R. (1996). The *NO APICAL MERISTEM* gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell* **85**, 159-170.
- Staswick, P.E. (1990). Novel regulation of vegetative storage protein genes. *The Plant Cell* **2**, 1-6.
- Staswick, P.E., Su, W., and Howell, S.H. (1992). Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc Natl Acad Sci* **89**, 6837-6840.
- Staswick, P.E., Tiryaki, I., and Rowe, M.L. (2002). Jasmonate response locus *JAR1* and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *The Plant Cell* **14**, 1405-1415.
- Staswick, P.E. (2009). The tryptophan conjugates of jasmonic and indole-3-acetic acids are endogenous auxin inhibitors. *Plant Physiology* **150**, 1310-1321.
- Steber, C.M., Cooney, S.E., and McCourt, P. (1998). Isolation of the GA-response mutant *sly1* as a suppressor of *abi1-1* in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **149**, 509-521.
- Steber, C.M., and McCourt, P. (2001). A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **125**, 763-769.
- Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O., Kurz, T., Maucher, H., Weichert, H., Ziegler, J., Feussner, I., and Wasternack, C. (2003). Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **51**, 895-911.
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J., and Farmer, E.E. (2001). Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. *Proc Natl Acad Sci* **98**, 12837-12842.
- Strizhov, N., Abraham, E., Okresz, L., Blickling, S., Zilberstein, A., Schell, J., Koncz, C., and Szabados, L. (1997). Differential expression of two *P5CS* genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis*. *Plant J* **12**, 557-569.
- Suza, W.P., and Staswick, P.E. (2008). The role of *JAR1* in Jasmonoyl-L: -isoleucine production during *Arabidopsis* wound response. *Planta* **227**, 1221-1232.
- Suzuki, M., and McCarty, D.R. (2008). Functional symmetry of the B3 network controlling seed development. *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 548-553.
- Szostkiewicz, I., Richter, K., Kepka, M., Demmel, S., Ma, Y., Korte, A., Assaad, F.F., Christmann, A., and Grill, E. (2009). Closely related receptor complexes differ in their ABA selectivity and sensitivity. *Plant J* **61**, 25-35.
- Tahtiharju, S., and Palva, T. (2001). Antisense inhibition of protein phosphatase 2C accelerates cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **26**, 461-470.
- Taiz, L.y.Z., E. (2006). Plant Physiology. Sinauer Associates, Sunderland 4<sup>a</sup> Ed.

- Takasaki, H., Maruyama, K., Kidokoro, S., Ito, Y., Fujita, Y., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Nakashima, K.** (2010). The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. *Mol Genet Genomics* **284**, 173-183.
- Tal, M., and Nevo, Y.** (1973). Abnormal stomatal behavior and root resistance, and hormonal imbalance in three wilted mutants of tomato. *Biochemical Genetics* **8**, 291-300.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S.** (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 1596-1599.
- Tan, B.C., Schwartz, S.H., Zeevaart, J.A., and McCarty, D.R.** (1997). Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proc Natl Acad Sci* **94**, 12235-12240.
- Taylor, I., Linforth, R., AL-Naieb, R., Bowman, W. and Marples, B.** (1988). The wilted tomato mutants *flacca* and *sitiens* are impaired in the oxidation of ABA-aldehyde to ABA. *Plant Cell Environ.* **11**, 739-745.
- Theodoulou, F.L., Job, K., Slocombe, S.P., Footitt, S., Holdsworth, M., Baker, A., Larson, T.R., and Graham, I.A.** (2005). Jasmonic acid levels are reduced in COMATOSE ATP-binding cassette transporter mutants. Implications for transport of jasmonate precursors into peroxisomes. *Plant Physiology* **137**, 835-840.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A., and Browse, J.** (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**, 661-665.
- Thomashow, M.F.** (1999). Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**, 571-599.
- Thomma, B.P., Eggermont, K., Tierens, K.F., and Broekaert, W.F.** (1999). Requirement of functional *ETHYLENE-INSENSITIVE 2* gene for efficient resistance of Arabidopsis to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* **121**, 1093-1102.
- Tiryaki, I., and Staswick, P.E.** (2002). An Arabidopsis mutant defective in jasmonate response is allelic to the auxin-signaling mutant *axr1*. *Plant Physiology* **130**, 887-894.
- Titarenko, E., Rojo, E., León, J., and Sánchez-Serrano, J.J.** (1997). Jasmonic acid-dependent and -independent signaling pathways control wound-induced gene activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **115**, 817-826.
- To, A., Valon, C., Savino, G., Guillemot, J., Devic, M., Giraudat, J., and Parcy, F.** (2006). A network of local and redundant gene regulation governs Arabidopsis seed maturation. *The Plant Cell* **18**, 1642-1651.
- Ton, J., and Mauch-Mani, B.** (2004). Beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant J* **38**, 119-130.
- Ton, J., Flors, V., and Mauch-Mani, B.** (2009). The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends in Plant Science* **14**, 310-317.

- Topping, J.F., May, V.J., Muskett, P.R., and Lindsey, K.** (1997). Mutations in the *HYDRA1* gene of *Arabidopsis* perturb cell shape and disrupt embryonic and seedling morphogenesis. *Development*. **124**, 4415-4424.
- Torres-Ruiz, R.A., and Jurgens, G.** (1994). Mutations in the *FASS* gene uncouple pattern formation and morphogenesis in *Arabidopsis* development. *Development*. **120**, 2967-2978.
- Torres-Ruiz, R.A., Lohner, A., and Jurgens, G.** (1996). The *GURKE* gene is required for normal organization of the apical region in the *Arabidopsis* embryo. *Plant J* **10**, 1005-1016.
- Tran, L.S., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S.D., Fujita, Y., Maruyama, K., Fujita, M., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2004). Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to *DEHYDRATION STRESS 1* promoter. *The Plant Cell* **16**, 2481-2498.
- Traw, M.B., and Bergelson, J.** (2003). Interactive effects of jasmonic acid, salicylic acid, and gibberellin on induction of trichomes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **133**, 1367-1375.
- Treml, B.S., Winderl, S., Radykewicz, R., Herz, M., Schweizer, G., Hutzler, P., Glawischmig, E., and Ruiz, R.A.** (2005). The gene *ENHANCER OF PINOID* controls cotyledon development in the *Arabidopsis* embryo. *Development* **132**, 4063-4074.
- Trewavas, A.J.** (1988). Timing and memory processes in seed embryo dormancy. A conceptual paradigm for plant development questions. *Bioessays* **6**, 87-92.
- Turner, J.G., Ellis, C., and Devoto, A.** (2002). The jasmonate signal pathway. *The Plant Cell* **14 Suppl**, S153-164.
- Ueno, K., Yoneyama, H., Mizutani, M., Hirai, N., and Todoroki, Y.** (2007). Asymmetrical ligand binding by abscisic acid 8'-hydroxylase. *Bioorganic & medicinal Chemistry* **15**, 6311-6322.
- Ullah, H., Chen, J.G., Young, J.C., Im, K.H., Sussman, M.R., and Jones, A.M.** (2001). Modulation of cell proliferation by heterotrimeric G protein in *Arabidopsis*. *Science*. **292**, 2066-2069.
- Umezawa, T., Okamoto, M., Kushiro, T., Nambara, E., Oono, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Koshihara, T., Kamiya, Y., and Shinozaki, K.** (2006). *CYP707A3*, a major ABA 8'-hydroxylase involved in dehydration and rehydration response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **46**, 171-182.
- Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ishihama, Y., Hirayama, T., and Shinozaki, K.** (2009). Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 17588-17593.
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2000). *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci*. **97**, 11632-11637.

- Valueva, T.A., and Mosolov, V.V.** (2004). Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry* **69**, 1305-1309.
- Vernon, D.M., and Meinke, D.W.** (1994). Embryogenic transformation of the suspensor in *twin*, a polyembryonic mutant of *Arabidopsis*. *Developmental Biology* **165**, 566-573.
- Vignutelli, A., Wasternack, C., Apel, K., and Bohlmann, H.** (1998). Systemic and local induction of an *Arabidopsis* *THIONIN* gene by wounding and pathogens. *Plant J* **14**, 285-295.
- Vijayan, P., Shockey, J., Levesque, C.A., Cook, R.J., and Browse, J.** (1998). A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci* **95**, 7209-7214.
- Vroemen, C.W., Mordhorst, A.P., Albrecht, C., Kwaaitaal, M.A., and de Vries, S.C.** (2003). The *CUP-SHAPED COTYLEDON3* gene is required for boundary and shoot meristem formation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **15**, 1563-1577.
- Walker-Simmons, M.K., Anderberg, R.J., Rose, P.A., and Abrams, S.R.** (1992). Optically pure abscisic acid analogs-tools for relating germination inhibition and gene expression in wheat embryos. *Plant Physiology* **99**, 501-507.
- Walker-Simmons, M.K., Rose, P.A., Shaw, A.C., and Abrams, S.R.** (1994). The 7[prime]-methyl group of abscisic acid is critical for biological activity in wheat embryo germination. *Plant Physiology* **106**, 1279-1284.
- Wang, M., Heimovaara-Dijkstra, S., and Dujin, B.V.** (1995). Modulation of germination of embryos isolated from dormant and nondormant barley grains by manipulation of endogenous abscisic acid. *Planta* **195**, 586-592.
- Wang, H., Qi, Q., Schorr, P., Cutler, A.J., Crosby, W.L., and Fowke, L.C.** (1998). ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J* **15**, 501-510.
- Wang, X.Q., Ullah, H., Jones, A.M., and Assmann, S.M.** (2001). G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Science* **292**, 2070-2072.
- Wang, Y., Liu, C., Li, K., Sun, F., Hu, H., Li, X., Zhao, Y., Han, C., Zhang, W., Duan, Y., Liu, M., and Li, X.** (2007). *Arabidopsis* EIN2 modulates stress response through abscisic acid response pathway. *Plant Molecular Biology* **64**, 633-644.
- Wasternack, C., and Hause, B.** (2002). Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. *Progress in Nucleic acid Research and Molecular Biology* **72**, 165-221.
- Wasternack, C., Stenzel, I., Hause, B., Hause, G., Kutter, C., Maucher, H., Neumerkel, J., Feussner, I., and Miersch, O.** (2006). The wound response in tomato role of jasmonic acid. *Journal of Plant Physiology* **163**, 297-306.
- Wasternack, C.** (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of botany* **100**, 681-697.

- Weber, H., Vick, B.A., and Farmer, E.E. (1997). Dinor-oxo-phytodienoic acid: a new hexadecanoid signal in the jasmonate family. Proc Natl Acad Sci. **94**, 10473-10478.
- Weijers, D., and Jurgens, G. (2005). Auxin and embryo axis formation: the ends in sight? Current Opinion in Plant Biology **8**, 32-37.
- Weiler, E.W., Kutchan, T.M., Gorba, T., Brodschelm, W., Niesel, U., and Bublitz, F. (1994). The Pseudomonas phytotoxin coronatine mimics octadecanoid signalling molecules of higher plants. FEBS Letters **345**, 9-13.
- Weising, K., and Kahl, G. (1991). Toward an understanding of plant gene regulation: the action of nuclear factors. Zeitschrift fur Naturforschung **46**, 1-11.
- Werner, J., and Finkelstein, R. (1995). Arabidopsis mutants with reduced response to NaCl and osmotic stress. Physiol Plant **93**, 659-666.
- Wettenhall, J.M., Simpson, K.M., Satterley, K., and Smyth, G.K. (2006). affyilmGUI: a graphical user interface for linear modeling of single channel microarray data. Bioinformatics **22**, 897-899.
- White, J.A., Todd, J., Newman, T., Focks, N., Girke, T., de Ilarduya, O.M., Jaworski, J.G., Ohlrogge, J.B., and Benning, C. (2000). A new set of Arabidopsis expressed sequence tags from developing seeds. The metabolic pathway from carbohydrates to seed oil. Plant Physiology **124**, 1582-1594.
- Wiermer, M., Feys, B.J., and Parker, J.E. (2005). Plant immunity: the EDS1 regulatory node. Current Opinion in Plant Biology **8**, 383-389.
- Wilens, R.W., van Rooijen, G.J., Pearce, D.W., Pharis, R.P., Holbrook, L.A., and Moloney, M.M. (1991). Effects of jasmonic acid on embryo-specific processes in Brassica and Linum oilseeds. Plant Physiology **95**, 399-405.
- Wilens, R.W., Hays, D.B., Mandel, R.M., Abrams, S.R., and Moloney, M.M. (1993). Competitive inhibition of abscisic acid-regulated gene expression by stereoisomeric acetylenic analogs of abscisic acid. Plant Physiology **101**, 469-476.
- Willemsen, V., Wolkenfelt, H., de Vrieze, G., Weisbeek, P., and Scheres, B. (1998). The HOBbit gene is required for formation of the root meristem in the Arabidopsis embryo. Development **125**, 521-531.
- Windsor, M.L., and Zeevaart, J.A. (1997). Induction of ABA 8'-hydroxylase by (+)-S-, (-)-R- and 8'-8'-8'-trifluoro-S-abscisic acid in suspension cultures of potato and Arabidopsis. Phytochemistry **45**, 931-934.
- Wu, Y., Sánchez, J.P., López-Molina, L., Himmelbach, A., Grill, E., and Chua, N.H. (2003). The *abi-1* mutation blocks ABA signaling downstream of cADPR action. Plant J **34**, 307-315.
- Xiao, S., Dai, L., Liu, F., Wang, Z., Peng, W., and Xie, D. (2004). *COS1: an Arabidopsis coronatine insensitive1* suppressor essential for regulation of jasmonate-mediated plant defense and senescence. The Plant Cell **16**, 1132-1142.

- Xie, D.X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M., and Turner, J.G. (1998). COI1: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**, 1091-1094.
- Xie, Q., Frugis, G., Colgan, D., and Chua, N.H. (2000). Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes & Development* **14**, 3024-3036.
- Xiong, L., Ishitani, M., Lee, H., and Zhu, J.K. (2001). The Arabidopsis LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *The Plant Cell* **13**, 2063-2083.
- Xiong, L., Lee, H., Ishitani, M., and Zhu, J.K. (2002). Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the LOS6/ABAI locus in Arabidopsis. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 8588-8596.
- Xu, L., Liu, F., Wang, Z., Peng, W., Huang, R., Huang, D., and Xie, D. (2001). An Arabidopsis mutant cex1 exhibits constant accumulation of jasmonate-regulated AtVSP, Thi2.1 and PDF1.2. *FEBS Letters* **494**, 161-164.
- Xu, L., Liu, F., Lechner, E., Genschik, P., Crosby, W.L., Ma, H., Peng, W., Huang, D., and Xie, D. (2002). The SCF(CO11) ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in Arabidopsis. *The Plant Cell* **14**, 1919-1935.
- Yadav, V., Mallappa, C., Gangappa, S.N., Bhatia, S., and Chattopadhyay, S. (2005). A basic helix-loop-helix transcription factor in Arabidopsis, MYC2, acts as a repressor of blue light-mediated photomorphogenic growth. *The Plant Cell* **17**, 1953-1966.
- Yadegari, R., Paiva, G., Laux, T., Koltunow, A.M., Apuya, N., Zimmerman, J.L., Fischer, R.L., Harada, J.J., and Goldberg, R.B. (1994). Cell differentiation and morphogenesis are uncoupled in Arabidopsis raspberry embryos. *The Plant Cell* **6**, 1713-1729.
- Yamagishi, K., Tatematsu, K., Yano, R., Preston, J., Kitamura, S., Takahashi, H., McCourt, P., Kamiya, Y., and Nambara, E. (2009). CHOTTO1, a double AP2 domain protein of Arabidopsis thaliana, regulates germination and seedling growth under excess supply of glucose and nitrate. *Plant & Cell Physiology* **50**, 330-340.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1993). Characterization of the expression of a desiccation-responsive RD29 gene of Arabidopsis thaliana and analysis of its promoter in transgenic plants. *Mol Gen Genet* **236**, 331-340.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1994). A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell* **6**, 251-264.
- Yamauchi, Y., Takeda-Kamiya, N., Hanada, A., Ogawa, M., Kuwahara, A., Seo, M., Kamiya, Y., and Yamaguchi, S. (2007). Contribution of gibberellin deactivation by AtGA2ox2 to the suppression of germination of dark-imbibed Arabidopsis thaliana seeds. *Plant & cell Physiology* **48**, 555-561.

- Yan, J., Zhang, C., Gu, M., Bai, Z., Zhang, W., Qi, T., Cheng, Z., Peng, W., Luo, H., Nan, F., Wang, Z., and Xie, D.** (2009). The Arabidopsis CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *The Plant Cell* **21**, 2220-2236.
- Yano, R., Kanno, Y., Jikumaru, Y., Nakabayashi, K., Kamiya, Y., and Nambara, E.** (2009). CHOTTO1, a putative double APETALA2 repeat transcription factor, is involved in abscisic acid-mediated repression of gibberellin biosynthesis during seed germination in Arabidopsis. *Plant Physiology* **151**, 641-654.
- Yeung, E.C., and Meinke, D.W.** (1993). Embryogenesis in Angiosperms: development of the suspensor. *The Plant Cell* **5**, 1371-1381.
- Yin, P., Fan, H., Hao, Q., Yuan, X., Wu, D., Pang, Y., Yan, C., Li, W., Wang, J., and Yan, N.** (2009). Structural insights into the mechanism of abscisic acid signaling by PYL proteins. *Nature Structural & Molecular Biology* **16**, 1230-1236.
- Yoo, S.Y., Kim, Y., Kim, S.Y., Lee, J.S., and Ahn, J.H.** (2007). Control of flowering time and cold response by a NAC-domain protein in Arabidopsis. *PLoS One* **2**.
- Yoshida, R., Hobo, T., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Takahashi, F., Aronso, J., Ecker, J.R., and Shinozaki, K.** (2002). ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in Arabidopsis. *Plant & Cell Physiology* **43**, 1473-1483.
- Yoshida, R., Umezawa, T., Mizoguchi, T., Takahashi, S., Takahashi, F., and Shinozaki, K.** (2006). The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in Arabidopsis. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 5310-5318.
- Young, K.H.** (1998). Yeast two-hybrid: so many interactions, (in) so little time. *Biology of Reproduction* **58**, 302-311.
- Young, T.E., and Gallie, D.R.** (2000). Regulation of programmed cell death in maize endosperm by abscisic acid. *Plant Molecular Biology* **42**, 397-414.
- Zhang, J.Z., and Somerville, C.R.** (1997). Suspensor-derived polyembryony caused by altered expression of valyl-tRNA synthetase in the *twn2* mutant of Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci* **94**, 7349-7355.
- Zhang, X., Miao, Y.C., An, G.Y., Zhou, Y., Shanguan, Z.P., Gao, J.F., and Song, C.P.** (2001). K<sup>+</sup> channels inhibited by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in Vicia guard cells. *Cell Research* **11**, 195-202.
- Zhang, S., Cai, Z., and Wang, X.** (2009). The primary signaling outputs of brassinosteroids are regulated by abscisic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci* **106**, 4543-4548.
- Zhou, R., Cutler, A.J., Ambrose, S.J., Galka, M.M., Nelson, K.M., Squires, T.M., Loewen, M.K., Jadhav, A.S., Ross, A.R., Taylor, D.C., and Abrams, S.R.** (2004). A new abscisic acid catabolic pathway. *Plant Physiology* **134**, 361-369.

