

Document downloaded from:

<http://hdl.handle.net/10251/135830>

This paper must be cited as:

González Guzmán, M. (2005). Genética molecular de la biosíntesis del ácido abscísico. Clonación y caracterización del gen ABA2 [Tesis doctoral no publicada]. Universitat Politècnica de València. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/135830>



The final publication is available at

Copyright Universitat Politècnica de València

Additional Information

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Departamento de Biotecnología



**Genética molecular de la
biosíntesis del ácido abscísico.
Clonación y caracterización del gen
ABA2.**

Memoria del trabajo de Tesis Doctoral presentada por

Miguel González Guzmán

para optar al título de

Doctor en Ciencias Biológicas

Co-directores:

Dr. Pedro L. Rodríguez y Dr. Ramón Serrano Salom

Valencia, 2005

Agradecimientos

Muchas son las personas a las que tengo que agradecer su ayuda para que esta tesis doctoral haya llegado a buen puerto.

Sin lugar a dudas, a quienes más debo son a mis directores de Tesis. A Pedro, por la confianza mostrada durante la realización de la tesis y excelente dirección. A Ramón, por estar siempre ahí cuando se le necesitaba y por los excelentes consejos. Especialmente quiero agradecer a Mariche y Ramón el apoyo y ánimos mostrado en los últimos momentos.

Muchas son las personas del IBMCP durante los años que ha durado esta tesis a las que debo agradecer su ayuda y compañerismo. A María Eugenia, Emilio, Selma, Sonia, Alberto, Esme, Noemí, Astrid, Mari Cruz, Cristina, Vincent, Pilar, Carol, Pepe (por los buenos momentos y ánimos mostrados) y muchos más de los que mi torpe memoria ahora no se acuerda.

Sin dudar, las personas a las que más agradecido estoy son a mis compañeros del laboratorio 3 (pasadas y presentes). A la gente de levadura, JM, Balta, Markus, Payo, Alain, Joserra, por enseñarme que las levaduras sirven para hacer mas cosas que para cerveza y pan. A “*los otros*” de plantas, Santiago, Edu, Frank, Cinta, Kasia, por mostrarme que siempre hay alguien más. A Roc, Rodolphe y Javier, por enseñarme que siempre hay algo más difícil que trabajar con un organismo modelo, trabajar con dos. A Beatriz, Rafa, Lola, y Mariche que cuidan de todos. A la gente del despachin, Charo, Lynne, Stephanie, Angela, Silvia, Nadezda por el día a día (con todo lo que significa de alegrías y tristezas).

Me gustaría agradecer a la Profesora Gloria Palomares su amistad y enseñanza.

Tengo que agradecer a las profesoras Maria José Martínez y Rosa de Frutos su confianza y apoyo en los primeros momentos en el departamento de Genética de la Universidad de Valencia.

Asimismo, es especialmente agradable el recuerdo de los cafés y cigarrillos en el descansillo del departamento, en el que nos juntábamos el grupo de alumnos, tesinandos y doctorandos. A todos, muchas gracias por los momentos pasados.

De todas formas, no todo es ciencia. Me gustaría agradecer a mi familia y especialmente a Maria José, su apoyo y comprensión en los momentos difíciles.

A María Jose

Indice de contenidos.....	5
Resúmenes.....	11
Abreviaturas.....	14
1. Introducción.	19
1.1. Naturaleza bioquímica del ácido abscísico (ABA).....	21
1.2. Efectos fisiológicos del ABA.....	22
Desarrollo y establecimiento de la semilla.....	23
Germinación de la semilla y establecimiento de plántula.....	23
Respuesta a estrés.....	24
Crecimiento celular.....	26
Otras funciones.....	27
1.3. Biosíntesis y catabolismo del ABA.	27
Biosíntesis de ABA.....	30
Catabolismo del ABA.....	41
Regulación de la biosíntesis y el catabolismo.....	44
1.4. Movimiento del ABA.	50
1.5. Elementos de señalización del ABA.	51
Percepción del ABA.....	53
Primeros pasos de señalización por ABA.....	53
Elementos reguladores de la señalización.....	56
Dianas transcripcionales.....	59
Comunicación cruzada con otras hormonas.....	63
1.6. Mecanismos moleculares de la señalización.	64
Desarrollo y establecimiento de la semilla.....	64
Germinación de la semilla y establecimiento de plántula.....	66
Respuesta a estrés.....	69
2. Objetivos.	75
3. Materiales.	79
3.1. Material Biológico.....	81
Arabidopsis thaliana.....	81
Escherichia coli.....	84
Agrobacterium tumefaciens.....	84

Vectores de clonación y transformación.....	84
3.2. Material no Biológico.	86
Reactivos.....	86
Oligonucleótidos.....	86
4. Métodos.....	89
4.1. Manipulación y crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i>.....	91
4.2. Búsqueda y análisis de mutantes.....	91
Rastreo de líneas de <i>A. thaliana</i> mutagenizadas con T-DNA.....	91
Análisis genético.....	92
Análisis de la presencia de T-DNA.....	92
Análisis de cosegregación.....	93
Rescate plasmídico.....	93
Cartografía del locus mutante mediante marcadores moleculares (mapeo posicional).....	94
4.3. Ensayos de germinación.....	94
4.4. Ensayos de transpiración.....	95
4.5. Determinación de ácido abscísico.....	95
En hojas de roseta.....	95
En semilla.....	96
4.6. Determinación de prolina.....	96
4.7. Manipulación y cultivo de <i>Escherichia coli</i>.....	97
Preparación de células competentes.....	97
Transformación.....	99
4.8. Manipulación y cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>.....	99
Preparación de células competentes.....	99
Transformación mediante electroporación.....	100
4.9. Transformación de <i>A. thaliana</i> mediada por <i>A. tumefaciens</i>..	100
Selección de líneas transgénicas.....	101
4.10. Técnicas de DNA recombinante.....	101
Síntesis y clonación de cDNA.....	101
4.11. Manipulación y análisis de ácidos nucleicos.....	102
Preparación de DNA plasmídico.....	102
Preparación de DNA genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i>	103

Aislamiento de RNA de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	104
Electroforesis de DNA.	105
Electroforesis de RNA.	105
Análisis “Southern blot”.	106
Análisis “Northern blot”.	107
Marcaje radioactivo de sondas.	107
4.12. Expresión, preparación y análisis de proteína recombinante.	108
Expresión y purificación.	108
Electroforesis en geles de poliacrilamida.	109
Análisis “Western blot”.	110
Ensayo enzimático.	111
5. Resultados.	113
5.1. Rastreo de las líneas de T-DNA.	115
Condiciones de búsqueda.	115
Búsqueda y aislamiento de los mutantes sre (“salt resistant”).	116
Análisis genético.	117
Análisis de la presencia de T-DNA en los mutantes sre.	119
Análisis de cosegregación.	120
Caracterización fenotípica de los mutantes sre.	123
Ensayos de complementación con mutantes deficientes en ABA.	130
5.2. Mutantes <i>sre1-1/aba2-11</i> y <i>sre1-2/aba2-12</i>.	133
Identificación de los mutantes.	134
Caracterización fenotípica.	134
Caracterización molecular.	138
ABA2 codifica una alcohol deshidrogenasa de cadena corta.	143
Caracterización bioquímica de la proteína ABA2.	145
Análisis de la expresión génica.	149
Genes con similitud de secuencia a ABA2.	152
5.3. Mutantes <i>sre2-1/aao3-2</i> y <i>sre2-2/aao3-3</i>.	156
Identificación de los mutantes.	156
Caracterización fenotípica.	157
Caracterización molecular.	161
Análisis de la expresión génica.	163

Complementación de los fenotipos mutantes.....	167
5.4. Mutante <i>sre3/aba1-101</i>.....	170
Caracterización fenotípica.....	171
Caracterización molecular.....	172
Análisis de la expresión de genes de biosíntesis de ABA.....	173
Complementación del fenotipo mutante.	174
6. Discusión.	177
6.1. Búsqueda y aislamiento de los mutantes <i>sre</i>.	179
6.2. El gen <i>SRE1/ABA2</i> codifica una alcohol deshidrogenasa de cadena corta.	183
6.3. Nuevos alelos mutantes <i>sre2/ao3</i> implican al gen <i>AAO3</i> en la biosíntesis de ABA en semilla.	186
6.4. Caracterización del nuevo alelo mutante <i>sre3/aba1-101</i>.....	189
6.5. Ruta de biosíntesis de ABA en plantas.	190
7. Conclusiones.	197
Apéndice: Marcadores moleculares.....	201
Bibliografía.....	203
Anejo: Artículos Publicados	217

Resumen

El ácido abscísico (ABA) es una fitohormona implicada en el control de procesos vegetales esenciales, principalmente el desarrollo de la semilla así como la respuesta de las plantas a diferentes estreses ambientales, particularmente frío, sequía y salinidad. En el presente trabajo se ha realizado la búsqueda en colecciones de *Arabidopsis thaliana* mutagenizadas con T-DNA de mutantes capaces de germinar en condiciones de alta sal (NaCl), identificándose tres loci mutantes, inicialmente denominados *sre1*, *sre2* y *sre3* (“*salt resistant*”). Los mutantes *sre*, además de su capacidad para germinar y establecer plántula en condiciones de estrés osmótico, mostraban una germinación resistente a paclobutrazol, latencia muy reducida, mayor transpiración y niveles de ABA en hojas de roseta significativamente menores que plantas silvestres. El análisis de complementación reveló que los mutantes *sre1* eran alélicos al mutante *aba2-1*, los mutante *sre2* eran alélicos al mutante *aao3-1* y el mutante *sre3* era alélico al mutante *aba1-5*. Así, el ABA bloquea la germinación y el establecimiento de la plántula en condiciones de bajo potencial hídrico, por lo que mutantes capaces de germinar en condiciones de estrés osmótico representan frecuentemente mutantes defectivos en la biosíntesis de ABA.

Mediante una combinación de las estrategias de mapeo posicional y gen candidato se llevó a cabo la identificación del gen ABA2 y de las mutaciones *sre1-1/aba2-11* y *sre1-2/aba2-12*. El gen ABA2 (At1g52340) codifica una alcohol deshidrogenasa de cadena corta dependiente de NAD⁺ (SDR). La mutación *sre1-1/aba2-11* es debida a una delección de 53 pb que también supone un cambio en la pauta de lectura, generando un alelo nulo de ABA2. La mutación *sre1-2/aba2-12* conduce a la sustitución Gly28Arg, afectando al sitio de unión del coenzima. Mediante un análisis HPLC-MS se ha demostrado que la proteína recombinante ABA2 cataliza la conversión de xantoxina en aldehído abscísico en una reacción dependiente de NAD⁺. Los resultados obtenidos en el presente trabajo establecen inequívocamente que la conversión de xantoxina en aldehído abscísico representa el penúltimo paso de la ruta de biosíntesis de ABA y que este es catalizado por el producto génico del gen ABA2 (At1g52340).

El último paso de la ruta de biosíntesis de ABA es la conversión de aldehído abscísico en ácido abscísico. Este paso está catalizado en *Arabidopsis* por el producto génico del gen AAO3. Los mutantes *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3*, igual que el mutante *aao3-1*, muestran una reducción en los niveles de ABA en hojas de roseta y una mayor transpiración que las plantas silvestres. Además, y contrariamente el mutante *aao3-1*, muestran un fenotipo de osmotolerancia en germinación y establecimiento de plántula, germinación resistente a paclobutrazol, latencia reducida y poseen una reducción del 65% en los niveles de ABA en semillas. La caracterización molecular de la mutación *sre2-1/aao3-2* revela una inserción de T-DNA que elimina la transcripción del gen AAO3, constituyendo por tanto un alelo nulo. La secuenciación del gen AAO3 en el mutante *sre2-2/aao3-3* revela una delección de tres nucleótidos y varias mutaciones de cambio de sentido. La evidencia genética y bioquímica resultante del análisis de los mutantes *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3* indica que lesiones en el gen AAO3 conducen a niveles reducidos de ABA y fenotipos característicos en semillas. Por consiguiente, queda demostrado que el gen AAO3 desempeña un papel crucial en la biosíntesis de ABA en semillas.

Resum

L'àcid abscísic (ABA) és una fitohormona que ha estat implicada en el control de processos vegetals essencials, principalment en el desenvolupament de la llavor així com en la resposta de les plantes a diferents estressos ambientals, particularment fred, sequera i salinitat. En el present treball de tesi doctoral s'ha fet la recerca en col·leccions d'*Arabidopsis thaliana* mutagenitzades amb T-DNA de mutants capaços de germinar en condicions d'elevada sal (NaCl), identificant-se tres *loci* mutants, inicialment denominats *sre1*, *sre2* i *sre3* ("salt resistant"). Els mutants *sre*, a més de la seva capacitat per a germinar i establir plàntula en condicions d'estrès osmòtic, mostraven una germinació resistent a paclobutrazol, latència molt reduïda, major transpiració i nivells d'ABA en fulles de roseta significativament menors que les plantes silvestres. L'anàlisi de complementació va mostrar que els mutants *sre1* eren al·lèlics al mutant *aba2-1*, els mutants *sre2* eren al·lèlics al mutant *aao3-1* i el mutant *sre3* era al·lèlic al mutant *aba1-5*. Així, l'ABA bloqueja la germinació i l'establiment de la plàntula en condicions de baix potencial hídric, i aleshores mutants capaços de germinar en condicions d'estrès osmòtic representen normalment mutants amb defectes en la biosíntesi d'ABA.

Mitjançant una combinació de les estratègies de mapeig posicional i gen candidat s'ha realitzat la identificació del gen ABA2 y de les mutacions *sre1-1/aba2-11* y *sre1-2/aba2-12*. El gen ABA2 (At1g52340) codifica una alcohol deshidrogenasa de cadena curta dependent de NAD⁺ (SDR). La mutació *sre1-1/aba2-11* es deguda a una deleció de 53 pb que també suposa un canvi en la pauta de lectura, generant un al·lel nul de ABA2. La mutació *sre1-2/aba2-12* produeix a la substitució Gly28Arg, afectant al lloc d'unió del coenzima. Mitjançant un anàlisi HPLC-MS s'ha demostrat que la proteïna recombinant ABA2 catalitza la conversió de xantoxina en aldehyd abscísic en una reacció dependent de NAD⁺. Els resultats obtinguts en el present treball estableixen inequívocament que la conversió de xantoxina en aldehyd abscísic representa el penúltim pas de la ruta de biosíntesi d'ABA i que està catalitzat pel producte genètic del gen ABA2 (At1g52340).

L'últim pas de la ruta de biosíntesi d'ABA és la conversió de l'aldehyd abscísic en àcid abscísic. Aquest pas està catalitzat en *A. thaliana* pel producte genètic del gen AAO3. Els mutants *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3*, igual que el mutant *aao3-1*, mostraven una reducció en els nivells d'ABA en fulles de roseta i una major transpiració que las plantes silvestres. A més, i contràriament al mutant *aao3-1*, mostraven un fenotip de osmotolerancia en germinació i establiment de plàntula, germinació resistent a paclobutrazol, latència reduïda i posseeixen una reducció del 65% en els nivells d'ABA en llavors. La caracterització molecular de la mutació *sre2-1/aao3-2* revela una inserció de T-DNA que elimina la transcripció del gen AAO3, constituint por tant un al·lel nul. La secuenciació del gen AAO3 en el mutant *sre2-2/aao3-3* va revelar una deleció de tres nucleòtids i vàries mutacions de canvi de sentit. L'evidència genètica i bioquímica resultant de l'anàlisi dels mutants *sre2-1/aao3-2* i *sre2-2/aao3-3* indica que lesions en el gen AAO3 condueixen a nivells reduïts d'ABA i fenotips característics en llavors. Aleshores, queda demostrat que el gen AAO3 poseeix un paper crucial en la biosíntesi d'ABA en llavors.

Abstract

Mutants able to germinate and perform early growth in medium containing a high NaCl concentration were identified and named salt resistant (*sre*). The *sre* mutants also were able to germinate in high-osmoticum medium, indicating that they are osmotolerant in a germination assay. Complementation analyses revealed that *sre1-1* and *sre1-2* were alleles of the abscisic acid (ABA) biosynthesis ABA2 gene. A map-based cloning strategy allowed the identification of the ABA2 gene and molecular characterization of the new *aba2* alleles. The ABA2 gene product belongs to the family of short-chain dehydrogenases/reductases, which are known to be NAD- or NADP-dependent oxidoreductases. Recombinant ABA2 protein produced in *Escherichia coli* exhibits a K_m value for xanthoxin of 19 μM and catalyzes in a NAD-dependent manner the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde, as determined by HPLC-mass spectrometry. The ABA2 mRNA is expressed constitutively in all plant organs examined and is not upregulated in response to osmotic stress. The results of this work are discussed in the context of previous genetic and biochemical evidence regarding ABA biosynthesis, confirming the xanthoxin-->abscisic aldehyde-->ABA transition as the last steps of the major ABA biosynthetic pathway.

The abscisic aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product of *A. thaliana* catalyzes the final step in abscisic acid (ABA) biosynthesis. An *aao3-1* mutant in a Landsberg *erecta* genetic background exhibited a wilted phenotype in rosette leaves, whereas seed dormancy was not affected (Seo et al., 2000a). Therefore, it was speculated that a different aldehyde oxidase would be the major contributor to ABA biosynthesis in seeds (Seo et al., 2000a). Through a screening based on germination under high-salt concentration, we isolated two mutants in a Columbia genetic background, initially named *sre2-1* and *sre2-2*. Complementation tests with different ABA-deficient mutants indicated that *sre2-1* and *sre2-2* mutants were allelic to *aao3-1*, and therefore they were renamed as *aao3-2* and *aao3-3*, respectively. Indeed, molecular characterization of the *aao3-2* mutant revealed a T-DNA insertional mutation that abolished the transcription of AAO3 gene, while sequence analysis of AAO3 in *aao3-3* mutant revealed a deletion of three nucleotides and several missense mutations. Physiological characterization of *aao3-2* and *aao3-3* mutants revealed a wilted phenotype and osmotolerance in germination assays. In contrast to *aao3-1*, both *aao3-2* and *aao3-3* mutants showed a reduced dormancy. Accordingly, ABA levels were reduced in dry seeds and rosette leaves of both *aao3-2* and *aao3-3*. Taken together, these results indicate that AAO3 gene product plays a major role in seed ABA biosynthesis.

ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
AAO3	aldehído abscísico oxidasa 3
ABA	ácido abscísico
ABF	factor de unión al elemento ABRE
ABRC	<i>Arabidopsis Biological Resource Center</i>
ABRE	elemento de respuesta a ABA
AcH	ácido acético glacial
AcK	acetato potásico
AcNa	acetato sódico
An	absorbancia a n nm
AO	aldehído oxidasa
APS	persulfato amónico
BAC	cromosoma artificial de bacterias
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, sal de toluidina
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BrEt	bromuro de etidio
BRs	brasinoesteroides
BSA	γ -globulina bovina
CaMV	virus del mosaico de la coliflor
CAPS	<i>Cleaved Amplified Polymorphic Sequences</i>
cDNA	DNA complementario
CTAB	bromuro de cetil trimetilamonio
dATP	desoxiadenina trifosfato
dCTP	desoxicitosina trifosfato
DEPC	dietil pirocarbonato
dGTP	desoxiguanina trifosfato
DMAPP	dimetilalil difosfato
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTT	ditiotreitól
dTTP	desoxitimidina trifosfato
DXP	1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato
DXS	1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa
EDTA	ácido etilen-diamin-tetra acético
GA	giberelina
GGPP	geranilgeranil difosfato
GGPS	geranilgeranil difosfato sintasa
GTP	guanosina trifosfato
HPLC	cromatografía en fase líquida de alta resolución
IPP	isopentenil difosfato
IPTG	isopropil β -D-tiogalactopiranósido
kb	kilo par de bases
LB	medio de cultivo de bacterias Luria-Bertrani
LYC-B	Licopeno β -ciclasa
MAE	20 mM MOPS, 5 mM AcNa, 1 mM EDTA, llevado a pH 7 con NaOH
MCSU	sulfurasa del cofactor MoCo
MEP	2-C-metileritritol-4-fosfato
MES	ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico

MoCo	cofactor de molibdeno
MOPS	ácido 2-(N-morfolino)propanosulfónico
mRNA	RNA mensajero
MS	medio de cultivo de plantas de Murashige y Skoog
NAD⁺	nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
NADP⁺	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NBT	cloruro de tetrazolio nitroazul
NCED	9-cis epoxicarotenoide dioxigenasa
ORF	pauta abierta de lectura
p/v	peso/volumen
pb	pares de bases
PCI	fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, en proporción 25:24:1
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDS	fitoeno desaturasa
PSY	fitoeno sintasa
PVP	polivinilpirrolidona
RNA	ácido ribonucleico
ROS	especies reactivas de oxígeno
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	transcripción reversa acoplada a PCR
SDR	alcohol deshidrogenasas/reductasas de cadena corta
SDS	dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis en geles de SDS-PA
SSC	tampón salino de citrato sódico
TAE	40 mM Tris base, 20 mM ácido acético, 2 mM EDTA
TBE	45 mM Tris base, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA
TBS	150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,6
TCES	0.2 M Tris, 0.2 M NaCl, 50 mM EDTA, 2% SDS, pH 8.0 con HCl
T-DNA	DNA transferido
TE	10 mM Tris, 1 mM EDTA, ajustado a pH 8 con HCl
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
v/v	volumen/volumen
VDE	violaxantina deepoxidasa
ZDS	ζ-caroteno desaturasa
ZEP	zeaxantina epoxidasa

1. Introducción.

1.1. Naturaleza bioquímica del ácido abscísico (ABA).

En los años 60, Addicott y colaboradores (Davis, California) aislaron dos compuestos que pensaron jugaban un papel muy importante en la abscisión de los frutos del algodón y que denominaron como “abscisin I” y “abscisin II”. Al mismo tiempo en Gales, Wareing y colaboradores estudiando la latencia de los brotes de plantas encontraron una fracción que posiblemente contenía una hormona o factor que causaba la latencia y que denominaron “dormidina”. La comparación posterior de los espectros de infrarrojos de los dos compuestos determinaron que ambos eran el mismo compuesto, y por consenso se denominó a este compuesto como ácido abscísico (ABA) (Addicott, F. T. et al., 1968).

El ABA se encuentra ampliamente distribuido tanto en las plantas superiores como en las inferiores. En las plantas superiores se encuentra en todos los tejidos vegetales, con unos niveles ampliamente influidos por las condiciones ambientales. También encontramos ABA en algunos hongos fitopatogénicos, algas y cianobacterias (Walton, D. C. and Li, Y., 1995; Leung, J. and Giraudat, J., 1998; Finkelstein, R. R. and Rock, C. D., 2002). El ABA es un sesquiterpenoide ($C_{15}H_{20}O_4$) con un grupo carboxilo ($pK_a=4,8$), siendo por tanto un ácido orgánico débil. Posee un carbono asimétrico y ópticamente activo en posición C-1' (Figura 1.1.). El enantiómero natural es la forma S-(+)-ABA, mientras que la forma R-(-)-ABA no se produce de forma natural, aunque se ha postulado que podría llegar a producirse como un posible producto de racemización vía el catabolito ABA-transdiol (Vaughan, G. T. and Milborrow, B. V., 1988). Incluso se ha postulado que podría tener alguna función biológica puesto que se han aislado mutantes con respuesta estereoselectiva a la forma R-(-)-ABA (Nambara, E. et al., 2002). La cadena lateral del ABA es por definición 2-cis,4-trans, siendo biológicamente inactiva la isoforma con la cadena lateral 2-trans,4-trans.

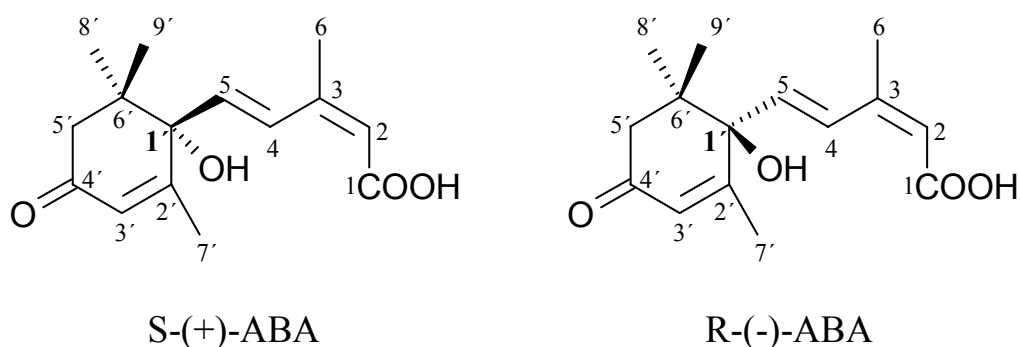


Figura 1.1. Estructura química de los enantiómeros del ácido abscísico. La forma natural y hormonalmente activa es el enantiómero S-(+)-ABA mientras que el enantiómero R-(-)-ABA no es natural. Se incluye la numeración de los carbonos de ambos enantiómeros y se destaca el carbono ópticamente activo C1'. La cadena lateral de ambos enantiómeros es 2-cis,4-trans.

1.2. Efectos fisiológicos del ABA.

El ácido abscísico juega un papel regulador básico durante el complejo ciclo de vida de una planta. Durante el desarrollo vegetativo, el ABA posee un papel crucial en la respuesta de la planta frente a varios estreses ambientales capaces de causar estrés hídrico. En la respuesta al estrés hídrico dos son las funciones principales, la inducción del cierre de los estomas para reducir la pérdida de agua debida a la transpiración y la síntesis de diversos grupos de genes de respuesta a estrés. En cambio, durante la maduración de la semilla promueve la acumulación de sustancias de reserva, la adquisición de la tolerancia a la desecación, induce el inicio de la latencia e inhibe la germinación de la semilla (Zeevaart, J. A. and Creelman, R. A., 1988; Rock, C. D. and Zeevaart, J. A., 1993; Walton, D. C. and Li, Y., 1995; Leung, J. and Giraudat, J., 1998). Tradicionalmente se ha considerado al ABA como un inhibidor del crecimiento de las plantas en respuesta a estrés puesto que en condiciones de estrés severo es capaz de inhibir totalmente el crecimiento de la planta (Zeevaart, J. A. and Creelman, R. A., 1988; Leung, J. and Giraudat, J., 1998). Sin embargo, se ha mostrado que el ABA es necesario para mantener el crecimiento de las raíces en condiciones de estrés moderado (Creelman, R. A. et al., 1990; Sharp, R. E. and LeNoble, M. E., 2002) y diversas evidencias indican que el ABA poseería un papel como regulador positivo del crecimiento de la planta en condiciones sin estrés (Cheng, W. H. et al., 2002; Sharp, R. E. and LeNoble, M. E., 2002; LeNoble, M. E. et al., 2004).

El control o la influencia ejercido por el ABA en los procesos mencionados anteriormente depende de los niveles de la hormona activa. Estos niveles son modulados principalmente por la relación entre la velocidad de biosíntesis y degradación, aunque también hay que considerar los niveles de la hormona necesarios para cada función.

Desarrollo y establecimiento de la semilla.

Las semillas han sido diseñadas para permitir al embrión maduro su supervivencia hasta que se establezca como una nueva plántula, siendo de este modo la formación de las semillas un paso crucial en el ciclo vital de las plantas superiores. La primera parte del desarrollo de la semilla incluye el desarrollo y crecimiento del embrión, acabando cuando finalizan las divisiones celulares y se inicia el crecimiento por alargamiento de las células (Raz, V. et al., 2001). Una vez desarrollado el embrión, tiene lugar la fase de maduración de la semilla en la que se llevan a cabo una serie de procesos fisiológicos encaminados a permitir la supervivencia del mismo. Estos incluyen la acumulación de sustancias de reservas, la detención del desarrollo y crecimiento de los tejidos del embrión, la inducción de la latencia de la semilla y la adquisición de la tolerancia a la desecación. Semillas de mutantes deficientes en ABA muestran viviparismo, el embrión germina sin haber completado el desarrollo de la semilla, y reducida latencia, son capaces de germinar inmediatamente al final del desarrollo de la semilla.

Germinación de la semilla y establecimiento de plántula

La importante decisión de la germinación de la semilla está controlado por varias hormonas (ABA, giberelinas (GAs), etileno y brasinoesteroides (BRs)) y por factores ambientales. Acabado el desarrollo normal de la semilla, el desarrollo y crecimiento del embrión se encuentra detenido y la semilla en estado de latencia. Estos procesos se revierten durante la germinación, la cual ocurre cuando se dan las condiciones ambientales adecuadas y la semilla seca se embebe de agua (revisado en Bentsink, L. and Koornneef, M., 2003). El mantenimiento o rotura de la latencia de las semillas de las plantas superiores está controlada tanto por factores ambientales (luz, temperatura y tiempo de almacenamiento) como por factores genéticos. El ABA

endógeno producido durante la formación de la semilla es esencial para el inicio y el mantenimiento de la latencia de la semilla, aunque no se sabe si los bajos niveles de ABA presentes en la semilla madura interviene en la regulación de la germinación (Bentsink, L. and Koornneef, M., 2003).

La germinación de la semilla comprende una serie de procesos que se inician con su imbibición en agua y culminan con la emergencia de la plántula. La absorción de agua por la semilla desencadena una serie de cambios metabólicos, por ejemplo la movilización de las reservas de la semilla, regulados entre otros factores por ABA. Así, mutantes deficientes en giberelinas son incapaces de germinar sin la aplicación de giberelina exógena (Koornneef, M. and van der Veen, J. H., 1980), indicando que es necesaria la síntesis de novo de GA durante la imbibición de la semilla para que esta supere el estado de latencia inducido por ABA y germine (Karssen, CM and Laka, E., 1986). Por otra parte, esta muy bien caracterizado el efecto antagonista del ABA frente a GA durante la germinación en granos de cereales en la movilización de almidón (revisado en Lovegrove, A. and Hooley, R., 2000; Ritchie, S. M. et al., 2002).

Asimismo, el etileno esta implicado en el control del crecimiento y desarrollo del diferentes procesos, incluido la germinación. El aislamiento de diversos mutantes insensibles a etileno como mutantes hipersensibles a ABA indica que el etileno regula negativamente la latencia de las semillas, inhibiendo la acción del ABA (Beaudoin, N. et al., 2000; Ghassemian, M. et al., 2000). Otros experimentos muestran que la señalización por BRs es necesaria para superar la latencia inducida por ABA y estimular la germinación (Steber, C. M. and McCourt, P., 2001). Además, diversos ensayos muestran la germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana* en ensayos con bajas concentraciones de azúcares exógeno aunque también se añada al medio ABA, indicando una interacción entre ambas señales (Garcíarrubio, A. et al., 1997; Finkelstein, R. R. and Lynch, T. J., 2000).

Respuesta a estrés.

La respuesta al estrés hídrico es uno de los mecanismos adaptativos más importantes para la planta. Existen una serie de estreses abióticos capaces de causar estrés hídrico tales como sequía, congelación, salinidad y herida, que mediante rutas diferentes de percepción pueden converger en la biosíntesis de ABA (Xiong, L. et al.,

2002b). Principalmente son dos las respuestas a estrés hídrico reguladas por ABA: el cierre de los estomas y la expresión de genes de respuesta a estrés.

En condiciones de estrés hídrico la planta disminuye la apertura estomática en cuestión de minutos para minimizar la pérdida de agua causada por la transpiración. El ABA es el mayor controlador de la apertura estomática, ya que puede promover tanto el cierre de los estomas como inhibir su apertura (Schroeder, J. I. et al., 2001; Himmelbach, A. et al., 2003). El estrés hídrico produce la pérdida de potencial osmótico que provoca cambios electrofisiológicos y un aumento de la superficie de la membrana plasmática de las células oclusivas que acaban cerrando el poro estomático. Principalmente estos eventos están mediados por vías de señalización de H_2O_2/Ca^{2+} y cascadas de fosforilación, al igual que la apertura estomática inducida por auxinas. Este hecho indica que la especificidad de la respuesta estomática puede ser debida a la frecuencia y amplitud de la oscilación del Ca^{2+} así como a su localización, las cuales presumiblemente reflejan los mecanismos de liberación y la diferente interpretación celular del cambio citoplasmático del Ca^{2+} (Finkelstein, R. R. and Rock, C. D., 2002).

La adaptación de la planta al estrés incluye tanto procesos dependientes como independientes de ABA (Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K., 1997), aunque con conexiones entre ellos (Ishitani, M. et al., 1997; Xiong, L. et al., 1999; Xiong, L. and Zhu, J. K., 2001; Xiong, L. et al., 2002b). Así, la segunda función importante del ABA consiste en la modulación de la tolerancia al estrés de la planta mediante la expresión de varios grupos de genes, entre los que se incluyen factores de transcripción. Uno de estos grupos de genes confieren protección frente a la desecación, de modo que el ABA tendría una función similar durante los periodos de estrés hídrico impuesto por las condiciones ambientales al que posee en la adquisición de la tolerancia a la desecación de las semillas en desarrollo. De este modo, durante el desarrollo vegetativo de la planta en condiciones de estrés, el ABA regula el desarrollo de la planta y mantiene la homeostasis iónica mediante la acumulación de moléculas protectoras como pequeñas proteínas hidrofílicas (proteínas LEA), azúcares y prolina, además de la activación de mecanismos de detoxificación.

Una diferencia importante entre estas respuestas a estrés estriba en la velocidad con que son producidas. La respuesta estomática es relativamente rápida, unos minutos, e implica cambios en la actividad de varias moléculas señalizadoras y

canales iónicos, mientras que el resto de respuestas requieren horas o días puesto que implican cambios en la expresión génica de las células.

Crecimiento celular.

En general, en condiciones de estrés moderado el ABA mantiene el crecimiento de la raíz pero inhibe el crecimiento de la parte aérea, aumentando la proporción raíz:parte aérea (Creelman, R. A. et al., 1990; Sharp, R. E. and LeNoble, M. E., 2002). En cambio, bajo condiciones de estrés severo, el alto nivel de ABA en la planta inhibe el crecimiento tanto de la parte aérea como de la raíz aunque promueve la formación de las raíces laterales, dando lugar al fenómeno denominado rizogénesis por sequía (Vartanian, N. et al., 1994). Además, altas concentraciones de ABA exógeno inhiben la germinación de las semillas y el crecimiento de la plántula (Lopez-Molina, L. et al., 2001). Así se considera que bajo condiciones de estrés ambiental el ABA posee el papel de inhibidor del crecimiento de las plantas.

En condiciones de riego abundante, las plantas poseen unos niveles de ABA endógeno relativamente bajos. Estos niveles son necesarios para un correcto crecimiento de la planta como se observa por el reducido vigor que poseen los mutantes deficientes en ABA, el cual puede ser restaurado por la aplicación de ABA exógeno (Finkelstein, R. R. and Rock, C. D., 2002). Además, (LeNoble, M. E. et al., 2004), demostró que niveles normales de ABA endógenos son necesarios para una correcta expansión celular. Así, los mutantes de biosíntesis *abal* poseen un menor tamaño celular en las hojas de roseta comparado con el ecotipo silvestre, lo que provoca una reducción en el peso y tamaño de los mutantes (José Luis Micol, comunicación personal). Esta y otras observaciones han hecho que algunos autores hayan propuesto que el ABA actúe como un inhibidor del crecimiento en condiciones de estrés severo pero en cambio actúe como un promotor del crecimiento en ausencia de estrés o con estrés suave (Cheng, W. H. et al., 2002; Sharp, R. E. and LeNoble, M. E., 2002; LeNoble, M. E. et al., 2004).

Otras funciones

Maduración del fruto.

Durante la maduración de los frutos se produce un aumento de los niveles de ABA, lo cual indicaba que podría estar actuando en este proceso. Sin embargo, diversos estudios confirmaron que este aumento se produce como consecuencia de la interacción existente con la hormona etileno, principal reguladora de estos procesos (Rock, C. D. and Zeevaart, J. A., 1993).

Floración

Varios genes de biosíntesis y respuesta a ABA han sido implicados en la floración. Los mutantes *abal* y *abil* de *A. thaliana* exhiben floración temprana en días cortos (Martinez-Zapater, J. M., 1994), mientras que el mutante hipersensible a ABA *hyll* muestra floración tardía (Lu, C. and Fedoroff, N., 2000). También recientemente se ha aislado al gen ABH1 como supresor de un fenotipo de retraso de floración en *A. thaliana* (Bezerra, I. C. et al., 2004). Todos estos datos son consistentes con una función de ABA como hipotético inhibidor de la transición floral. Sin embargo, falta determinar con claridad las relaciones existentes entre el ABA y la transición floral.

El gen ERA1 identificado como regulador negativo de la respuesta de ABA en la germinación (Cutler, S. et al., 1996) fue identificado también como el gen WIGGUM (Ziegelhoffer, E. C. et al., 2000) que afecta al desarrollo de los meristemas. Los mutantes *eral* poseen meristemas inusualmente alargados, posiblemente reflejando defectos en la regulación de la división frente a la diferenciación dentro del meristemo.

1.3. Biosíntesis y catabolismo del ABA.

El papel desarrollado por la hormona ABA en los procesos fisiológicos en los que interviene es determinado principalmente por los niveles de hormona activa presente en los diferentes tejidos. Estos niveles son dinámicos y están controlados principalmente por la relación entre la velocidad de la biosíntesis y el catabolismo de la hormona.

El conocimiento de los mecanismos moleculares que controlan los niveles de ABA en los tejidos se ha incrementado en los últimos años gracias a la identificación

y caracterización de mutantes tanto en *A. thaliana* como en maíz, tomate y tabaco (revisado en Finkelstein, R. R. and Rock, C. D., 2002), demostrando la conservación de la ruta de biosíntesis de ABA en las plantas superiores. Los mutantes deficientes de ABA han sido identificados principalmente en análisis genéticos basados en: germinación precoz (Tan, B. C. et al., 1997), susceptibilidad al marchitamiento (Marin, E. et al., 1996; Seo, M. et al., 2000b), cambio en la extinción fotoquímica (Niyogi, K. K. et al., 1998), capacidad para germinar y crecer en medios con alta concentración de sal o sacarosa (Laby, R. J. et al., 2000; Quesada, V. et al., 2000; Rook, F. et al., 2001; presente trabajo) y capacidad para germinar en medios con placlobutrazol (Koornneef, M. et al., 1982; Leon-Kloosterziel, K. M. et al., 1996).

Búsquedas similares basadas en la sensibilidad al ABA durante la germinación de las semillas han sido realizadas para el aislamiento de mutantes del catabolismo del ABA, pero no se ha obtenido ningún resultado positivo. Esto sugeriría que las mutaciones en el catabolismo del ABA son letales o bien que hay una elevada redundancia génica (revisado en Cutler, A. J. and Krochko, J. E., 1999).

En la Tabla 1.1. se recogen los principales mutantes en la ruta de biosíntesis de ABA que será discutida a continuación.

Tabla 1.1. Mutantes de biosíntesis de ABA en diferentes especies. Se incluye la función bioquímica y el producto génico afectado. La función bioquímica hace referencia a la ruta de biosíntesis de ABA descrita en las Figuras 1.3. y 1.4.

Mutante	Especie	Función bioquímica	Enzima	Referencia
<i>aba1/npq2/los6/sre3</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Epoxidación de zeaxantina	Zeaxantina epoxidasa (ZEP)	Karssen, C. M. et al., 1983; Rock, C. D. and Zeevaart, J. A., 1991; Niyogi, K. K. et al., 1998; Xiong, L. et al., 2002a; presente trabajo
<i>aba2</i>	<i>Nicotiana glauca</i>	Epoxidación de zeaxantina	Zeaxantina epoxidasa (ZEP)	Marin, E. et al., 1996
<i>sto1/nced3</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Rotura oxidativa de 9-cis-neoxantina o 9-cis-violaxantina	9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED)	Ruggiero, B. et al., 2004
<i>vp14</i>	<i>Zea mays</i>	Rotura oxidativa de 9-cis-neoxantina o 9-cis-violaxantina	9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED)	Tan, B. C. et al., 1997
<i>not</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Rotura oxidativa de 9-cis-neoxantina o 9-cis-violaxantina	9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED)	Burbidge, A. et al., 1999
<i>aba2/sis4/isi4/gin1/sre1/sañ3</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Oxidación de xantoxina a aldehído abscísico	Alcohol deshidrogenasa de cadena corta	Leon-Kloosterziel, K. M. et al., 1996; Laby, R. J. et al., 2000; Rook, F. et al., 2001; Cheng, W. H. et al., 2002; presente trabajo
<i>aao3/sre2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Oxidación del aldehído abscísico a ABA	Aldehído abscísico oxidasa 3 (AAO3)	Seo, M. et al., 2000b; presente trabajo
<i>sit</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Oxidación del aldehído abscísico a ABA	Aldehído abscísico oxidasa	Okamoto, M. et al., 2002
<i>aba3/los5/gin5/frs1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Síntesis del cofactor MoCo	Sulfurasa del cofactor de Molibdeno (MCSU)	Leon-Kloosterziel, K. M. et al., 1996; Schwartz, S. H. et al., 1997a; Xiong, L. et al., 2001b; Cheng, W. H. et al., 2002; Llorente, F. et al., 2000
<i>flc</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Síntesis del cofactor MoCo	Sulfurasa del cofactor de Molibdeno	Sagi, M. et al., 2002
<i>aba1</i>	<i>Nicotiana glauca</i>	Síntesis del cofactor MoCo	Sulfurasa del cofactor de Molibdeno	Akaba, S. et al., 1998

Biosíntesis de ABA.

Primeros pasos de la ruta en cloroplastos: síntesis de los precursores isoprenoides y carotenoides.

Las plantas son capaces de producir cientos de isoprenoides diferentes entre los que podemos encontrar pigmentos fotosintéticos (clorofilas, tocoferoles, carotenoides), hormonas (ABA, giberelinas, citoquininas, brasinoesteroides) y agentes microbianos (fitoalexinas). Todos estos compuestos tienen en común el ser producidos a partir de la unidad de 5 carbonos denominada isopentenil difosfato (IPP) y su estereoisómero dimetilalil difosfato (DMAPP). Las plantas son capaces de producir IPP y DMAPP mediante dos rutas localizadas en dos compartimentos celulares y con un pequeño intercambio entre ambas rutas mediante transportadores (Rodríguez-Concepcion, M. and Boronat, A., 2002):

- La ruta del ácido mevalónico (MVA), la cual tiene lugar en el citosol.
- La ruta del metileritritol fosfato (MEP), que se localiza en los cloroplastos.

Se ha discutido sobre cual de estas dos rutas constituiría el inicio y suministraría los precursores de la ruta de biosíntesis de ABA, constituyendo el inicio de la ruta. Algunos hongos fitopatógenos son capaces de sintetizar ABA utilizando la ruta del MVA para la síntesis de los precursores (Walton, D. C. and Li, Y., 1995). Sin embargo, estudios con diferentes precursores marcados radiactivamente indicaron que la ruta principal que producía los precursores para la biosíntesis ABA en las plantas superiores tenía que ser la ruta MEP (revisado en Walton, D. C. and Li, Y., 1995), confirmándose posteriormente cuando la ruta MEP fue completamente caracterizada (Rohmer, M., 1999; Hirschberg, J., 2001; Rodríguez-Concepcion, M. and Boronat, A., 2002). Posteriores estudios mostraron que la ruta MEP produce los precursores de la biosíntesis de isoprenoides relacionados con la fotosíntesis (carotenoides y las cadenas laterales de clorofilas, plastoquinonas y filoquinonas) y hormonas (ABA y giberelinas) (Rodríguez-Concepcion, M. and Boronat, A., 2002).

El primer paso de la ruta MEP consiste en la formación del compuesto 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXP) a partir de los sustratos piruvato y gliceraldehído 3-fosfato, formación catalizada por la enzima DXP sintasa (DXS). Posteriormente, se produce la reducción del compuesto DXP catalizada por la enzima DXP reductasa, dando lugar al compuesto que da nombre a la ruta, el 2-C-metileritritol-4-fosfato

(MEP). Los posteriores pasos implican no menos de 3 actividades enzimáticas diferentes, obteniéndose como resultado el compuesto IPP y seguramente también su estereoisómero DMAPP. Posteriormente mediante la actuación de una isomerasa los estereoisómeros pueden ser transformados el uno en el otro (Figura 1.2.)

Seguidamente se produce la formación de la molécula C₂₀ geranylgeranyl difosfato (GGPP) mediante la adición secuencial de tres moléculas de IPP y una de DMADP catalizada por la enzima geranylgeranyl difosfato sintasa (GGPS). Este compuesto es el precursor de diferentes rutas de biosíntesis, entre la que se encuentra la ruta de biosíntesis de carotenoides (Figura 1.2.).

El primer paso de la ruta de biosíntesis de carotenoides en cloroplastos consiste en la condensación de dos moléculas de GGPP para obtener la molécula C₄₀ fitoeno. Esta condensación está catalizada por la proteína asociada a membrana fitoeno sintasa (PSY), siendo el paso de control más importante en la ruta de biosíntesis de carotenoides (Hirschberg, J., 2001). El siguiente paso es llevado a cabo por dos enzimas similares en estructura y función, las enzimas fitoeno desaturasa (PDS) y ζ-caroteno desaturasa (ZDS) que convierten la molécula fitoeno en licopeno. Después, el licopeno es transformado en β-caroteno mediante la adición de un anillo de β-ionina en cada uno de los extremos de la molécula. Esta es una reacción de dos pasos catalizada por la enzima licopeno β-ciclasa (LYC-B), último enzima de la ruta de biosíntesis de carotenos (Figura 1.2.).

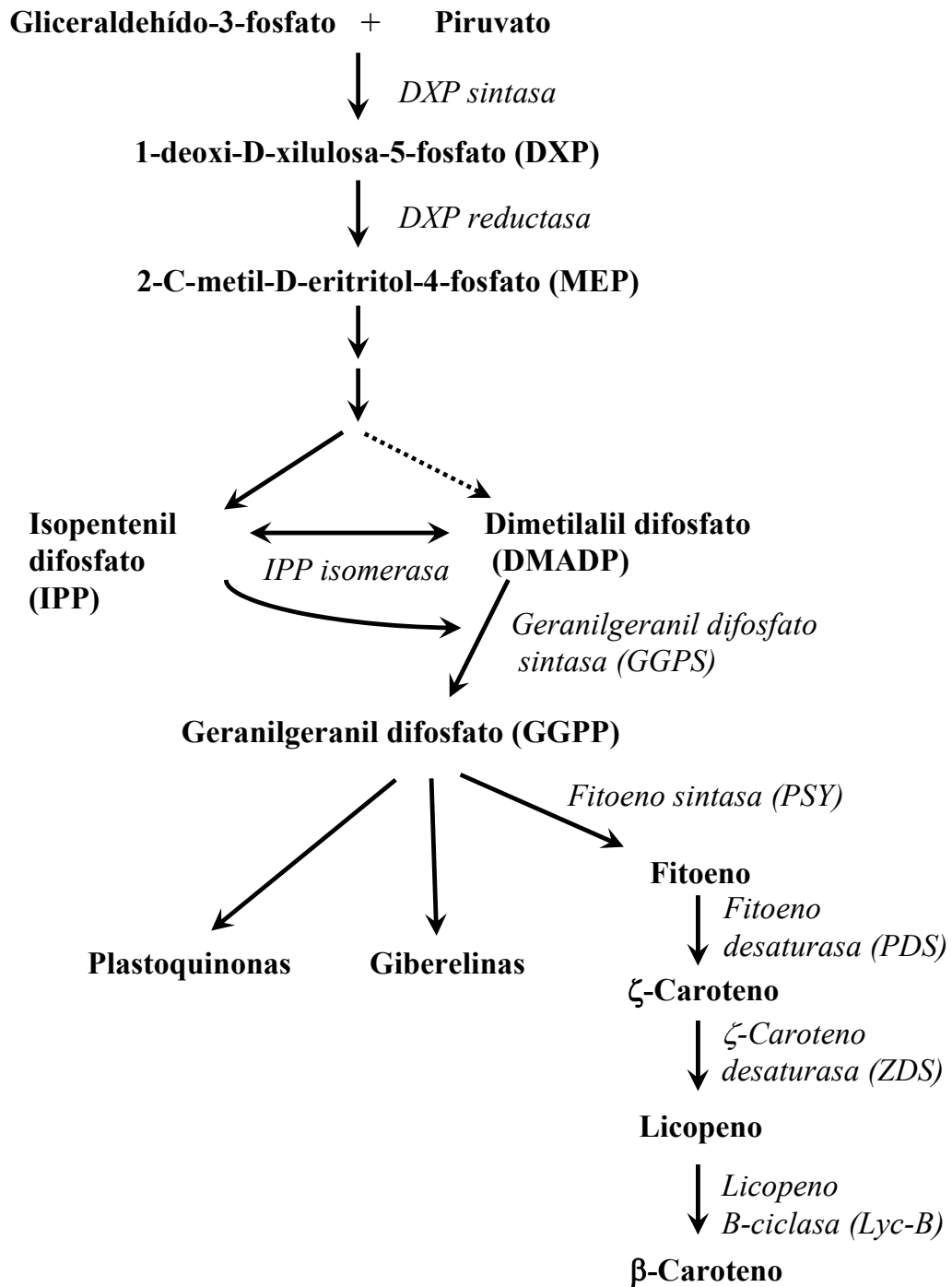


Figura 1.2. Primeros pasos de la ruta de biosíntesis de ABA en el cloroplasto: ruta MEP y ruta de biosíntesis de carotenoides. Los enzimas están indicados en letra cursiva.

Formación y escisión de xantofilas en cloroplastos.

La biosíntesis de ABA continúa mediante la hidroxilación del compuesto β-caroteno para obtener la xantofila zeaxantina, reacción catalizada por la enzima β-caroteno hidroxilasa (CrtR-B) (Figura 1.3.). La enzima encargada de catalizar el siguiente paso es la zeaxantina epoxidasa (ZEP), que convierte la zeaxantina en

trans-violaxantina vía anteraxantina mediante dos reacciones consecutivas de epoxidación. Marin, E. et al., 1996) identificaron el mutante *aba2* de *Nicotiana glauca* y clonaron el gen responsable del fenotipo. La identificación del producto génico determinó que correspondía a la enzima ZEP, siendo la primera enzima caracterizada de la ruta de biosíntesis de ABA. Posteriormente se identificaron los genes que codifican esta actividad enzimática en *A. thaliana* (Audran, C. et al., 2001; Xiong, L. et al., 2002a), tomate (Burbidge, A. et al., 1997) y pimiento (Bouvier, F. et al., 1996). La epoxidación de zeaxantina a trans-violaxantina es reversible mediante la reacción catalizada por la enzima violaxantina deepoxidasa (VDE). Ambas enzimas, ZEP y VDE, forman parte del denominado ciclo de las xantofilas. Este ciclo posee como función principal evitar el efecto de “extinción no fotoquímica” que se produce al disipar del exceso de energía como calor en los complejos de recolección de luz de los fotosistemas. Los fotosistemas transfieren el exceso de electrones a estos compuestos, protegiendo de los sistemas fotosintéticos de la planta del aumento de temperatura producido por la extinción no fotoquímica (Niyogi, K. K., 1999). En condiciones de baja intensidad de luz, la enzima ZEP convierte la zeaxantina en violaxantina. En cambio, en condiciones de alta luz se activa la enzima VDE. El estudio de la secuencia de la enzima ZEP reveló que poseía un dominio transmembrana y una señal de localización en cloroplasto, por lo que se supone estaría anclada en la membrana del tilacoide. También se determinó que la enzima posee un alto grado de similitud a algunas monooxigenasas bacterianas y que necesitaba la ferredoxina como cofactor (Bouvier, F. et al., 1996).

En los siguientes pasos de la ruta, la xantofila trans-violaxantina es transformada en 2 compuestos 9-cis-epoxicarotenoides diferentes, la 9-cis-violaxantina y la 9-cis-neoxantina (Figura 1.3.). Poco se conoce de los enzimas implicados en estas conversiones, y solamente se ha identificado una enzima con la capacidad de convertir el epoxicarotenoide trans-violaxantina en trans-neoxantina. Esta enzima se denominó neoxantina sintasa, pero el análisis de su secuencia aminoacídica determinó que era idéntica a la enzima licopeno β -ciclase (Figura 1.2). Se trataría entonces de una enzima bifuncional y con toda probabilidad esta no sería su actividad biológica mayoritaria (Bouvier, F. et al., 2000; Seo, M. and Koshiba, T., 2002). Recientemente se ha aislado un nuevo mutante llamado *aba4*. Estudios preliminares indican que este mutante es incapaz de sintetizar los isómeros cis y trans de la neoxantina, lo cual indica que la enzima codificada por el *locus* estaría

implicada en la conversión de los compuestos trans-violaxantina en las cis-xantofilas (Annie Marie Poll, 7th International Congress on Plant Molecular Biology, Barcelona 2003).

El siguiente paso de la ruta es considerado por muchos autores como el primer paso específico de la ruta de biosíntesis de ABA y en él tiene lugar la rotura oxidativa de los dos compuestos 9-cis-epoxicarotenoides, 9-cis-violaxantina y 9'-cis-neoxantina, para producir xantoxina y un compuesto C₂₅ (Schwartz, S. H. et al., 1997b; Figura 1.3.). La enzima que cataliza esta rotura oxidativa es la 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED). El primer mutante para esta paso fue aislado en maíz como un mutante deficiente en ABA denominado *vp14* (Tan, B. C. et al., 1997). Pese a que la enzima es capaz de emplear en ensayos de actividad *in vitro* tanto 9-cis-neoxantina como 9-cis-violaxantina, existen varias evidencias que indican que el precursor epoxicarotenoide natural sería la 9-cis neoxantina:

- El epoxicarotenoide neoxantina se encuentra mayoritariamente como el isómero 9-cis, mientras que solo una pequeña proporción del epoxicarotenoide violaxantina se encuentra como el isómero 9-cis (Strand, A. et al., 2000).
- Varios estudios con la proteína recombinante NCED1 de judía han determinado un valor de K_m menor para el sustrato 9-cis-neoxantina que para el sustrato 9-cis-violaxantina (Schwartz, S. H. et al., 2003b).

La enzima VP14 de maíz se localiza en la membrana tilacoidal donde se localizan los carotenoides hidrofóbicos (Tan, B. C. et al., 2001). El aislamiento de los genes NCED en *A. thaliana* y otras especies vegetales determino la existencia de una familia génica NCED en plantas (Tan, B. C. et al., 1997, Tan, B. C. et al., 2003; Burbidge, A. et al., 1999; Qin, X. and Zeevaart, J. A., 1999; Iuchi, S. et al., 2000, Iuchi, S. et al., 2001; Chernys, J. T. and Zeevaart, J. A., 2000; Schwartz, S. H. et al., 2003b). En *A. thaliana* hay 9 miembros de la familia de genes que codifican dioxigenasas que rompen carotenoides (CCD), de los cuales 5 pertenecen a la subfamilia NCED y codifican proteínas capaces de llevar acabo la rotura oxidativa del doble enlace 11,12 de los 9-cis-epoxicarotenoides (Iuchi, S. et al., 2001; Tan, B. C. et al., 2003). Estos miembros de la subfamilia NCED son expresados en diferentes tejidos y en diferentes estadios del desarrollo (Tan, B. C. et al., 2003). La enzima codificada por el gen AtNCED3 es capaz de catalizar la rotura oxidativa de epoxicarotenoides y la expresión del gen es fuertemente inducida por estrés, lo que

indicaba que él sería el principal responsable de la biosíntesis de ABA en condiciones de estrés. Los análisis de diversas líneas transgénicas portando el transgen AtNCED3 en sentido y antisentido bajo el promotor 35SCaMV así como de un mutante nulo del gen (T-DNA) mostraron que los niveles de ABA endógenos en hojas estaban alterados. El mutante de T-DNA y las líneas antisentido mostraron menores niveles de ABA mientras que las líneas transgénicas en sentido duplicaron los niveles de ABA. Los autores concluyeron que los niveles de ABA endógenos podían ser manipulados y como consecuencia se aumentaba la tolerancia al estrés hídrico (Iuchi, S. et al., 2001). Además, el aislamiento de otro mutante de T-DNA capaz de germinar en un medio suplementado con sal y su identificación como un alelo AtNCED3 apoya la función del gen en la biosíntesis de ABA en condiciones de estrés (Ruggiero, B. et al., 2004)

Experimentos con distintas xantofilas como sustratos han establecido que la geometría 2-cis,4-trans del ABA es determinado por la rotura específica de los isómeros 9-cis-epoxicarotenoides realizada por la enzima NCED, mientras que la estereoquímica S-(+) del ABA es determinada por la reacción catalizada por la enzima ZEP.

Últimos pasos: de xantoxina a ABA en el citosol.

Los últimos pasos de la ruta de biosíntesis de ABA tienen lugar en el citosol, no conociéndose como la xantoxina sale o es transportada del cloroplasto al citosol (Figura 1.4.). Previamente a la identificación molecular de los genes implicados en estos últimos pasos ya se disponía de un cierto conocimiento sobre las actividades enzimáticas implicadas. Este fue obtenido mediante ensayos que combinaban los hipotéticos intermediarios con los mutantes de biosíntesis de ABA (Sindhu, R. K. and Walton, D. C., 1987; Schwartz, S. H. et al., 1997a).

Los mutantes *aba2* y *aba3* de *A. thaliana* fueron identificados por su capacidad de germinar en presencia del inhibidor de giberelinas paclobutrazol (Leon-Kloosterziel, K. M. et al., 1996). Posteriormente se identificaron otros alelos mutantes en búsquedas de fenotipos insensibles a azúcar (Laby, R. J. et al., 2000; Cheng, W. H. et al., 2002), en base a una conductancia alterada de los estomas (Merlot, S. et al., 2002) y en rastreos de germinación y crecimiento en medios con estrés salino (Quesada, V. et al., 2000; presente trabajo). Extractos proteicos de estos mutantes mostraban una reducida capacidad para transformar xantoxina a ABA. Si en

lugar de xantoxina se utilizaba el hipotético intermediario aldehído abscísico, el extracto proteico del mutante *aba2* era capaz de transformarlo en ABA mientras que el extracto del mutante *aba3* no era capaz de catalizar esta reacción. Por tanto, el mutante *aba2* estaría bloqueado en el paso de conversión de xantoxina a aldehído abscísico y el mutante *aba3* estaría bloqueado en el paso de conversión de aldehído abscísico a ABA (Schwartz, S. H. et al., 1997a; Figura 1.4.). Estos y otros ensayos de los posibles intermediarios determinaron una hipotética secuencia para las últimas reacciones. El primer paso consistiría en la oxidación del grupo 4'-hidroxilo del anillo a cetona seguido de la apertura del anillo epóxido de la xantoxina y la desaturación del enlace 2'-3' para obtener el aldehído abscísico. El paso final de la ruta consistiría en la oxidación del grupo aldehído del aldehído abscísico a ABA (Figura 1.4.).

En este trabajo e independientemente por el grupo de la Dra. Jen Sheen (Department of Molecular Biology, Massachusetts General Hospital, Boston, USA) se ha realizado la clonación el gen ABA2 y se ha determinado que codifica una proteína que pertenece a la familia de alcohol deshidrogenasas de cadena corta (SDR). La proteína recombinante ABA2 fue capaz de catalizar la conversión de xantoxina a aldehído abscísico utilizando NAD^+ como cofactor (Gonzalez-Guzman, M. et al., 2002; Cheng, W. H. et al., 2002).

Se han identificado 4 genes en el genoma de *A. thaliana* que codifican actividades aldehído oxidasas. Las enzimas aldehído oxidasas (AO) de las plantas están formadas por dos subunidades. En *A. thaliana*, están descritas 4 isoformas AO en hojas, formadas como homo y heterodímeros por tres productos génicos: $\text{AO}\alpha$ (AAO1-AAO1), $\text{AO}\beta$ (AAO1-AAO2), $\text{AO}\gamma$ (AAO2-AAO2) y $\text{AO}\delta$ (AAO3-AAO3). Estas isoformas AO exhiben diferentes preferencias de sustrato y están distribuidas diferencialmente en los tejidos y órganos (Akaba, S. et al., 1999; Seo, M. et al., 2000a). El ensayo de actividad aldehído oxidasa determinó que solamente la isoforma $\text{AO}\delta$ era capaz de catalizar la oxidación de aldehído abscísico a ABA (Seo, M. et al., 2000a). El mutante insercional *aao3-1* fue aislado en base al fenotipo de marchitamiento característico de los mutantes de biosíntesis de ABA. El análisis del mutante mostró que la inserción del T-DNA en el gen AAO3 era responsable del fenotipo, demostrando así que la isoforma $\text{AO}\delta$ codificada por el gen AAO3 es la

responsable del último paso de la biosíntesis de ABA en tejidos vegetativos (Seo, M. et al., 2000b; Figura 1.4.).

Tal como se ha mencionado anteriormente el mutante *aba3* posee bloqueada la oxidación del aldehído abscísico a ABA. Sin embargo, la clonación del gen ABA3 de *A. thaliana* determinó que no codificaba una aldehído oxidasa, sino una proteína con una elevada similitud con la sulfurasa del cofactor de molibdeno (MCSU) (Bittner, F. et al., 2001; Xiong, L. et al., 2001b). Este cofactor de molibdeno (MoCo) consiste en un átomo de molibdeno coordinado a dos átomos de azufre de una pterina. El cofactor MoCo es requerido en varias reacciones redox esenciales en los ciclos del carbono, nitrógeno y azufre, de modo que una lesión en un paso de la síntesis del cofactor MoCo afecta a un número elevado de actividades. Dos de estas enzimas, las xantina deshidrogenasas y las aldehído oxidasas requieren que este cofactor MoCo sea modificado de la forma dioxo a la oxotiol (Mendel, R. R. and Hansch, R., 2002). Esta modificación consiste en la sustitución de uno de los átomos de oxígenos terminales unidos al átomo de molibdeno por un átomo de azufre y está catalizada por la enzima MCSU. Así el bloqueo de la oxidación del aldehído abscísico a ABA en el mutante *aba3* está determinado por una deficiencia en el cofactor empleado por la enzima encargada de llevar a cabo la oxidación del aldehído abscísico a ABA (Bittner, F. et al., 2001; Xiong, L. et al., 2001b; Figura 1.4.). Además también se ha identificado una mutación en esta misma sulfurasa en el mutante *flacca* de tomate (Sagi, M. et al., 2002). El análisis de la transcripción del gen ABA3 de *A. thaliana* ha concluido que el gen es expresado en toda la planta y que su expresión es inducible por ABA, estrés salino y sequía (Xiong, L. et al., 2001b).

Sin embargo, diversos autores han sugerido otra ruta para estos últimos pasos de la biosíntesis de ABA basándose en estudios con intermediarios radiactivos en cloroplastos de espinacas (Milborrow, B. V., 2001). Esta ruta poseería como intermediario al ácido xantóxico y el primer paso consistiría en la oxidación del grupo aldehído de la xantoxina para obtener ácido xantóxico, mientras que el segundo paso consistiría en las modificaciones del anillo del ácido xantóxico para obtener el ABA (Figura 1.4.). Varias observaciones apoyaban esta hipótesis, entre ellas que la inhibición de la actividad AO mediante tungstato, un potente inhibidor de los enzimas dependientes de molibdeno en plantas, resultaba de la acumulación de xantoxina, indicando que la xantoxina podría ser sustrato de alguna aldehído oxidasa (Milborrow, B. V., 2001). Además, alguna de las isoformas aldehído oxidasa de *A.*

thaliana es capaz de convertir xantoxina en ácido xantóxico (Seo, M. and Koshiba, T., 2002). Sin embargo, la proteína ABA2 es incapaz de convertir el ácido xantóxico en ABA (Cheng, W. H. et al., 2002), de modo que debería de existir otra alcohol deshidrogenasa todavía no identificada capaz de llevar a cabo la reacción y de la cual no se han podido encontrar mutantes (Figura 1.4.).

Adicionalmente se han sugerido la existencia de otra vías que podrían sintetizar una pequeña proporción del ABA presente en la planta y que explicaría la existencia de trazas de ABA en los mutantes nulos deficientes en ABA, por ejemplo mutantes nulos de ZEP de *Nicotiana plumbaginifolia* poseen todavía unos niveles de ABA entre el 23% y el 48% del ecotipo silvestre (Marin, E. et al., 1996). Estas rutas parecen que podrían estar activadas en algunos mutantes y ser una fuente alternativa de ABA en plantas silvestres. Por ejemplo, en los mutantes *flacca* y *sitiens* de tomate, mutantes que poseen bloqueado el paso de oxidación de aldehído abscísico a ABA, no se acumula el compuesto aldehído abscísico sino el compuestos alcohol abscísico. Asimismo, el aldehído abscísico exógeno aplicado en estos mutantes es convertido en alcohol abscísico, que después es oxidado a ABA para producir la mayor parte del ABA presente en estos mutantes (Rock, C. D. and Zeevaart, J. A., 1990). Sin embargo no se conocen los posibles genes implicados en esta ruta (Seo, M. and Koshiba, T., 2002) (Figura 1.4.).

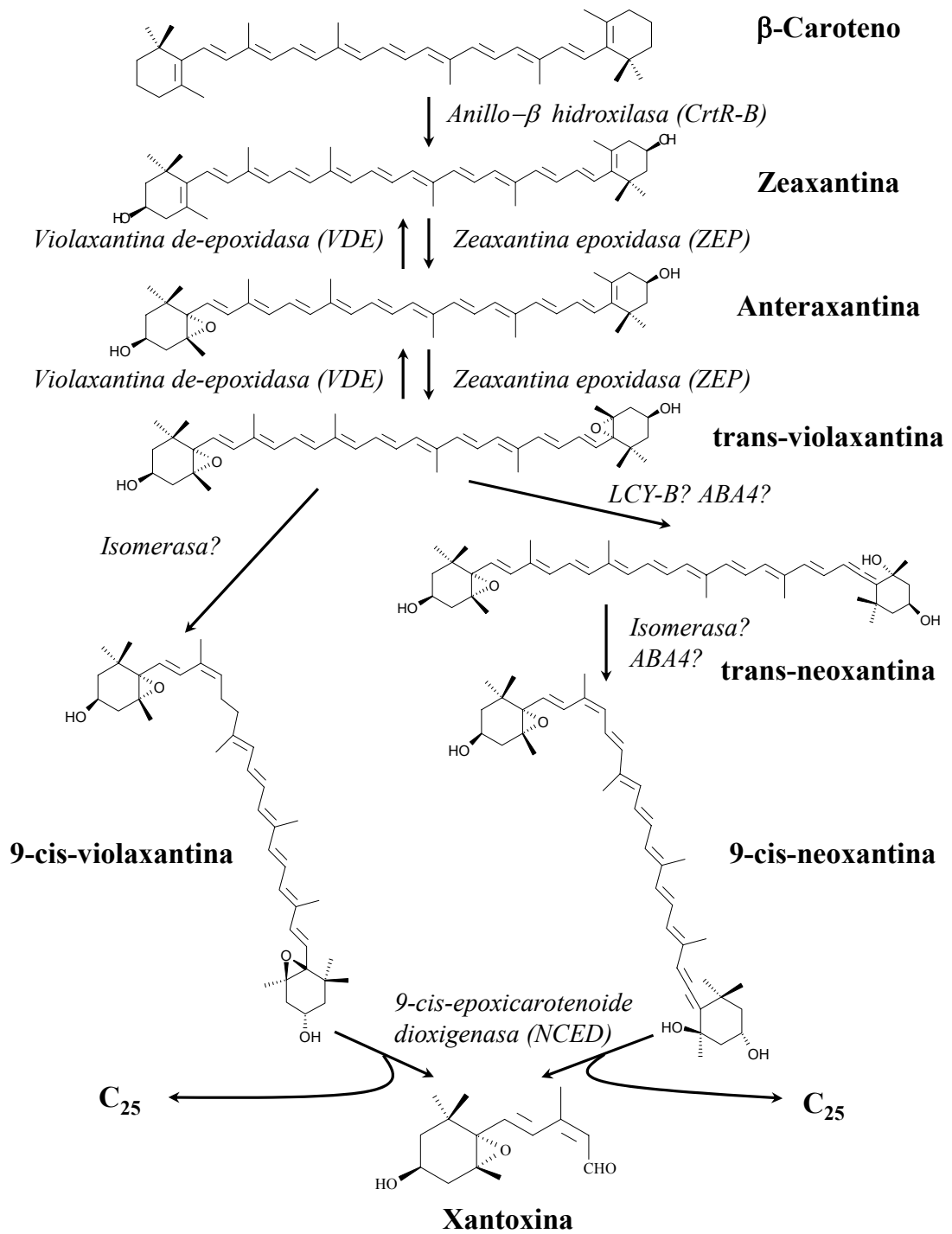


Figura 1.3. Formación y escisión de xantofilas en cloroplastos. Los enzimas están indicados en negrita. Los interrogantes indican que no se han confirmado o identificado las identidades de las enzimas implicadas *in vivo*.

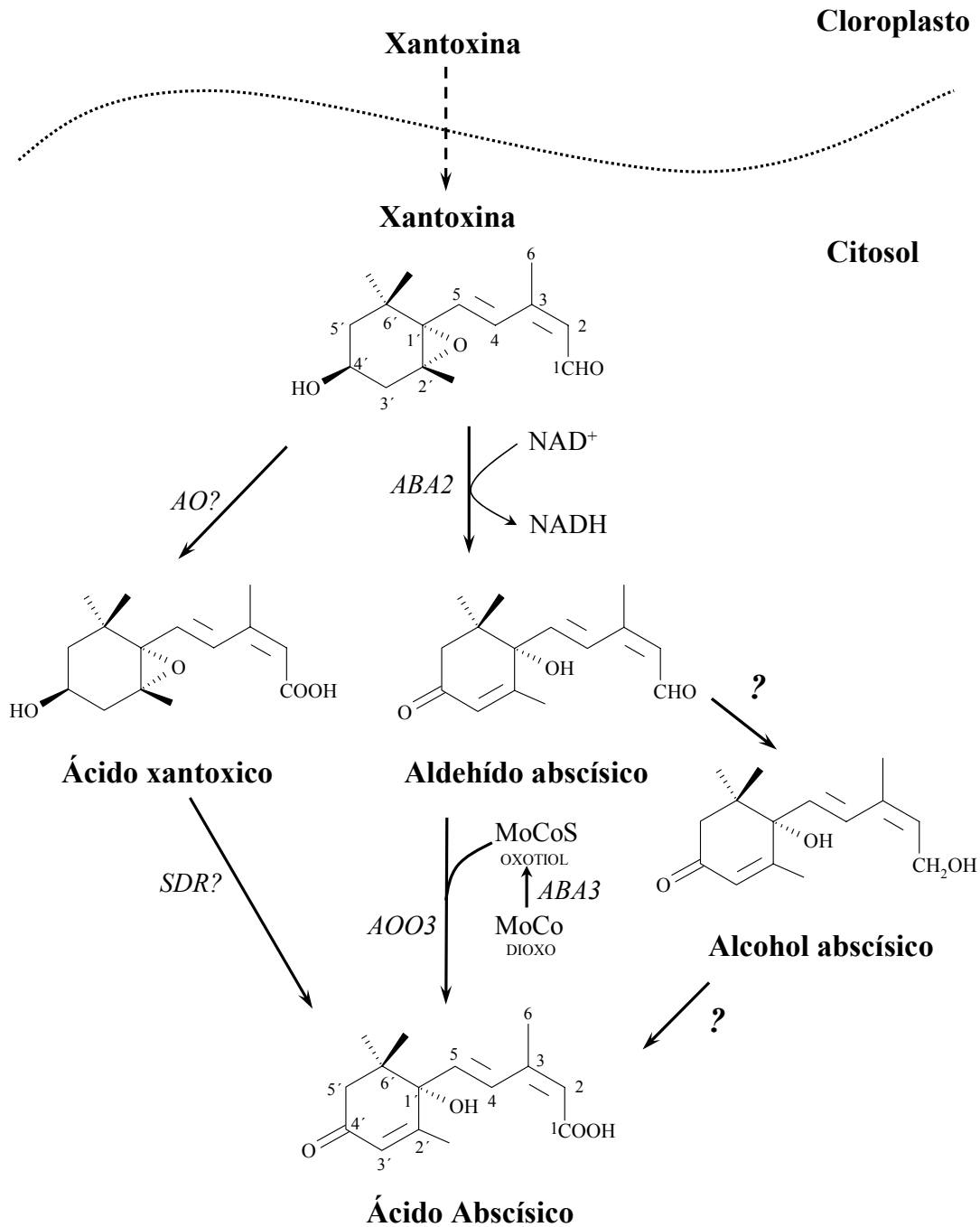


Figura 1.4. Últimos pasos de la ruta de biosíntesis de ABA: conversión de xantoxina a ABA en el citosol. Los enzimas están indicados en cursiva. Los interrogantes indican que no se han confirmado o identificado las identidades de las enzimas implicadas.

Catabolismo del ABA.

Como ya se ha mencionado, la actuación de la hormona ABA depende de los niveles de hormona activa presentes en los diferentes tejidos y células, niveles que son el resultado de la relación entre síntesis y catabolismo. En contraste con el amplio conocimiento de la ruta de biosíntesis de ABA, se conoce menos sobre las enzimas y genes implicados en el catabolismo del ABA así como de su regulación (Cutler, A. J. and Krochko, J. E., 1999; Kushiro, T. et al., 2004; Saito, S. et al., 2004).

Existen varias formas por las cuales el ABA puede ser trasladado o degradado en los tejidos de modo que se varíe la concentración de ABA activo en las células. La forma más sencilla consiste en sacar el ABA activo de la célula mediante transporte pasivo o mediante transportadores. Sin embargo, lo más normal es que el ABA sea metabolizado para proceder a su inactivación. Esta inactivación consiste en la modificación mediante diferentes reacciones de oxidación, reducción o conjugación con otros compuestos. La reacción de conjugación más habitual es la esterificación, formándose ésteres de glucosa-ABA. Los conjugados formados no poseen actividad biológica y no constituyen una reserva o forma de almacenamiento de ABA puesto que la conjugación es un proceso irreversible (Cutler, A. J. and Krochko, J. E., 1999).

En la mayoría de tejidos, la principal vía de catabolismo del ABA se inicia con una reacción de hidroxilación del átomo de carbono en posición 8' para obtener el compuesto 8'-hidroxi ABA (8'-OH ABA) catalizada por una citocromo P450 monooxigenasa (Krochko, J. E. et al., 1998; Kushiro, T. et al., 2004; Saito, S. et al., 2004). El compuesto 8'-OH ABA es altamente inestable y se transforma espontáneamente en el ácido fáséico (PA). El compuesto PA puede ser reducido en la posición 4' para obtener el ácido dihidrofáséico (DPA) mediante una reductasa, o bien metabolizado para obtener conjugados de ácido fáséico (Figura 1.5). Además el DPA puede ser también metabolizado para formar conjugados de DPA. No se conocen los genes que codifican las enzimas implicadas en esta vía, salvo para la actividad 8'-hidroxilasa. Gracias al proyecto de secuenciación de *A. thaliana* se identificaron todas las secuencias de genes que pertenecen a la familia de proteínas citocromos P450. El análisis funcional de las diversas subfamilias permitió identificar a la subfamilia CYP707A como una familia con posible actividad 8'-hidroxilasa. Además, esta subfamilia resultó estar muy cercana a otra subfamilia que

incluía las enzimas hidroxilasas del ácido ent-kaurenoico. El posterior análisis específico de las actividades enzimáticas de las proteínas recombinantes empleando ABA como sustrato permitió determinar que todas las proteínas recombinantes de la subfamilia CYP707A mostraban actividad 8'-ABA hidroxilasa y que la posterior conversión del compuesto 8'-OH ABA a PA era independiente de la presencia de la proteína recombinante, apoyando la hipótesis de la isomerización no enzimática de 8'-OH ABA a ácido fáséico. El análisis de la expresión de los distintos genes de esta subfamilia determinó que se expresan en todos los tejidos, aunque algunos se expresaban más que otros. Cuando se analizó la inducción de la expresión en hojas de roseta con tratamientos de ABA, estrés salino o manitol, se observó una fuerte inducción con ABA en todos los genes, y una inducción variable de los distintos genes frente a condiciones de estrés (Kushiro, T. et al., 2004; Saito, S. et al., 2004).

Una segunda vía de catabolismo tendría lugar al producirse la hidroxilación del carbono en posición 7' para obtener el compuesto 7'-OH ABA, aunque no se ha identificado la enzima que llevaría a cabo la reacción. Este compuesto posteriormente es metabolizado a otros compuestos, pero no se conocen exactamente cuales ni como se producen (Cutler, A. J. and Krochko, J. E., 1999).

Recientemente se ha descubierto una tercera vía de catabolismo de ABA. Durante el análisis de metabolitos derivados de ABA en extractos de semillas inmaduras y pericarpios se identificaron dos nuevos metabolitos derivados del ABA. Empleando ABA marcado radiactivamente en diferentes posiciones se determinaron las modificaciones existentes en los metabolitos, identificándose dos nuevos compuestos, el compuesto 9'-OH ABA y su producto cíclico que llamaron ácido neofáséico (neoPA). Sin embargo no pudieron determinar si esta reacción sería llevada a cabo por una citocromo P450 monooxigenasa diferente de la que realiza la hidroxilación del carbono 8' o bien la hidroxilación del carbono 9' sería una reacción lateral de la enzima ya descrita que realiza la hidroxilación en posición 8' (Zhou, R. et al., 2004).

Asimismo, se han identificado otros metabolitos de ABA producidos por otras vías todavía no determinadas como el trans-ABA, y los dos isómeros del ABA cis y trans-1'-4'-diol (Krochko, J. E. et al., 1998).

El análisis del catabolismo del ABA se ha completado analizando las actividades biológicas de todos los metabolitos de ABA identificados, obteniéndose que únicamente son hormonalmente inactivos los compuestos PA, DPA y los

conjugados de ABA. Los metabolitos hidroxilados, que son la mayoría de los metabolitos de ABA producidos, han mostrado una actividad hormonal significativa en los estudios en los que se ha comparado sus respectivas actividades con la actividad de la hormona ABA. Por ejemplo, el compuesto 9'-OH ABA ha mostrado una actividad del 10% comparada con la actividad mostrada por el ABA en ensayos de inhibición de la germinación de semillas de *A. thaliana*, pero en cambio se obtuvo mayor actividad para el metabolito 9'-OH ABA que la observada para la hormona ABA en el ensayo de actividad hormonal para la inducción de la expresión del gen 3-cetoacil CoA-sintasa, inducible por ABA (Zhou, R. et al., 2004). Estos datos de actividades hormonales sugieren la posibilidad de que los metabolitos hidroxilados de ABA puedan tener funciones en algunos o en todos los procesos en los que interviene el ABA.

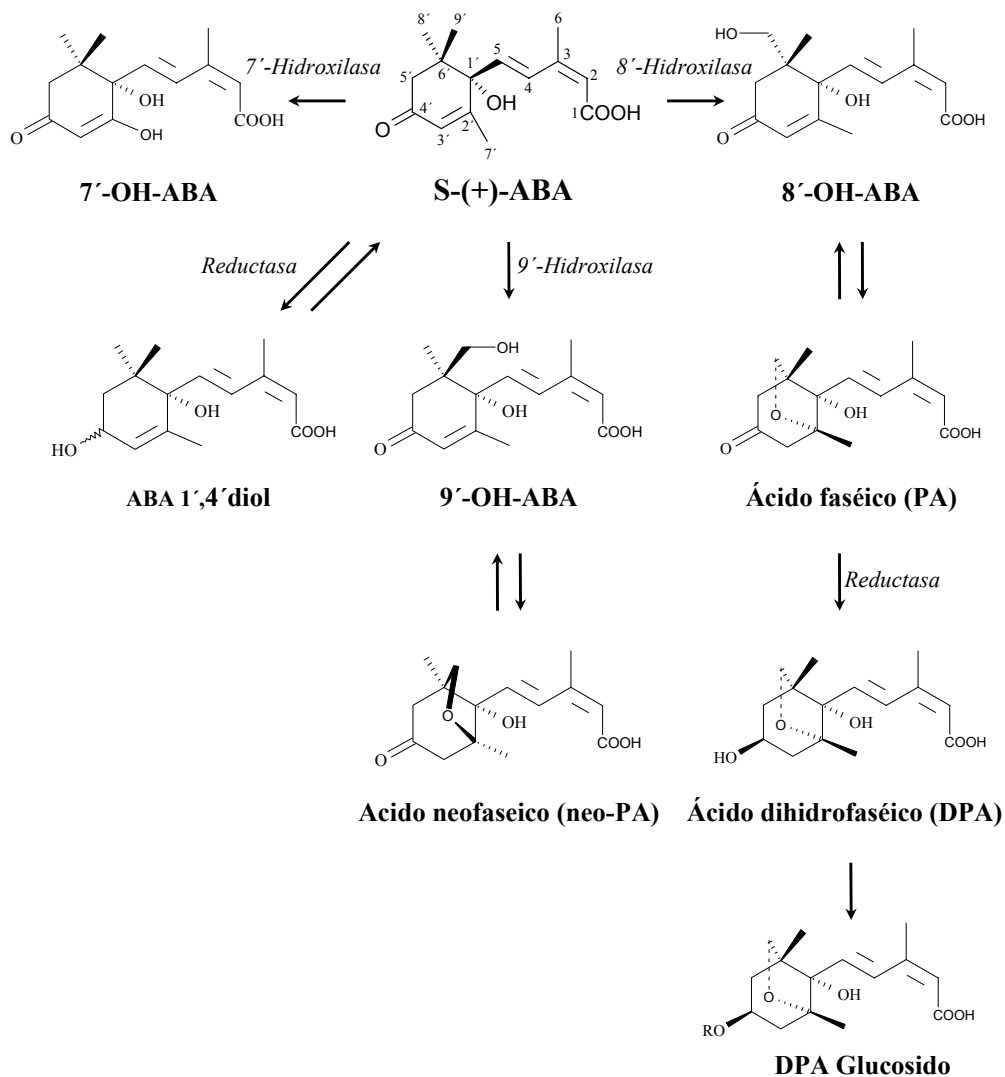


Figura 1.5. Rutas catabólicas del ABA y actividades implicadas en ellas.

Regulación de la biosíntesis y el catabolismo.

Como ya se ha mencionado, los niveles de ABA activo son dinámicos y determinados por la relación entre la biosíntesis y el catabolismo de la hormona. Así que conocer los factores que regulan ambos procesos permitiría controlar los niveles de ABA activo. Algunos datos indican que la velocidad de formación de carotenoides no afecta a la velocidad de formación de ABA (Hable, W. E. et al., 1998). No obstante, estudios recientes sugieren una posible unión entre los primeros y últimos pasos de la biosíntesis de ABA, concretamente que la formación del compuesto DXP puede contribuir, al menos en parte, a la regulación de la biosíntesis en plantas (Estevez, J. M. et al., 2001). En cuanto al catabolismo, parece que existe un mecanismo de retroalimentación negativa ya que la actividad 8'-ABA hidroxilasa es estimulada por ABA exógeno (Cutler, A. J. and Krochko, J. E., 1999). Así el ABA puede restringir su acumulación mediante la activación de su degradación, al menos en condiciones sin estrés (Qin, X. and Zeevaart, J. A., 2002).

En cuanto a la regulación de los genes de biosíntesis de ABA, se posee un mayor conocimiento derivado principalmente del estudio de los mutantes de biosíntesis y de las enzimas codificadas por estos genes (Seo, M. and Koshiba, T., 2002, Xiong, L. and Zhu, J. K., 2003).

Enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP).

Pese a que durante la deshidratación ocurre un drástico incremento de los niveles de ABA, la expresión del gen que codifica la enzima ZEP no está relacionado con los niveles de ABA presente en las hojas, ya que la transcripción del gen no es inducida por estrés hídrico (Audran, C. et al., 1998; Thompson, A. J. et al., 2000a). En cambio en raíces sí se produce la inducción de la transcripción del gen por estrés osmótico (Audran, C. et al., 2001; Xiong, L. et al., 2001b) y ABA (Xiong, L. et al., 2001b). En hojas de *Nicotiana plumbaginifolia* y en tomate la expresión del gen está influenciada también por las funciones diurnas y controlada por el ritmo circadiano (Audran, C. et al., 2001; Xiong, L. et al., 2001b). Este control tiene relación con el papel de las xantofilas en la protección del aparato fotosintético del daño foto-oxidativo (Niyogi, K. K. et al., 1997; Niyogi, K. K. et al., 1998). En condiciones de baja luz, la enzima ZEP convierte la xantofila zeaxantina a violaxantina, mientras que en condiciones de alta luz, la violaxantina es convertida en zeaxantina por la enzima violaxantina de-epoxidasa (VDE) (Figura 1.3.). Sin embargo, dado que las

hojas poseen unos elevados contenidos de xantofilas, la fluctuación diurna de la expresión de ZEP y las cantidades de cada xantofila no son limitantes en la biosíntesis de ABA en hojas (revisado en Seo, M. and Koshiba, T., 2002).

En semillas, la expresión del gen es detectada durante la embriogénesis, justo antes del primer pico de ABA de la semilla en desarrollo (Audran, C. et al., 1998; Audran, C. et al., 2001), correlacionándose muy bien la expresión del gen con los niveles de ABA endógeno durante el desarrollo de la semilla (Audran, C. et al., 1998). Asimismo, plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresaban el gen que codifica la enzima ZEP acumulaban ABA en semillas, mostrando una mayor latencia (Frey, A. et al., 1999). Estos datos sugieren una posible función reguladora del gen que codifica la enzima ZEP en la biosíntesis de ABA en semillas (Audran, C. et al., 1998; Frey, A. et al., 1999).

Enzima 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED).

La existencia de una familia de genes NCED con capacidad de catalizar la rotura oxidativa del doble enlace 11,12 de los 9-cis-epoxicarotenoides indica un papel crucial de estos genes en la regulación la biosíntesis de ABA. Así, la expresión diferencial de los genes puede controlar la ruta de biosíntesis en respuesta a diferentes estímulos ambientales o necesidades de desarrollo y puede permitir la regulación de la síntesis de ABA en diferentes órganos y tejidos (Iuchi, S. et al., 2000; Iuchi, S. et al., 2001; Thompson, A. J. et al., 2000b; Tan, B. C. et al., 2003).

Recientemente se ha descrito el patrón de expresión de la familia de genes NCED en *A. thaliana* empleando la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real y el análisis de promotores unidos a genes chivatos (Tan, B. C. et al., 2003). Este estudio mostró que uno de los genes, el gen AtNCED3, es el único inducible por deshidratación en *A. thaliana*, aunque no se induce su expresión por ABA. Este gen se expresa en las raíces, células de periciclo, flores y en anteras y semillas en desarrollo. Además, el RNA mensajero del gen AtNCED3 es el mayoritario de los genes NCED en hojas y tallos de inflorescencias. También se detectó expresión en las células oclusivas estomáticas y en cotiledones y pecíolos, y en regiones del tallo. El hecho de que no sea inducido por ABA indica que no existiría la regulación positiva del ABA en el gen NCED como ocurre con otros genes de la biosíntesis, aunque parece ser que el ABA es requerido para una completa inducción del gen AtNCED3 de *A. thaliana* por estrés osmótico (Xiong, L. et al., 2002a) y que el gen

puede ser inducido por ABA en determinados fondos genéticos (Xiong, L. and Zhu, J. K., 2003). El estudio de varias líneas transgénicas con el transgen AtNCED3 y de un mutante nulo del gen mostraron que la variación de la expresión del gen AtNCED3 es suficiente para modificar los niveles de ABA endógenos (Iuchi, S. et al., 2001).

El análisis detallado de la expresión del gen VP14 en hojas de maíz durante estrés hídrico muestra una clara correlación entre los niveles de RNA mensajero del gen y los niveles de ABA en hojas deshidratadas, mostrando claramente un aumento de la transcripción del gen en respuesta al estrés hídrico (Tan, B. C. et al., 1997), al igual que diferentes genes NCED en otras especies (Burbidge, A. et al., 1997; Qin, X. and Zeevaart, J. A., 1999; Iuchi, S. et al., 2000; Chernys, J. T. and Zeevaart, J. A., 2000). Estos datos ponen de manifiesto el papel regulador desempeñado por el gen NCED en la biosíntesis de ABA en hojas, siendo una de las piezas claves en la regulación de la biosíntesis de ABA (Tan, B. C. et al., 1997 ;Tan, B. C. et al., 2001). En general, el aumento de la transcripción del gen debido al tratamiento de estrés se produce en aproximadamente 15-30 minutos, indicando que la inducción del gen es bastante rápida (Qin, X. and Zeevaart, J. A., 1999; Thompson, A. J. et al., 2000b). Además se correlaciona muy bien el aumento de los niveles de RNA mensajero con los niveles de proteína (Qin, X. and Zeevaart, J. A., 1999). Sorprendentemente, también se han observado fluctuaciones diurnas del gen LeNCED1 en hojas de tomate (Thompson, A. J. et al., 2000b). Sin embargo, el pico de expresión del gen NCED tiene lugar al final del periodo de luz, mientras que el pico de expresión del gen ZEP ocurre a la mitad del periodo de luz, indicando la existencia de sistemas de regulación diferentes para cada gen, que resulta en diferentes ritmos diurnos.

Diversos resultados indican que el gen NCED puede jugar también un papel muy importante en la síntesis de ABA durante el desarrollo de la semilla. En especial, el experimento que muestra que la sobreexpresión del gen LeNCED1 en tomate produce un aumento de la latencia de las semillas (Thompson, A. J. et al., 2000b).

También hay que considerar que la enzima NCED debe localizarse en la membrana de los tilacoides para interactuar con su sustrato, habiéndose determinado dos posibles localizaciones de la proteína. La enzima PvNCED de guisante se localiza en la fracción insoluble del cloroplasto mientras que la enzima VP14 de maíz se localiza en dos fracciones del cloroplasto, una forma soluble en el

estroma y otra forma insoluble en la membrana del tilacoide. La localización de la enzima VP14 dentro de los cloroplastos puede estar controlada, lo cual a su vez puede contribuir a la regulación de la biosíntesis de ABA. En *A. thaliana* existen al menos dos isoformas de la enzima NCED; una que se localiza solo en la membrana del tilacoide, y otra que se localiza tanto en la membrana como en el estroma del tilacoide. Así, es posible que las isoformas de NCED posean funciones fisiológicas distintas y que estén sujetas a diferentes mecanismos reguladores post-transcripcionales (Tan, B. C. et al., 2001).

Enzima ABA2.

El gen ABA2 posee una baja expresión en todos los tejidos de la planta analizados y su expresión no está inducida por ABA ni estrés osmótico y salino (Gonzalez-Guzman, M. et al., 2002; Cheng, W. H. et al., 2002), aunque sí por glucosa (Cheng, W. H. et al., 2002), indicando que la expresión de ABA2 es importante en la respuesta al azúcar. Esto es consistente con que la mayoría de mutantes deficientes de ABA aislados en rastreos de respuesta al azúcar son mutantes del gen ABA2 (Leon, P. and Sheen, J., 2003). La señal de azúcar modula procesos importantes en las plantas superiores como son la germinación, el crecimiento de la plántula, desarrollo de la hoja y de la raíz y la senescencia (Smeekens, S., 2000; Leon, P. and Sheen, J., 2003). Los niveles de ABA aumentan en las plántulas tratadas con azúcar, sugiriendo que la regulación de la síntesis de ABA juega un papel importante en las respuestas de la planta al azúcar (Arenas-Huertero, F. et al., 2000). La función fisiológica de la síntesis de ABA regulada por azúcar se ha discutido en relación con la síntesis de almidón durante el desarrollo temprano de la semilla (Rook, F. et al., 2001). Así, durante el desarrollo de la semilla, el cambio en los niveles de azúcares de las semillas en maduración pueden modular la biosíntesis de ABA y por tanto el desarrollo de la semilla.

Asimismo, otro dato importante en la regulación de ABA2 es la expresión localizada del gen en el tejido vascular (Cheng, W. H. et al., 2002).

Enzima aldehído abscísico oxidasa3 (AAO3).

Existen diferentes isoformas de la actividad aldehído oxidasa (AO) en las plantas, todas ellas formadas por dos subunidades. Las isoformas AO exhiben diferentes preferencias de sustrato y están distribuidas diferencialmente en los tejidos

y órganos (Seo, M. et al., 2000a; Akaba, S. et al., 1999), siendo únicamente la isoforma AO δ , formada por dos subunidades iguales codificadas por el gen AAO3, capaz de catalizar la oxidación del aldehído abscísico a ABA (Seo, M. et al., 2000a). El análisis de la expresión del gen AAO3 muestra que los niveles de RNA mensajero aumentan rápidamente en hojas de roseta sometidas a estrés hídrico, aunque el aumento en los niveles del RNA mensajero no provoca un aumento en los niveles de proteína AAO3 (Seo, M. et al., 2000b). También se ha descrito la inducción de la expresión del gen por ABA y azúcar en el ecotipo silvestre *La-er* (Cheng, W. H. et al., 2002).

Asimismo, todas las isoformas AO requieren la presencia de un cofactor de Molibdeno (MoCo) para su actividad. Así, la disponibilidad de este cofactor puede contribuir a la regulación de su actividad, hipótesis corroborada por la observación que la expresión del gen ABA3, que codifica una MoCo sulfurasa (MCSU), es inducida por deshidratación y ABA (Bittner, F. et al., 2001; Xiong, L. et al., 2001b).

Además un reciente estudio confirma la expresión localizada del gen AAO3 en raíces secundarias, en las células oclusivas de los estomas y en tejido vascular, concretamente en las células del parénquima del xilema y en las células acompañantes del floema (Koiwai, H. et al., 2004).

Señales implicadas en la regulación de la biosíntesis de ABA.

Determinadas señales ambientales como la luz, el estrés salino y la sequía han sido conocidas como controladoras de la biosíntesis de ABA. Principalmente el estrés salino y la sequía inducen la síntesis de ABA mediante la regulación de los genes de biosíntesis empleando factores de transcripción (Xiong, L. and Zhu, J. K., 2001; Xiong, L. and Zhu, J. K., 2003).

Evidencias experimentales implican a los azúcares, al estrés osmótico y al ABA como señales que activan la biosíntesis de ABA en las semillas en desarrollo. Los genes que codifican las enzimas ZEP, ABA2, AAO3, y MCSU son inducidos por azúcares (Cheng, W. H. et al., 2002). La sacarosa puede regular la biosíntesis de ABA en el embrión, y en el caso de ABA2, esta regulación puede ser muy importante puesto que no es inducido ni por estrés osmótico ni por ABA (Cheng, W. H. et al., 2002). La inducción de la biosíntesis de ABA por estrés osmótico podría ser más importante en la fase de maduración del embrión, cuando se produce la adquisición de la tolerancia a la desecación y la latencia de la semilla. Asimismo, los

genes ZEP, AAO3 y ABA3 están regulados por ABA y estrés osmótico, de modo que el ABA exógeno aumenta significativamente su expresión (Xiong, L. et al., 2001a; Xiong, L. et al., 2001b; Xiong, L. et al., 2002a). Tomando todos los datos conjuntamente, surge la posibilidad de una regulación de la biosíntesis de ABA por ABA mediante retroalimentación positiva. Existen determinados componentes que pueden mediar en la auto-regulación del ABA. Uno de ellos sería SAD1 (supersensitive to ABA and drought 1), cuya mutación recesiva confiere hipersensibilidad al ABA en la germinación, crecimiento vegetativo y expresión génica. La caracterización del mutante mostró que el mutante tiene bloqueada la regulación por ABA de los genes AAO3 y MSCU (Xiong, L. et al., 2001a). La proteína SAD1 y otras proteínas “Sm-like” parecen estar implicadas en el procesamiento, exportación y degradación del RNA mensajero y pueden regular la relación del recambio de los transcritos de los componentes de la señalización del ABA, como por ejemplo el gen ABI1 ya que su inducción esta bloqueada en el mutante *sad1* (Xiong, L. et al., 2001a).

En hojas de roseta parece claro que el paso crucial de la biosíntesis de ABA es la rotura oxidativa del 9-cis-epoxicarotenoide catalizado por la enzima NCED. Consistente con esta función, la sobreexpresión constitutiva o inducible de algunos de los genes NCED produce un aumento de los niveles de ABA y la reducción de la pérdida de agua por transpiración (Iuchi, S. et al., 2001; Qin, X. and Zeevaart, J. A., 2002; Thompson, A. J. et al., 2000b). Sin embargo, la sobreexpresión del gen ZEP de *A. thaliana* resulta en un aumento de la inducción del gen por estrés en semillas (Xiong, L. et al., 2002a), y produce un aumento de la latencia de las semillas y retraso de la germinación en tabaco (Frey, A. et al., 1999), presumiblemente como resultado del aumento de la biosíntesis de ABA. Así, la reacción catalizada por la enzima ZEP podría ser el paso crucial de la biosíntesis de ABA en tejidos no fotosintéticos como semilla y raíces, poniendo de manifiesto la compleja regulación de la biosíntesis de ABA.

Obviamente la regulación precisa de la biosíntesis de ABA es muy importante para el control de los niveles de ABA que modulan las respuestas a estrés y los programas de desarrollo. Evidencias indirectas sugieren que las vías de señalización para la inducción de la biosíntesis de ABA por estrés puede implicar señales redox, señalización por Ca^{2+} , y eventos de fosforilación y defosforilación de proteínas. Sin embargo, poco se conoce al respecto y todavía no están identificados los elementos

cis de los genes de biosíntesis implicados en la regulación. Además, los análisis genéticos han puesto en evidencia las relaciones existentes entre el ABA, el etileno, los azúcares, los brasinoesteroides y otras señales en la germinación de las semillas y otros procesos fisiológicos. Esta relación plantea la posibilidad de que algunos de los componentes de señalización ya descritos en otras vías de señalización estén también implicados en la regulación de la biosíntesis de ABA. Un ejemplo podría ser el *locus* ERA3 (“enhanced response to ABA” 3)/EIN2 (“ethylene insensitive” 2). Las plantas mutantes *era3/ein2* poseen unos niveles de ABA dos veces mayores que el ecotipo silvestre, seguramente debido a que existe una mayor transcripción del gen ZEP en el mutante (Ghassemian, M. et al., 2000). No obstante, el efecto de la mutación *era3/ein2* en la biosíntesis de ABA puede ser consecuencia de una interacción compleja entre las diferentes hormonas más que una regulación específica de la biosíntesis de ABA.

Para identificar componentes de la ruta de regulación de la biosíntesis de ABA son necesarios rastreos genéticos basados en respuestas más específicas y que puedan ser visualizados de forma más sensible. Existen varias posibilidades, como el empleo de las células oclusivas en las que se visualiza el intercambio gaseoso (Merlot, S. et al., 2002; Mustilli, A. C. et al., 2002) y el empleo de fusiones génicas de los promotores de los genes de biosíntesis con genes *chivato*. Además, el empleo de la genética reversa proporciona otra aproximación para identificar nuevos componentes.

1.4. Movimiento del ABA.

No se conoce demasiado sobre la distribución y movimiento del ABA en la planta. Debido a su naturaleza de ácido débil, el ABA tiende a acumularse pasivamente en las células. Este fenómeno de transporte pasivo se debe a que el ABA se encuentra en su forma protonada en el apoplasto ligeramente ácido. Este ABA en forma protonada es lipofílico y puede pasar la membrana plasmática hacia el citosol. Sin embargo, en el citosol con pH neutral, el ABA es ionizado y se vuelve hidrofílico, con lo cual es difícil que pueda salir de las células. Esto implica que debe existir un transporte activo del ABA mediado por transportadores similar al que existe para el IAA. Además, el pH puede influir en la distribución del ABA en la célula.

Diversos ensayos con ABA marcado radiactivamente han concluido que el ABA se puede mover desde las hojas maduras al resto de la planta, incluido las semillas en desarrollo y que el ABA se transporta desde las raíces sometidas a estrés hacia las hojas a través de la savia xilemática desde las raíces hasta los brotes como señal del estrés hídrico (Rock, C. D. and Zeevaart, J. A., 1993; Hartung, W. et al., 2002). No obstante, datos obtenidos recientemente sugieren la movilización dinámica de los precursores del ABA. Diferentes ensayos de localización de las proteínas codificadas por los genes ABA2 y AAO3, últimos pasos de la ruta de biosíntesis de ABA, muestran que estas proteínas se localizan en tejido vascular (Cheng, W. H. et al., 2002; Koiwai, H. et al., 2004). Así parece ser que el sistema vascular posee una función importante en la producción del ABA y movilización del ABA hacia sus dianas funcionales en *A. thaliana*. Además, el patrón de expresión del gen ABA2 parece ser diferente del patrón para los genes ZEP y ABA3, sugiriendo la hipótesis que el transporte inter-órganos, inter-celular e inter-organelos de ABA y de sus precursores es requerido para la salida en el sitio donde llevara a cabo su función fisiológica. En cambio, existe una elevada expresión del gen AAO3 en el tejido vascular de raíces y se ha detectado expresión en las células oclusivas, de modo que el gen sería expresado en lugares donde el ABA va a realizar su función. Estos datos sugieren que los últimos pasos de la ruta de biosíntesis tendrían lugar en la regiones del haz vascular, de modo que el transporte y distribución del ABA a través de la planta constituiría un factor muy importante en la regulación de diferentes procesos fisiológicos por ABA.

1.5. Elementos de señalización del ABA.

El ABA regula importantes eventos del crecimiento vegetativo y reproductivo de las plantas, desde procesos con efectos lentos, como puede ser la adquisición de la tolerancia a la sequía, a efectos realmente rápidos como el cierre de los estomas. Así la existencia de diferentes respuestas fisiológicas controladas por ABA (rápidas y lentas) indican que existen múltiples mecanismos de acción del ABA, con algunos elementos comunes que afectan a ambos tipos de respuestas (revisado en Rock, C. D., 2000; Finkelstein, R. R. and Rock, C. D., 2002). Además, el análisis de los mecanismos de la respuesta ABA resultan complicados debido a que existen diferencias según el estadio de desarrollo o el tejido de la planta, resultando que

determinados componentes pueden actuar como reguladores negativos o positivos dependiendo de donde se exprese. Asimismo, se han identificado mutantes de respuesta a ABA en rastreos para identificar mutantes de respuesta a otras hormonas como giberelinas, citoquininas y auxinas. También se ha demostrado la existencia de interacciones entre las señalizaciones por ABA y etileno, brasinoesteroides, luz o azúcares, lo que pone de manifiesto el cruce entre diferentes rutas de respuesta y como algunos de los elementos de señalización actúan en varias rutas de respuesta. Todo esto hace pensar que algunos de los elementos de señalización actúan como nodos o como componentes de una red de señalización compleja (revisado en Rock, C. D., 2000; Finkelstein, R. R. and Rock, C. D., 2002).

Se han empleado tres estrategias diferentes para identificar los componentes de la respuesta a ABA: genética, bioquímica y farmacológica/celular. Se han realizado multitud de rastreos genéticos que han permitido aislar mutantes con defectos en la respuesta a ABA. Estos rastreos incluyen la producción de semillas sin latencia (Koorneef, M. et al., 1982), alteración del desarrollo embrionario (Meinke, D. W. et al., 1994), pérdida o ganancia de sensibilidad al ABA en germinación (Koorneef, M. et al., 1984; Finkelstein, R. R., 1994; Cutler, S. et al., 1996), crecimiento de la plántula (Lopez-Molina, L. and Chua, N. H., 2000), crecimiento de la raíz (Himmelbach, A. et al., 1998), diferente expresión de un gen chivato (Ishitani, M. et al., 1997; Foster, R. and Chua, N. H., 1999), incremento de la transpiración en la hoja (Raskin, I and Ladyman, J. A. R., 1988; Merlot, S. et al., 2002). Además se han aislado mutantes con defectos en respuesta a múltiples señales, incluyendo el ABA, basados en rastreos con condiciones como salinidad (Quesada, V. et al., 2000), azúcar (Arenas-Huertero, F. et al., 2000), o resistencia a otras fitohormonas como auxinas, brasinoesteroides o etileno (Wilson, A. K. et al., 1990; Alonso, J. M. et al., 1999; Li, J. et al., 2001). Como resultado se han identificado más de 50 *loci* que afectan la acción del ABA (revisado en Rock, C. D., 2000; Finkelstein, R. R. and Rock, C. D., 2002; Himmelbach, A. et al., 2003). Estos *loci* codifican factores de transcripción, proteínas fosfatasa o kinasas, proteínas de unión a RNA o que intervienen en el procesamiento del RNA mensajero, enzimas con actividad farnesil transferasa, enzimas del metabolismo de los fosfolípidos y proteínas de unión a GTP (guanina trifosfato). No obstante, ninguno de los elementos definidos genéticamente es necesario para todas las respuestas del ABA, indicando nuevamente la existencia de múltiples mecanismos de percepción y señalización del ABA.

Percepción del ABA.

Al contrario que con otras fitohormonas, la aproximación genética no ha permitido aislar mutantes del receptor de ABA. Con la excepción de una referencia sin confirmar (Hornberg, C. and Weiler, E., 1984), todavía no se ha descrito ningún receptor para el ABA. Sin embargo, existen evidencias indirectas sobre la existencia de receptores tanto intracelulares como extracelulares de ABA. Estas han sido obtenidas principalmente de estudios sobre el mecanismo de acción del ABA en las células estomáticas empleando ABA y conjugados de proteína-ABA (Schwartz, A. et al., 1994; Allan, A. C. et al., 1994; Jeannette, E. et al., 1999; Hamilton, D. W. et al., 2000). Adicionalmente, varios estudios moleculares han permitido describir varias proteínas intra y extracelulares capaces de unirse a ABA y conjugados de proteína-ABA (Pedron, J. et al., 1998; Kasuga, M. et al., 1999; Zhang, D. P. et al., 2001; Zhang, D. P. et al., 2002), aunque no existen evidencias que unan a estas proteínas con los efectos fisiológicos del ABA. Por otra parte, el empleo de análogos del ABA en bioensayos de germinación y expresión génica han sugerido la existencia de múltiples receptores de ABA con diferentes requerimientos estructurales para su actividad en diferentes vías de respuesta (Walker-Simmons, M. K. et al., 1997; Kim, B. T. et al., 1999). Recientemente se ha realizado un rastreo empleando ambos estereoisómeros del ABA y se han encontrado mutantes con diferente respuesta a ambos, indicando que pueden existir diferentes mecanismos de reconocimiento del ABA (Nambara, E. et al., 2002).

Asimismo se ha confirmado mediante el empleo de anticuerpos y fracciones enriquecidas de membranas la existencia de un sistema receptor de ABA y otros elementos (por ejemplo, glicoproteínas) unidos por una ruta de proteínas G que activan la fosfolipasa D (PLD) en la membrana plasmática (Wang, M. et al., 1995; Desikan, R. et al., 1999; Ritchie, S. and Gilroy, S., 2000). Además, el ABA es capaz de regular las actividades de los canales iónicos de la membrana plasmática y del tonoplasto de forma muy rápida (Assmann, S. M. and Shimazaki, Ki, 1999), siendo posible que el ABA interaccione directamente con estas proteínas de transporte.

Primeros pasos de señalización por ABA.

Se han descrito varios elementos encargados de los eventos más tempranos de la señalización. Algunos de ellos pertenecen a grandes familias que intervienen en

diferentes procesos de señalización, postulándose que se conseguiría la especificidad de señal mediante el empleo especializado de diferentes miembros.

En el caso de las proteínas heterotriméricas G, *A. thaliana* posee solo una o dos isoformas de cada subunidad. Recientes estudios muestran que la pérdida de función del gen GPA1, que codifica una isoforma de la subunidad G α , rompe aspectos de la señalización de auxinas, giberelinas, brasinoesteroides y ABA, indicando que este componente no es fuente de especificidad en la señalización. El mutante nulo *gpa1-1* muestra insensibilidad a la inhibición por ABA de la apertura estomática (Wang, X. Q. et al., 2001) y en ensayos de germinación exhibe hipersensibilidad al ABA, a los azúcares, hiposensibilidad al ácido giberélico e insensibilidad al brasinólido (Ullah, H. et al., 2001; Ullah, H. et al., 2002; Lapik, Y. R. and Kaufman, L. S., 2003). En cambio, los mutantes en la subunidad G β , codificada por el gen AGB1, muestran un aumento del número de primordios laterales de la raíz, alteración en la forma de la hoja y flor y una silicuas más cortas (Lease, K. A. et al., 2001; Ullah, H. et al., 2003). Recientemente también se ha conseguido identificar el gen GCR1 que codifica un hipotético receptor acoplado a proteínas G. Diversos análisis de interacción han confirmado que las proteínas GCR1 y GPA1 interaccionan *in vitro* e *in vivo*, siendo muy importante para esta interacción el extremo C-terminal (Pandey, S. and Assmann, S. M., 2004). Plantas de tabaco que sobreexpresan el gen GCR1 muestran una floración acelerada, y una reducida latencia de las semillas (Colucci, G. et al., 2002), y mutantes nulos del gen muestran hipersensibilidad al ABA en ensayos de crecimiento de raíz y una cinética de pérdida de agua más lenta que el ecotipo silvestre. Estos mutantes *gcr1* mostraron además una mayor tolerancia y una mejor recuperación después de un choque de estrés por sequía. Sin embargo, los niveles de ABA eran similares al ecotipo silvestre, lo que indicaba que el gen estaría implicado en la ruta de señalización de ABA (Pandey, S. and Assmann, S. M., 2004)

En cambio, las proteínas monoméricas ROPs (Rho/rac-related GTPases of plants) son una clase de GTPasas de la superfamilia RAS de la que hay descritas 11 miembros específicas de plantas que actúan como interruptores moleculares. La proteína ROP10 regula negativamente el cierre estomático mediado por ABA, la germinación y la inhibición del crecimiento (Zheng, Z. L. et al., 2002). El reclutamiento de la proteína ROP10 a la membrana requiere la presencia de un sitio de farnesilación funcional, lo cual permite apoyar el papel como regulador negativo de la respuesta a ABA de la subunidad β de la farnesil transferasa (ERA1). Otras dos

proteínas ROP2 y ROP6 contienen un posible motivo de unión de la molécula geranylgeranyl, y plantas mutantes con las formas activas muestran que son moduladores negativos de la respuesta a ABA. De todas formas, su función se asocia con la reorganización del citoesqueleto de actina y el transporte de vesículas, necesarios para el cierre estomático (Lemichez, E. et al., 2001; Yang, Z., 2002). Los defectos pleiotrópicos en las plantas mutantes *rop* analizadas sugieren que la especificidad de la respuesta de las proteínas ROP puede depender de la interacción con activadores específicos y dianas, así como de la especialización de función entre las proteínas G monoméricas.

Asimismo parecen estar implicados en la señalización de ABA como mensajeros secundarios y posibles efectores de proteínas G, el inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) y el ácido fosfatídico (PA), producido por la fosfolipasa C (PLC) y fosfolipasa D (PLD) respectivamente (Gilroy, S. et al., 1990; Jacob, T. et al., 1999; Ritchie, S. and Gilroy, S., 1998; Gampala, S. S. et al., 2001). La inhibición de la expresión de la enzima PLC en las células oclusivas de plantas de tabaco transgénico produce un bloqueo de la respuesta a ABA, tanto de la inducción del cierre como de la inhibición de la apertura de los estomas (Hunt, L. et al., 2003). De los 6 genes PLC que posee *A. thaliana*, solo la expresión del gen AtPLC1 es inducida por ABA (Hirayama, T. et al., 1995), aunque el análisis mediante genética reversa mostró que el gen AtPLC1 era necesario pero no suficiente para los efectos del ABA en la germinación, crecimiento y expresión de genes (Sanchez, J. P. and Chua, N. H., 2001). Además, la identificación del mutante *fryl* con un defecto en el metabolismo de los fosfoinositoles (posee inactivada una proteína inositol polifosfato 1-fosfatasa clonada anteriormente como SAL1; Quintero, F. J. et al., 1996), recalcó el papel de los fosfoinositoles como mensajeros secundarios en la señalización por ABA del estrés abiótico (Xiong, L. et al., 2001c). También la molécula esfingosina 1-fosfato (1-SP) ha sido implicada en la señalización de ABA por estrés de sequía en el cierre estomático (Ng, C. K. et al., 2001), requiriendo la proteína GPA1 para su acción (Coursol, S. et al., 2003).

Estudios con microsomas de células de la aleurona de cebada han demostrado que la estimulación de la actividad de PLD esta mediada por la actividad de proteína G precedida de la percepción del ABA en la membrana plasmática (Ritchie, S. and Gilroy, S., 2000). Hay 5 subfamilias de PLD en *A. thaliana* con 11 genes, muchos de los cuales son inducidos por varios estreses (Wang, X. et al., 2000) y muestran

diferente distribución en tejidos y localización subcelular. Sin embargo, el gen PLD α es el único miembro de la familia cuya expresión y actividad es incrementada por ABA (Fan, L. et al., 1999). Además, la supresión por RNA antisentido de este gen ralentiza la senescencia promovida por etileno y ABA en hojas cortadas de *A. thaliana* (Fan, L. et al., 1997) e inhibe el cierre de estomas en respuesta a estrés (Sang, Y. et al., 2001), lo que indica un papel en la señalización de ABA.

El cierre estomático está relacionado con un incremento del Ca²⁺ citosólico. No obstante el Ca²⁺ interviene en otros procesos de señalización por otras fitohormonas como auxinas y es empleado como mensajero intracelular por otros mensajeros secundarios, indicando que la especificidad de respuesta puede ser debida a las frecuencias de oscilación, a las amplitudes de esa oscilación o a la localización del Ca²⁺ (Allen, G. J. et al., 2000; Allen, G. J. et al., 2001; Schroeder, J. I. et al., 2001; Klusener, B. et al., 2002). Las moléculas inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) y ADP-ribosa cíclica (cADPR) pueden inducir la liberación de Ca²⁺ desde los almacenes celulares (Gilroy, S. et al., 1990; Leckie, C. P. et al., 1998). Otros estudios han mostrado que ABA estimula la síntesis de óxido nítrico (NO) y H₂O₂ en las células oclusivas (García-Mata, C. and Lamattina, L., 2002; Neill, S. J. et al., 2002) siendo el cierre de los estomas por NO dependiente de cADPR (Neill, S. J. et al., 2002). Estos dos mensajeros secundarios están asociados con la interacción con patógenos indicando que existe una convergencia de diferentes vías de señalización a nivel de oscilaciones de Ca²⁺ (Klusener, B. et al., 2002). Las señales redox suministradas por cambios en las concentraciones de NO y H₂O₂ poseen una reducida vida media, siendo el H₂O₂ generado principalmente por oxidasas dependientes de NADPH unidas a membranas y el NO por nitrato reductasas y el complejo glicina descarboxilasa. Además existe otra conexión entre el estado “redox” y la señalización por ABA ya que el estado redox de la célula puede ser rápidamente percibido por las proteínas fosfatasa ABI1 y ABI2, que son rápidamente inactivadas por H₂O₂ debido a la oxidación de varios residuos de cisteína cruciales (Meinhard, M. et al., 2002).

Elementos reguladores de la señalización.

Los diferentes rastreos genéticos realizados han permitido aislar mutantes con defectos en la respuesta a ABA. Así, los mutantes *abi1* y *abi2* fueron inicialmente identificados como plantas con menor sensibilidad al ABA tanto en tejido vegetativo

como en semilla (Koornneef, M. et al., 1984; Merlot, S. and Giraudat, J., 1997; Merlot, S. et al., 2001). Su posterior clonación los identificó como dos miembros de la familia de las fosfatasas Ser/Thr PP2C con una homología elevada entre ambas (Leung, J. et al., 1994; Leung, J. et al., 1997; Meyer, K. et al., 1994; Rodriguez, P. L. et al., 1998). La alta homología entre ambas proteínas ha hecho que algunos autores sugirieran que podrían actuar sobre los mismos sustratos (Leung, J. et al., 1997), pero diversos análisis electrofisiológicos indican que los defectos encontrados en el mutante *abi1-1* son mas extensos y que la proteína fosfatasa ABI1 actúa antes que el Ca^{2+} en la ruta de respuesta a ABA (Schroeder, J. I. et al., 2001). Varios análisis de interacción proteína-proteína indican que ambas fosfatasas ABI son capaces de interaccionar con numerosas dianas, como un factor de transcripción de tipo homeodominio-cremallera de leucina (HD-leucine zipper; Himmelbach, A. et al., 2002) y la proteína quinasa PSK3/CIPK15 (Guo, Y. et al., 2002). Estos datos muestran como un sensor de calcio está estructuralmente unido con sus proteínas asociadas quinasas y fosfatasas para la regulación de la transducción de la señal de ABA. Asimismo, estudios de dos híbridos han confirmado también la interacción entre ABI2 y SOS2, una Ser/Thr proteína quinasa identificada por su papel en la señalización del estrés salino (Liu, J. et al., 2000; Ohta, M. et al., 2003). El análisis del genoma de *A. thaliana* muestra que existen 69 miembros de la familia de fosfatasas PP2C, 25 de las cuales parecen implicadas en la señalización de ABA (Finkelstein, R. R. and Rock, C. D., 2002). Dos de ellas, AtHAB1 y AtHAB2, poseen un alto grado de similitud a las fosfatasas ABI1 y ABI2 y se ha demostrado que también intervienen en la vía de señalización por ABA (Rodriguez, P. L., 1998; Leonhardt, N. et al., 2004; Saez, A. et al., 2004). Además, otras familias de proteínas fosfatasas afectan también a la señalización del ABA, como las fosfatasas PP1/PP2A con función en la expresión génica inducida por ABA y el cierre de los estomas, puesto que la inhibición de estas fosfatasas aumenta la probabilidad de apertura de canales de Ca^{2+} (Kwak, J. M. et al., 2002).

Muchas proteínas quinasas de varias familias génicas han sido implicadas en la señalización de ABA afectando la regulación de los estomas y/o la expresión génica, encontrando que el ABA puede aumentar la expresión o actividad de estas proteínas quinasas (revisado en Finkelstein, R. R. and Rock, C. D., 2002). Así, las proteínas PKABA1 y AAPK son reguladores positivos de la expresión génica mediada por ABA y de la respuesta estomática respectivamente (Wang, X. Q. et al., 2001;

Johnson, R. R. et al., 2002) y pertenecen ambas a la familia de proteínas quinasas del tipo “SnRKs”. La proteína PKABA1 fosforila y activa factores de transcripción del tipo ABF (ABRE binding factor; Johnson, R. R. et al., 2002). La proteína AAPK interacciona físicamente y fosforila la proteína de unión a RNA AKIP1 dentro del núcleo de las células oclusivas, siendo necesaria esta fosforilación inducida por ABA para que la proteína AKIP1 interaccione con los RNA mensajeros dianas y provoque su traducción, como por ejemplo, RNA mensajeros de dehidrinas inducidas por ABA (Li, J. et al., 2002). Además existe la posibilidad que estas proteínas quinasas regulen el recambio proteico puesto que parece que se unen al proteosoma 26S y son capaces de reclutar las proteínas para su degradación (revisado en Hrabak, E. M. et al., 2003).

Los *loci* ERA (enhanced response to ABA) fueron identificados en un rastreo que buscaba mutantes con mayor respuesta a la inhibición de la germinación por el ABA (Cutler, S. et al., 1996). El gen ERA1 codifica la subunidad β de la enzima farnesil transferasa, indicando que interviene en la lipidación de una hipotética molécula de señalización, entre las que pueden encontrarse las proteínas G (Cutler, S. et al., 1996). El mutante *era3* resulto ser alélico al mutante *ein2*, que codifica un sensor de cationes divalentes unido a membrana que parece representar un punto de cruce entre etileno, ABA, auxinas, ácido jasmónico y señalización de estrés (Alonso, J. M. et al., 1999).

En los últimos años se han clonado diferentes *loci* que afectan al control del ABA sobre la expresión génica y codifican componentes que controlan postranscripcionalmente la acumulación de RNA mensajeros, tanto a nivel de la maduración de los mensajeros como en el control de su estabilidad. El gen ABH1 codifica un homólogo del complejo CAP de unión al RNA y participa en el control de la maduración específica del RNA mensajero de genes de respuesta a ABA, incluyendo reguladores negativos de la señal de ABA (Hugouvieux, V. et al., 2001; Hugouvieux, V. et al., 2002). La comparación de los patrones de transcripción del ecotipo silvestre y del mutante *abh1* mediante micromatrices, muestra que solo 18 genes están por debajo de su nivel de expresión en el mutante, incluyendo algunos de los anteriormente identificados como inducibles por ABA y algunas proteínas señalizadoras como las proteínas fosfatasa PP2C (Hugouvieux, V. et al., 2001). El gen HYL1 codifica una proteína de unión a RNA de doble cadena. La expresión del gen HYL1 esta reprimida por ABA, indicando un papel como regulador negativo de la respuesta de ABA, influyendo en el recambio de moléculas de RNA mensajero

(Lu, C. and Fedoroff, N., 2000). El gen SAD1 codifica una proteína “Sm-like” y parece estar implicada en el procesamiento o recambio de RNA (Xiong, L. et al., 2001a).

También se han aislado una serie de mutantes denominados *gca1-8* en un rastreo del crecimiento de la raíz en un medio suplementado con ABA. Mientras que los efectos de *gca3-8* se limitan al control del crecimiento de la raíz, los mutantes *gca1* y *gca2* poseen efectos pleiotrópicos. Estos mutantes son recesivos y seguramente reguladores positivos de la respuesta de ABA (Himmelbach, A. et al., 1998). Otra serie de genes han sido aislados empleando la estrategia de genes chivatos y algunos de ellos han sido clonados. Entre ellos, el gen HOS1 codifica una nueva proteína con dedos de zinc que parece estar implicada en la inactivación de los componentes de señalización de ABA (Lee, H. et al., 2001).

Todos los componentes identificados ponen de manifiesto que los mecanismos reguladores de la señalización implican el control de la expresión génica a todos los niveles, además de control del recambio de las proteínas por ubiquitinación (revisado en Himmelbach, A. et al., 2003).

Dianas transcripcionales.

La identificación de los genes regulados por ABA y de las secuencias *cis* de respuesta a ABA han constituido un punto de inicio para los estudios bioquímicos. En los tejidos vegetativos, los genes regulados por ABA están implicados en la respuesta a los estreses abióticos, mientras que en las semillas en maduración están implicados tanto en la síntesis de materiales de reserva como en la inducción de la tolerancia a la desecación. Así, los genes regulados por ABA codifican en gran medida productos necesarios para la adaptación al estrés o para síntesis de productos de reserva, y en menor medida codifican componentes de señalización (Leung, J. and Giraudat, J., 1998; Finkelstein, R. R. and Lynch, T. J., 2000; Finkelstein, R. R. and Rock, C. D., 2002; Lopez-Molina, L. and Chua, N. H., 2000). El análisis del transcriptoma ha mostrado que alrededor de 1.300 genes son regulados por ABA, y aproximadamente el 90% de ellos están desregulados en el mutante *abi1-1*, lo cual da idea del papel central desempeñado por esta fosfatasa (Hoth, S. et al., 2002). Los genes encargados de la regulación de estos productos pertenecen a distintas familias de factores de transcripción, destacando los factores ABI3, ABI4 y ABI5 que

pertencen a las familias génicas de factores VIVIPAROUS1/ABI3, AP2/ERF y bZIP, respectivamente.

Hay aproximadamente 80 genes en el genoma de *A. thaliana* que codifican factores de transcripción del tipo bZip (Riechmann, J. L. and Ratcliffe, O. J., 2000; Jakoby, M. et al., 2002). La subfamilia a la que pertenece el factor ABI5 se denomina factores de unión a ABREs (ABF) y esta compuesta por al menos 9 miembros, 8 de los cuales se ha comprobado que están relacionados con la expresión de genes inducibles por ABA (Choi, H. et al., 2000; Uno, Y. et al., 2000; Kim, S. Y. et al., 2002). Estos factores poseen tres dominios básicos conservados y el dominio bZIP de interacción con proteína en el extremo de C-terminal, mientras que en el extremo N-terminal contiene posibles sitios de fosforilación. Estos factores interaccionan como dímeros con el elemento de respuesta a ABA (ABRE, ABA response element) de los promotores, compuesto por las denominadas cajas G (ACGT). Sin embargo, una óptima respuesta a ABA requiere la participación de un segundo elemento *cis* llamado elemento acoplador (CE, coupling element). Este elemento se considera también un elemento ABRE, aunque no todos los miembros de la subfamilia ABI5 pueden unirse a él. Además, está descrito que factores de transcripción de la familia AP2 se pueden unir al elemento CE, mostrando de este modo la relación existente entre ambos factores de transcripción en la expresión de genes controlados por ABA (Kizis, D. and Pages, M., 2002; Narusaka, Y. et al., 2003). Recientemente se ha identificado, mediante la técnica de un híbrido de levadura y empleando como cebo elementos ABREs, 4 miembros inducibles por estrés y ABA de la subfamilia ABF capaces de transactivar la expresión de un gen chivato controlado por un elemento ABRE en levadura y que pueden interaccionar con ambos elementos ABREs (Choi, H. et al., 2000). Dos de los miembros, ABF2 y ABF4, fueron previamente aislados por Uno et al. (2000) y denominados como AREB1 y AREB2. La sobreexpresión de los factores de transcripción ABF3 o ABF4 produce hipersensibilidad al ABA y otros fenotipos asociados a ABA como sensibilidad al azúcar, reducida germinación y crecimiento postgerminativo, alteración de la expresión de genes de respuesta a estrés y tolerancia a la sequía (Kang, J. Y. et al., 2002). Algunos estudios indican que el factor ABI5 es activo preferentemente durante el desarrollo de la semilla y en los primeros estadios de la plántula mientras que los factores ABF1-4 poseen su función reguladora preferentemente en los estadios posteriores del desarrollo (Uno, Y. et al., 2000;

Kang, J. Y. et al., 2002). A pesar de las similitudes entre los sitios de unión y de la expresión inducible por estrés o ABA de la subfamilia ABF, estudios recientes han mostrado que estos están sujetos a una regulación cruzada por ABI3, ABI4 y ABI5 con un rango desde la hiperinducción hasta la represión (Brocard, I. M. et al., 2002), lo que no cuadraría con un modelo sencillo de redundancia funcional en esta subfamilia. Asimismo, la actividad de estos factores de transcripción parece estar regulada por fosforilación (Kagaya, Y. et al., 2002). La fosforilación de ABI5 estabiliza la proteína porque bloquea la unión con la proteína AFP encargada de reclutar a ABI5 para la degradación por el proteosoma 26S, dando lugar al arresto del crecimiento post-embrionario (Lopez-Molina, L. et al., 2003; Smalle, J. et al., 2003). Esta fosforilación correlaciona con la activación por ABA y H₂O₂ de la proteína quinasa AtMPK3 (Lu, C. et al., 2002).

El factor de transcripción ABI4 posee un dominio de interacción con DNA del tipo AP2 y se incluye dentro de la subfamilia ERF compuesta aproximadamente por 120 miembros (Riechmann, J. L. and Ratcliffe, O. J., 2000). ABI4 es capaz de unirse al elemento *cis* de respuesta a la sequía (DRE, drough response element), aunque el elemento DRE no está presente en multitud de genes regulados por ABI4 y algunos estudios *in vitro* han demostrado que también es capaz de unirse a los ABRES (Finkelstein, R. R. and Rock, C. D., 2002).

De los 43 miembros pertenecientes a la familia con dominio B3 encontrados en *A. thaliana*, 14 se encuentran en la subfamilia ABI3/VP1 (Riechmann, J. L. and Ratcliffe, O. J., 2000). Además de ABI3, esta subfamilia incluye dos miembros reguladores que controlan la maduración del embrión, FUS3 (Luerssen, H. et al., 1998) y LEC2 (Stone, S. L. et al., 2001). El análisis de las secuencias de los genes ABI3 de *A. thaliana* y VIVIPAROUS1 de maíz y ensayos de complementación determinaron que ambos eran ortólogos (Suzuki, M. et al., 2001), aunque VP1 actuaba además como represor transcripcional de genes que son inducidos durante la germinación por GA (Hoecker, U. et al., 1995). El factor ABI3 contiene 4 dominios característicos: un dominio de activación ácido y tres básicos (B1, B2 y B3). Se ha determinado que este factor de transcripción se une al elemento conservado RY (Suzuki, M. et al., 1997), y el dominio B2 es capaz de interactuar con el elemento de respuesta a ABA (ABRE). Recientes estudios de dos híbridos han demostrado que los factores de transcripción ABI3 y ABI5 interactúan directamente mediante el dominio B1 de ABI3 (Nakamura, S. et al., 2001), sugiriendo que ABI5 unido al

promotor ABRE puede atar a ABI3 a alguno de sus promotores diana y facilitar así la interacción con los elementos RY y los complejos de transcripción.

El gen LEC1 pertenece a una familia con 10 miembros en *A. thaliana* capaces de unirse a la denominada caja CCAAT. Los miembros de esta familia de factores de transcripción se supone que consiguen la especificidad de expresión mediante la formación de homo y heterodímeros capaces de activar una serie específica de genes (Lekstrom-Himes, J. and Xanthopoulos, K. G., 1998). El gen LEC1 se expresa primariamente durante la embriogénesis temprana y pese a que las mutaciones tienen efectos limitados en la sensibilidad al ABA (West, M. et al., 1994; Lotan, T. et al., 1998), parece que potencia la respuesta a ABA mediante interacciones genéticas con los factores de transcripción ABI3, ABI4 y ABI5 (Meinke, D. W. et al., 1994; Parcy, F. et al., 1997; Finkelstein, R. R. and Rock, C. D., 2002).

La implicación de los factores de transcripción MYB y MYC en la expresión de genes regulados por ABA quedó de manifiesto al clonar miembros de ambas familias inducibles por estrés (Urao, T. et al., 1993; Abe, H. et al., 1997). La familia MYB está representada por 190 miembros en *A. thaliana*, mientras que solo existe un miembro MYC con la estructura de dominios canónica del tipo b-HLH-ZIP, aunque existe una alta homología con 139 posibles factores bHLH. Debido a que el sistema de respuesta mediante los factores del tipo MYB/MYC requiere síntesis de novo de ambas proteínas, se ha sugerido que pueden participar en la respuesta adaptativa lenta al estrés por deshidratación (Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2000).

Algunos miembros (AtHB6, AtHB7 y AtHB12) de la familia de factores de transcripción “homeodominio-cremallera de leucina” (HD-Zip) son inducidos por ABA y estrés abiótico (Soderman, E. et al., 1996; Lee, Y. H. and Chun, J. Y., 1998; Soderman, E. et al., 1999). El factor AtHB6 se une a elementos *cis* ricos en AT e interacciona físicamente con la proteína fosfatasa ABI1 (Himmelbach, A. et al., 2002).

Existen varias hipótesis de como los factores de transcripción identificados regulan las mismas dianas génicas. Esta regulación podría ser bien mediante la unión independiente a la diana de los distintos factores o bien mediante su unión secuencial, o incluso mediante una combinación de factores unidos de forma independiente y secuencial. Sin embargo, la comparación de diferentes patrones de expresión mutantes y silvestres ha demostrado que ninguno de los factores de

transcripción nombrados anteriormente es completamente específico de estadio de desarrollo, de modo que seguramente existe y es necesaria una interacción con reguladores específicos de ABA y otros reguladores para llevar a cabo su función (revisado en Finkelstein, R. R. and Rock, C. D., 2002).

Además de la regulación de la expresión génica por ABA mediante los factores de transcripción se ha encontrado que existe una regulación post-transcripcional tanto a nivel de maduración y estabilidad de RNA mensajeros como en la estabilidad de proteínas. Recientemente se ha identificado a la RNA polimerasa II como posible punto de control en la señalización del estrés en plantas mediante la acción de la fosfatasa AtCPL1, la cual seguramente realiza este control mediante la defosforilación del dominio C-terminal de la RNA polimerasa II (Koiwa, H. et al., 2002).

Comunicación cruzada con otras hormonas.

Además de la caracterización del antagonismo en diferentes respuestas entre el ABA y otras fitohormonas como GAs, citoquininas y auxinas, se ha demostrado la interacción entre las señalizaciones por ABA y etileno, brasinoesteroides, luz o azúcares (revisado en Rock, C. D., 2000; Finkelstein, R. R. and Rock, C. D., 2002). Así parece más adecuado pensar que algunos de los elementos de señalización actúan como nodos o con diversos componentes de una red de señalización compleja. Así, el hecho de que únicamente algunas mutaciones en diferentes elementos de respuesta parecen afectar a varias rutas de señalización sugiere que las interacciones entre las diferentes rutas son relativamente específicas.

No obstante, se han identificado mutantes con defectos pleiotrópicos en respuesta a varias hormonas incluyendo el ABA. Dos mutantes resistentes al ácido jasmónico, *jar1* y *jar4*, también muestran hipersensibilidad al ABA en ensayos de germinación (Staswick, P. E. et al., 1992; Berger, S. et al., 1996). El mutante dominante negativo *axr2-1* es resistente a auxina, etileno, y ABA, (Wilson, A. K. et al., 1990). El mutante *sax1* es hipersensible a ABA y auxina, y la adición de brasinoesteroides exógenos rescata el fenotipo (Ephritikhine, G. et al., 1999). Los mutantes *bri1* y *bri2* son sensibles a brasinoesteroides e hipersensibles ABA en el crecimiento de raíz (Clouse, S. D. et al., 1996; Li, J. et al., 2001). El mutante *era3* resultó ser alélico al mutante *ein2*, que codifica un sensor de cationes divalentes

unido a membrana que parece representar un punto de cruce entre etileno, ABA, auxinas, ácido jasmónico y señalización de estrés (Alonso, J. M. et al., 1999). La comparación de fenotipos monogénicos y digénicos mostraron que las mutaciones *ctrl* y *aba1-1* actuaban sinérgicamente aumentando la resistencia a ABA en germinación (Beaudoin, N. et al., 2000).

1.6. Mecanismos moleculares de la señalización.

El ABA regula desde procesos con efectos a medio-largo plazo (días-semanas) como puede ser la adquisición de la tolerancia a la sequía hasta a efectos realmente rápidos como el cierre de los estomas (minutos). Esto implica la existencia de múltiples mecanismos de acción del ABA con algunos elementos comunes que afectan a ambos tipos de respuestas. De este modo, los análisis de los mecanismos de la respuesta ABA resultan complicados, dado que según el estadio de desarrollo o el tejido de la planta existen diferencias, resultando que determinados componentes pueden actuar como reguladores negativos o positivos. Así es más sencillo considerar la acción del ABA por separado en sus diferentes funciones.

Desarrollo y establecimiento de la semilla.

Durante el desarrollo de la semilla de bastantes especies existen dos picos de concentración de ABA en función del tiempo. En *A. thaliana* el primero de estos picos ocurre a los 10 DAP (días después de la polinización), es de origen maternal y precede a la fase de maduración de la semilla (Karssen, C. M. et al., 1983). Este primer pico es requerido para prevenir la germinación prematura o viviparismo en la fase de divisiones celulares de la embriogénesis (Figura 1.6.). Concretamente parece que es requerido para la detención del ciclo celular de las células del embrión en la transición entre las fases G1/S, consistente con el hecho que el ABA puede inducir la expresión de un inhibidor de proteínas quinasas dependientes de ciclina (ICK1) que puede intervenir en la detención del ciclo celular (Wang, H. et al., 1998). Diversos estudios genéticos en *A. thaliana* han puesto de manifiesto la importancia que poseen los genes LEC1, LEC2 y FUS3 para prevenir la germinación prematura al final de la fase de divisiones celulares de la embriogénesis (Raz, V. et al., 2001). En cambio, los mutantes sencillos *aba* o *abi* no son vivíparos en *A. thaliana*, salvo el doble mutante

abi3 con *lec2-3* o *fus3*, lo que pone de manifiesto la distinción entre los mecanismos que controlan el viviparismo y la sensibilidad a ABA en la germinación en *A. thaliana*. Sin embargo en maíz, mutantes sencillos con un defecto en la biosíntesis (*vp14*) o en la señalización (*vp1*) sí son vivíparos (Leung, J. and Giraudat, J., 1998; Finkelstein, R. R. and Rock, C. D., 2002). Estos datos indican que al menos en *A. thaliana* existen mecanismos de control del viviparismo redundantes, mecanismos que no están presentes o son menos redundantes en otras especies como maíz (Finkelstein, R. R. and Rock, C. D., 2002).

El segundo de los picos de ABA está producido por el cigoto, es tres veces menor que el primero y es esencial para la inducción de la latencia de la semilla (Karssen, C. M. et al., 1983). Sin embargo, el contenido en ABA en una semilla silvestre madura es solamente 1,4 veces mayor que los niveles en una semilla sin latencia de un mutante deficiente, indicando que existen otros factores importantes en el mantenimiento de la latencia de las semillas además del nivel de ABA endógeno (Bentsink, L. and Koornneef, M., 2003). Coincidiendo con la aparición de este pico de ABA se acumulan en el embrión los RNA mensajeros específicos que codifican proteínas de reserva y proteínas LEA (*late embryogenesis abundant*). Las proteínas LEA son altamente homólogas entre ellas, muy solubles, básicas, ricas en glicina y lisina y con escasos residuos hidrofóbicos. Estas características confieren a las proteínas LEA un carácter hidrofílico y estabilidad a la ebullición, indicando que poseerían función protectora de proteínas y membranas frente a los daños producidos por la pérdida de agua que ocurre en el citoplasma durante la desecación de la semilla.

La expresión de estos genes durante la maduración está controlada por la acción combinatoria de diversos factores de transcripción inducibles por ABA. Mediante análisis genéticos se han identificado seis clases de factores de transcripción, ABI3, ABI4, ABI5, LEC1, LEC2 y FUS3 (Figura 1.6.), que son esenciales tanto para la expresión de genes inducibles por ABA como para genes específicos de semillas. Incluso se ha llegado a determinar que regulan principalmente la expresión génica a partir de la mitad de la embriogénesis y que algunos de ellos regulan principalmente la respuesta a ABA (ABI3, ABI4 y ABI5) mientras que otros regulan principalmente la transición desde la embriogénesis al crecimiento germinativo (LEC1, LEC2 y FUS3).

Una vez finalizada la fase de maduración de la semilla los niveles de ABA disminuyen, siendo prácticamente inexistentes cuando la semilla esta capacitada para germinar.

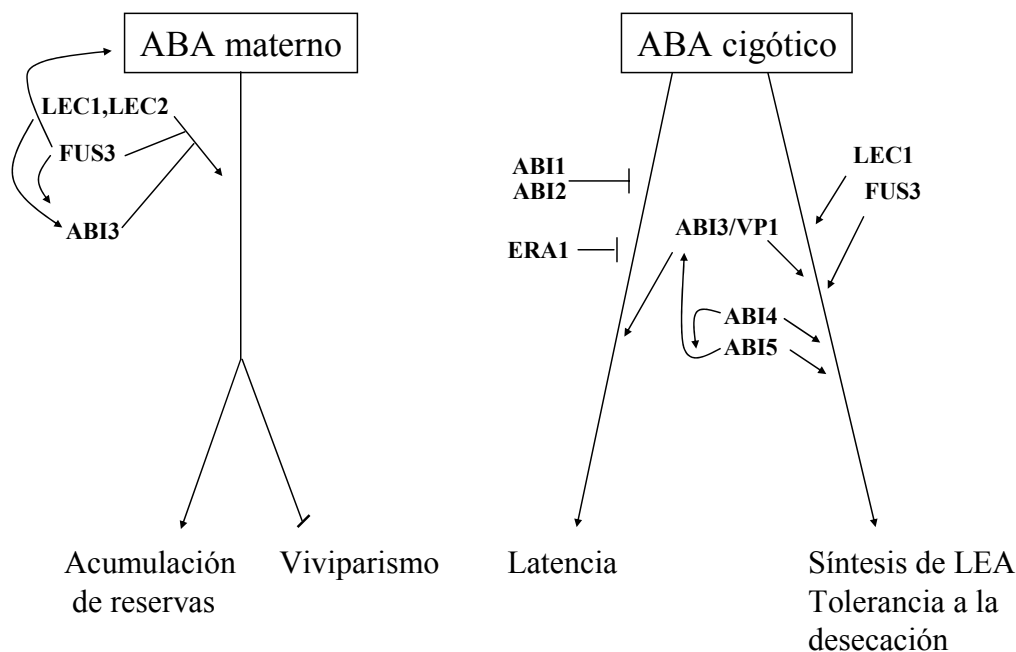


Figura 1.6. Mecanismos de señalización implicados en el desarrollo de la semilla.

Las flechas representan la promoción del proceso o expresión de los reguladores mientras que las barras representan la inhibición del proceso indicado. La posición de los loci no implica el orden de actuación génica.

Germinación de la semilla y establecimiento de plántula

La germinación de la semilla está controlada por varias hormonas (ABA, giberelinas (GA), etileno y brasinoesteroides (BR) así como por factores ambientales (Koornneef, M. et al., 2002; Bentsink, L. and Koornneef, M., 2003) (Figura 1.7.). Se han encontrado evidencias genéticas para el antagonismo ABA/GA en la germinación de las semillas, suministradas por el aislamiento de mutaciones deficientes en ABA como supresores de la falta de germinación debida a mutaciones deficientes en GA (Koornneef, M. et al., 1982) o como por ejemplo, el aislamiento del mutante de respuesta a GA *sleepy* como supresor del fenotipo de germinación del mutante *abil-1* (Steber, C. M. et al., 1998). Asimismo, líneas insensibles y deficientes en brasinoesteroides fueron hipersensibles a la inhibición de la germinación por ABA (Steber, C. M. and McCourt, P., 2001). La interacción con la señalización por etileno fue determinada mediante el aislamiento de nuevos alelos de

genes de respuesta a etileno en búsquedas de reguladores de la sensibilidad al ABA en semilla (Beaudoin, N. et al., 2000; Ghassemian, M. et al., 2000).

Durante la imbibición de la semilla, la biosíntesis *de novo* de ABA en el embrión es determinante para el mantenimiento de la latencia de las semillas (Koornneef, M. et al., 2002; Finkelstein, R. R. and Rock, C. D., 2002). Además el embrión embebido puede mantenerse entre un estado de latencia y germinación controlado por el factor de transcripción ABI5. Semillas maduras incubadas durante 5 días después de la estratificación en bajas concentraciones de glucosa y ABA muestran la detención del crecimiento posterior a la emergencia de la radícula y una gran acumulación de la proteína ABI5 (Lopez-Molina, L. et al., 2001). Esta acumulación de proteína ABI5 esta fuertemente correlacionada con el mantenimiento de la tolerancia a la desecación en estas semillas latentes. Así el ABA, la proteína ABI5 y otros factores pueden ser requeridos para retrasar o prevenir escapes de la germinación bajo condiciones no favorables para soportar el crecimiento de la plántula.

Una concentración exógena de ABA $3\mu\text{M}$ es suficiente para la inhibición de la germinación de las semillas silvestres de *A. thaliana*. Sin embargo a bajas concentraciones de azúcares (glucosa o sacarosa de 30 a 90 mM) se observa emergencia de radícula incluso a concentraciones de ABA $100\mu\text{M}$, aunque el posterior desarrollo de la plántula esté bloqueado (Garcarrubio, A. et al., 1997; Finkelstein, R. R. and Lynch, T. J., 2000). Esto indicaba que el azúcar exógeno favorecía la germinación porque permitía superar la deficiencia nutricional resultante de la inhibición de la movilización de reserva mediada por el ABA exógeno (Garcarrubio, A. et al., 1997; Eastmond, P. J. et al., 2000) (Figura 1.7.).

Por otra parte, uno de los efectos mas caracterizados del ABA durante la germinación es el realizado como antagonista de la hormona GA en la movilización de las reservas de almidón en granos de cereales. La movilización de almidón esta catalizada por la activación de las enzimas α -amilasas. Estas enzimas están sujetas a una regulación espacial, temporal, hormonal y metabólica que afecta su expresión a varios niveles, incluyendo la transcripción, estabilidad del mRNA, y la secreción de la enzima (Jacobsen, J. V., 1995). Como ejemplo del efecto antagonista GA/ABA en la expresión génica, la hormona GA promueve la expresión de genes de α -amilasas induciendo la síntesis del factor de transcripción GAMyb, mientras que el ABA

induce la expresión de una proteína quinasa PKABA1 que reprime la inducción de GAMyb (Gomez-Cadenas, A. et al., 2001).

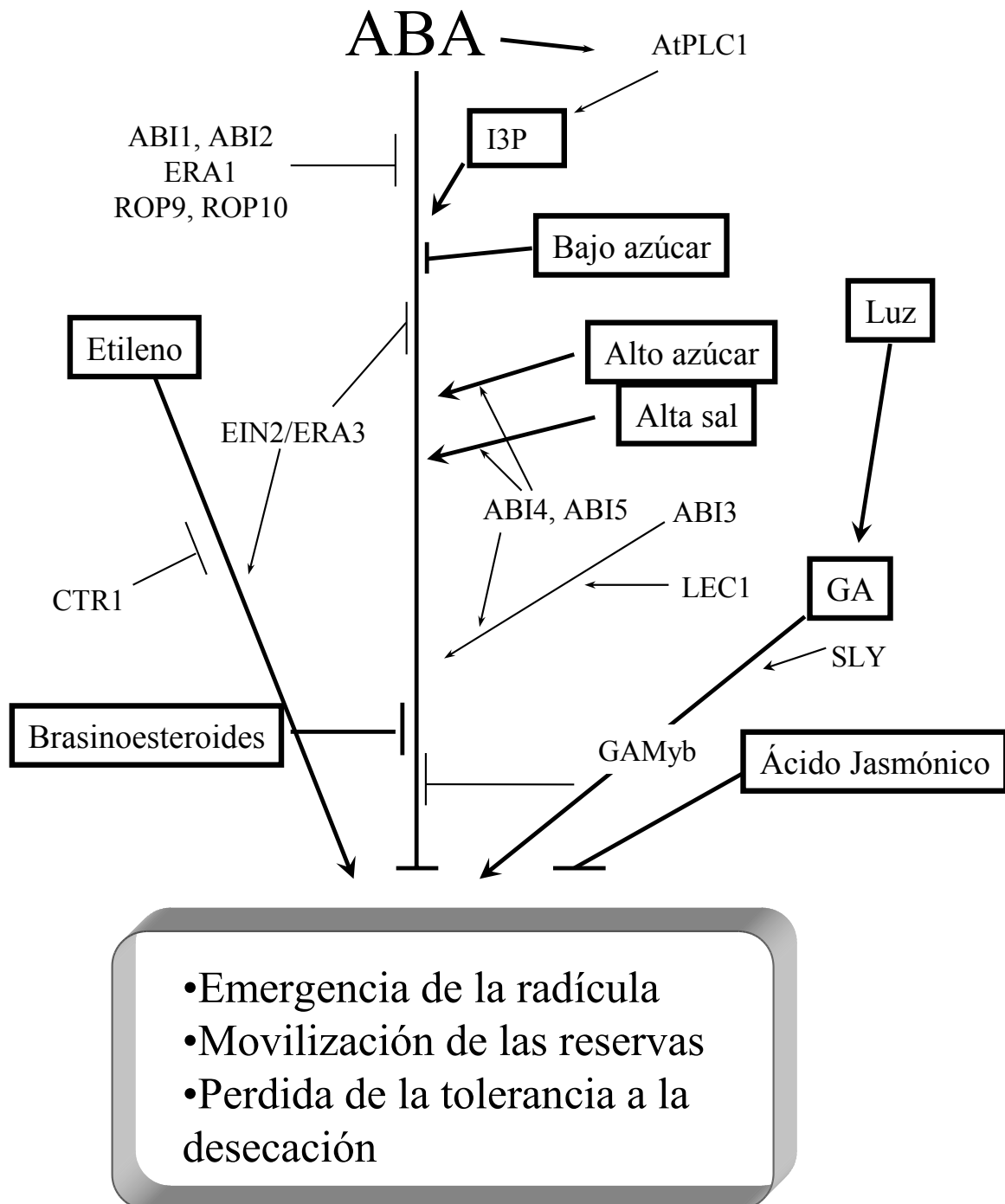


Figura 1.7. Esquema de las vías de señalización que interactúan con el ABA en la germinación de la semilla y el establecimiento de la plántula. Las flechas representan la promoción del proceso o expresión de los reguladores mientras que las barras representan la inhibición del proceso indicado. La posición de los loci no implica el orden de actuación génica.

Respuesta a estrés.

Cierre de los estomas

El cierre de los estomas inducido por ABA ocurre en unos minutos, de modo que no necesita síntesis de novo de ABA y es por tanto un modelo excelente para estudiar los eventos tempranos de señalización de ABA. La regulación de la apertura estomática se produce gracias a la integración de los distintos mecanismos de respuesta a diferentes condiciones como son el estatus hídrico de la planta, las respuestas hormonales, la luz, el CO₂ y otros factores ambientales mediante una red compleja de señalización (Figura 1.8.). Debido a esto en los últimos años se han empleado los estomas como un sistema modelo para el estudio de estas interacciones y especialmente para analizar la regulación de los canales iónicos en respuesta al ABA.

El ABA es el mayor controlador de la respuesta estomática frente a estrés, promoviendo el cierre de los estomas e inhibiendo su apertura. El cierre y la apertura de los estomas difieren en los mecanismos moleculares de señalización (Schroeder, J. I. et al., 2001; Maser, Pascal et al., 2003; Himmelbach, A. et al., 2003; Figura 1.8.). El cierre se produce por una pérdida de turgor de las células oclusivas causado por la salida del K⁺ intracelular y otros aniones de las células, el traslado de la sacarosa y la conversión del ácido orgánico malato en el osmóticamente inactivo almidón (MacRobbie, E. A., 2000). Concretamente, el ABA inicia un incremento del Ca²⁺ libre intracelular que a su vez activa dos tipos de canales aniónicos, uno lento y sostenido denominado tipo-S y otro más rápido y momentáneo denominado tipo-R. Ambos canales producen la liberación de aniones de la célula oclusiva, provocando la despolarización de la membrana plasmática de la célula. Este cambio en el potencial de membrana desactiva los canales de entrada de K⁺ y activa los canales de salida de K⁺, resultando en una salida del potasio intracelular de las células oclusivas. Además, el ABA causa la alcalinización del citosol de la célula oclusiva, lo que directamente aumenta la actividad del canal de salida de K⁺ y disminuye la actividad de los canales aniónicos del tipo-R (Figura 1.8.). Asimismo, el 90% del volumen de las células oclusivas están ocupadas por la vacuola y esta contiene la gran mayoría de iones que saldrán de la célula oclusiva. Así, el aumento de Ca²⁺ intracelular activa los canales de K⁺ vacuolares que mueven el K⁺ hacia el citosol. La salida sostenida de los aniones y del K⁺ de las células oclusivas por los canales de salida de la

membrana plasmática contribuye a la pérdida de turgencia de las células oclusivas y al cierre del poro estomático (revisado en Schroeder, J. I. et al., 2001; Maser, Pascal et al., 2003).

La apertura del estoma esta dirigida por la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática dado que al aumentar el potencial eléctrico activa la toma de K^+ por los canales de entrada. El aumento del Ca^{2+} citosólico provocado por el ABA baja la actividad de los canales de entrada de K^+ y de la H^+ -ATPasa inhibiendo la apertura (Figura 1.8.).

La ruta de señalización de ABA que conduce al cierre estomático es una de las más conocidas y estudiadas. La mayoría de los elementos descritos en el punto 1.5 forman parte de ella (revisado en Schroeder, J. I. et al., 2001; Maser, Pascal et al., 2003). El aumento de Ca^{2+} citosólico producido por el ABA puede ser debido a la liberación de Ca^{2+} desde los almacenes intracelulares como la vacuola o bien a la entrada a través de la membrana plasmática mediante los canales de entrada de Ca^{2+} . Varios experimentos muestran como las moléculas inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) o ADP-ribosa cíclica (cADPR) pueden inducir la liberación de Ca^{2+} de los almacenes celulares (Gilroy, S. et al., 1990; Leckie, C. P. et al., 1998), pero ninguno es suficiente para obtener la respuesta a ABA completa (MacRobbie, E. A., 2000). Estudios recientes han mostrado que ABA estimula la síntesis de óxido nítrico (NO) en las células oclusivas, el cual induce el cierre estomático dependiente de cADPR (Neill, S. J. et al., 2002) y han implicado a la esfingosina 1-fosfato (S-1P) en el cierre estomático (Ng, C. K. et al., 2001). Asimismo, El ABA promueve la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden intervenir también como mensajeros secundarios promoviendo la activación de los canales de Ca^{2+} (Pei, Z. M. et al., 2000). Varios estreses que provocan el cierre estomático resulta en producción de ROS (Lee, S. et al., 1999), de modo que se ha sugerido que la ruta de respuesta dependiente de ROS es compartida por varios estreses.

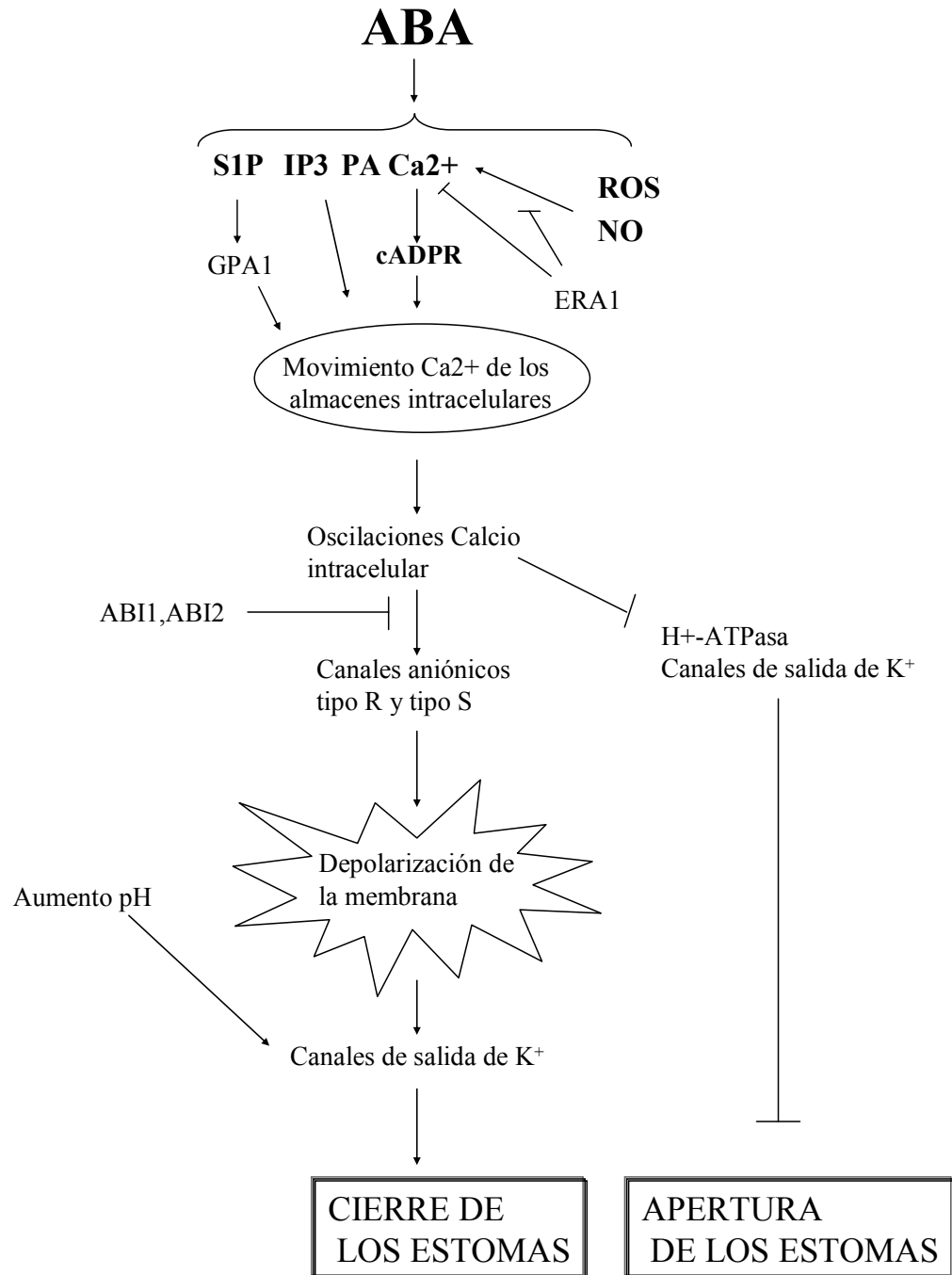


Figura 1.8. Esquema de la señalización por ABA en las células oclusivas. S1P, esfingosina 1 fosfato; PA, ácido fosfatídico; IP3, inositol 1,4,5 trifosfato; cADPR, ADP-ribosa cíclica; ROS, especies reactivas de oxígeno; NO, ácido nítrico.

Genes de respuesta a estrés.

Tradicionalmente se ha implicado a la hormona ABA en la respuesta a estrés (Zeevaart, J. A. and Creelman, R. A., 1988; Leung, J. and Giraudat, J., 1998). De

este modo, la comparación de la expresión génica de genes inducibles por estrés en mutantes deficientes y de respuesta a ABA ha demostrado que existen tanto rutas de señalización de estrés dependientes de ABA como independientes (Figura 1.9) (Rock, C. D., 2000; Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2000; Seki, M. et al., 2002; Shinozaki, K. et al., 2003; Xiong, L. et al., 2002b ; Zhang, H. et al., 2004), considerando algunos autores al ABA como parte de una red de conexiones interconectadas de percepción y señalización de estrés (Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2000; Seki, M. et al., 2002; Shinozaki, K. et al., 2003; Zhang, H. et al., 2004).

Los diversos estudios de expresión génica revelan 2 vías de respuesta en función del tiempo de respuesta, una temprana y transitoria con un pico a las 3 horas y que dura hasta 10 horas y una segunda respuesta más sostenida en el tiempo. Los genes de respuesta más tempranos incluyen genes implicados en las vías de señalización y factores de transcripción (Xiong, L. and Zhu, J. K., 2001), aunque sólo uno de ellos ha mostrado ser inducible por ABA (Knetsch, M. et al., 1996). Los genes con una expresión más sostenida son genes que se supone intervienen en algunos aspectos de la adaptación al estrés y que principalmente son inducidos por los genes de respuesta más tempranos. Muchos de ellos codifican proteínas similares a las LEA, proteasas, enzimas del metabolismo de azúcares y otros solutos compatibles, proteínas de canales hídricos o iónicos y enzimas que detoxifican especies reactivas de oxígeno. La mayoría han sido nombrados como genes *rd* (*r*esponsive to *d*ehydration), *cor* (*c*old *r*egulated), *lti* (*l*ow *t*emperature *i*nduced) o *kin* (*c*old *i*nduced).

Han sido descritas vías de señalización de estrés dependientes e independientes de ABA. Un modelo reciente propone la existencia de al menos 4 vías de señalización, dos independientes y otras dos dependientes de ABA que median la respuesta a estrés salino y osmótico (Figura 1.9.; Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2000; Seki, M. et al., 2002; Shinozaki, K. et al., 2003). Las vías de señalización dependientes de ABA poseen la expresión génica mediada por los factores de transcripción del tipo MYB/MYC y AREB/ABF. En cambio, las independientes de ABA están compuestas por la ruta SOS (*s*alt *o*verly *s*upersensitive), una ruta cuya expresión génica está mediada por la familia de factores de transcripción DREB capaces de unirse a los elementos de respuesta a sequía (DREB, *d*rough *r*eponse *e*lement *b*inding), y otros factores aún no

identificados. Los elementos *cis* a los que se unen estos factores de transcripción que forman parte de los promotores de los genes implicados en la tolerancia son los elementos CRT/DRE, ABREs y MYCR/MYCBR. En cambio, la ruta SOS interviene principalmente en la regulación de la homeostasis iónica y está compuesta por tres miembros denominados SOS1, SOS2 y SOS3.

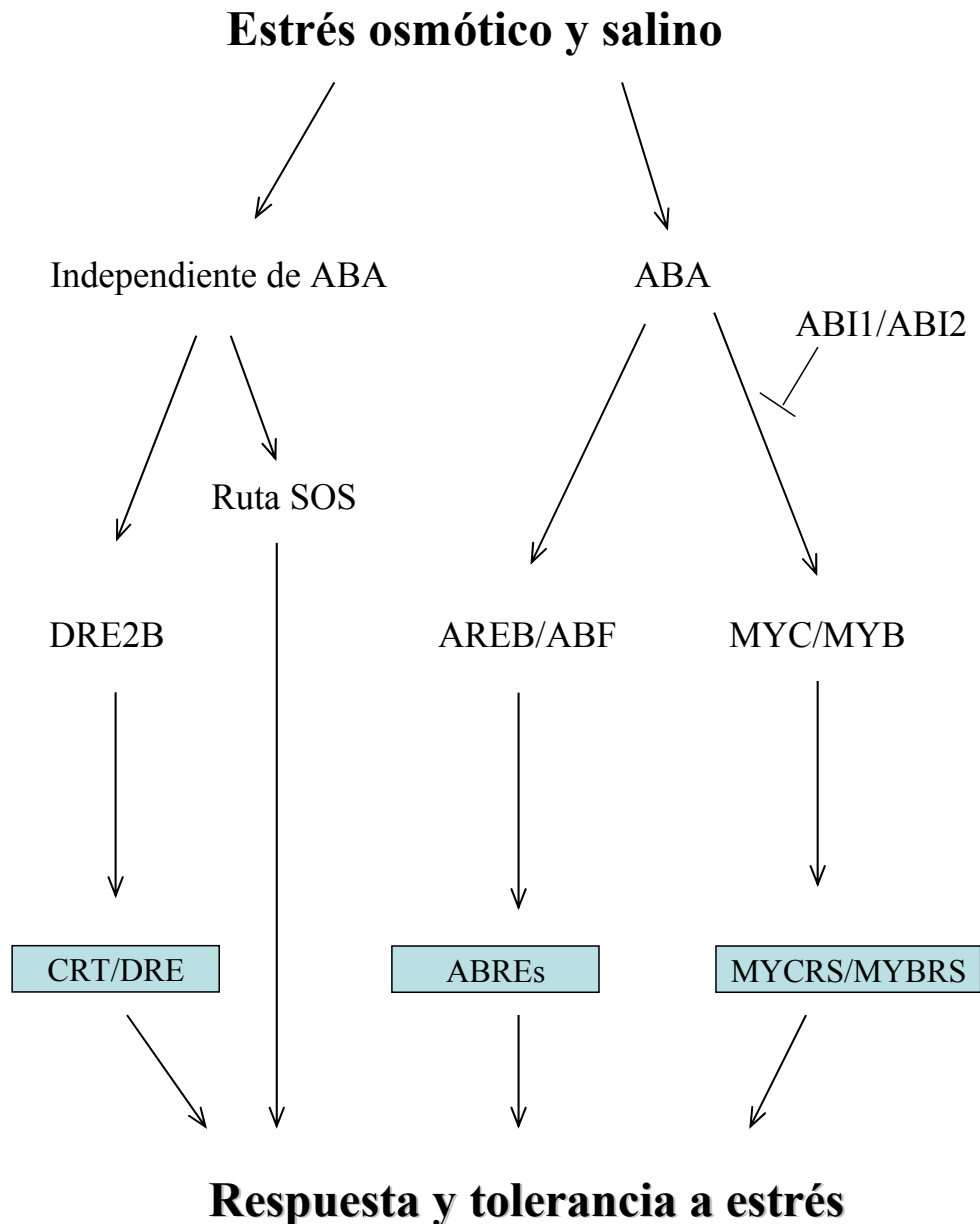


Figura 1.9. Esquema de las rutas de señalización en la respuesta a estrés hídrico independientes y dependientes de ABA. En las cajas se nombran los elementos *cis* implicados en cada ruta.

2. Objetivos.

Los objetivos planteados en esta tesis doctoral fueron los siguientes:

1. Análisis genético de la tolerancia a sal en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* empleando una colección de líneas transgénicas mutagenizadas con T-DNA. Caracterización fenotípica de los mutantes resistentes e identificación de los loci mutantes.
2. Caracterización molecular de los alelos mutantes *sre1-1/aba2-11* y *sre1-2/aba2-12*. Clonación del gen ABA2 y caracterización bioquímica de su actividad alcohol deshidrogenasa.
3. Caracterización de los alelos mutantes *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3*. Implicación de la actividad bioquímica del gen AAO3 en semillas.
4. Caracterización del alelo mutante *sre3/aba1-101*.

3. Materiales.

3.1. Material Biológico.

Arabidopsis thaliana.

Las líneas de T-DNA empleadas en este proyecto fueron construidas en el laboratorio del Dr. Detlef Weigel (The Salk Institute, La Jolla, CA) utilizando el vector de transformación pSKI15 en el fondo genético Columbia (Weigel, D. et al., 2000). Estas líneas fueron donadas al Centro de Recursos Biológicos de Arabidopsis (Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC), Ohio, USA) y distribuidas como generación T₄. Las semillas fueron distribuidas en lotes diferentes, empleándose en el presente trabajo los lotes N21995 y N21991. El primer lote estaba compuesto de 86 grupos de 100 líneas transgénicas, y el segundo de 82 grupos de 96 líneas transgénicas, siendo analizadas un total de 16.500 líneas transgénicas. Cada grupo de líneas transgénicas contenía alrededor de 1000 semillas (aproximadamente 10 semillas de cada línea transgénica). Ambos lotes se juntaron para formar la población S₀ (de Selección), con un tamaño aproximado de 200.000 semillas, en la que se llevó a cabo la búsqueda de mutantes resistentes en germinación a medios con alta concentración de sal. Se denominó S₁ a la primera generación seleccionada por su resistencia y S₂ a la generación descendiente de la población S₁ y así sucesivamente. Se empleó esta nomenclatura para facilitar la comprensión y seguimiento de las líneas transgénicas durante el proceso de selección y de las posteriores generaciones.

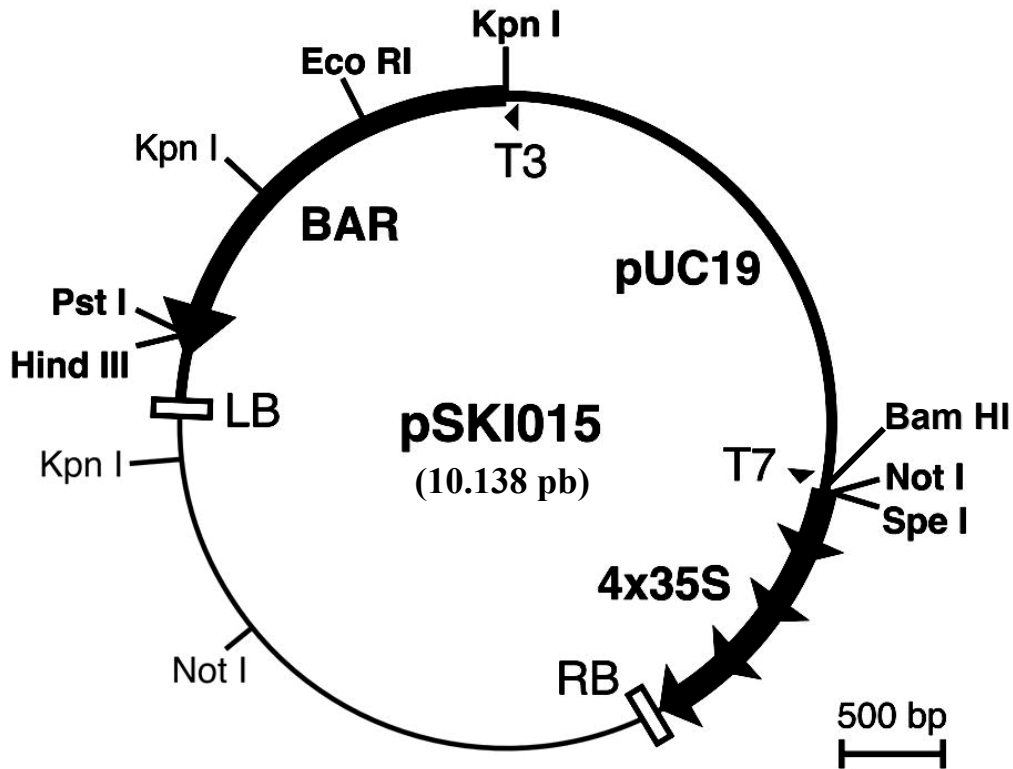


Figura 3.1. Esquema del vector pSKI015 utilizado para la generación de las líneas transgénicas (tomado del artículo Weigel et al., 2000).

La estructura del vector pSKI15 (Figura 1.1.1.) desde el borde derecho (RB) al izquierdo (LB) del T-DNA es la siguiente:

- Cuatro copias del activador de la transcripción 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), cuya función es provocar la sobreexpresión de los genes de la planta cercanos a la inserción de T-DNA.
- El plásmido pUC19 permite la realización de la técnica de rescate plasmídico para la localización de la inserción del T-DNA en el genoma de la planta. Posee el gen bacteriano de resistencia al antibiótico ampicilina, y se encuentra flanqueado por los sitios de restricción únicos *Bam*HI y *Eco*RI.
- El gen de resistencia al glufosinato, también conocido como BAR, que permite la selección en tierra de las líneas transgénicas puesto que confiere resistencia a un herbicida comercial.

La elección de esta población de líneas transgénicas como población de rastreo responde a la característica de ser líneas transgénicas generadas con un vector con 4 copias del intensificador de la transcripción 35S CaMV. Estas secuencias

intensificadoras de la transcripción pueden provocar la sobreexpresión de genes cercanos, facilitando de este modo el aislamiento de mutantes con fenotipos dominantes (Weigel, D. et al., 2000). Además, también es posible obtener mutantes insercionales.

Durante el desarrollo del presente trabajo de tesis doctoral se han empleado diversos mutantes y ecotipos de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. En la siguiente lista se enumeran estos mutantes y ecotipos, así como sus principales características, procedencia y uso.

1. Ecotipos:

- Columbia (Col): Fue suministrado por el ABRC como ecotipo silvestre de las líneas transgénicas.
- Landsberg *erecta* (La-*er*): Proviene del laboratorio del Dr. Erwin Grill (Lehrstuhl für Botanik, Technische Universität München, Germany.) Se ha empleado como ecotipo silvestre para los mutantes *abi1-1* y *aoa3-1* y también para la generación de las poblaciones empleadas en el mapeo posicional.

2. Mutantes de biosíntesis de ácido abscísico:

- Mutante *aba1-5*: Suministrado por el ABRC con número de lote CS155. Obtenido mediante mutagénesis con EMS. Se encuentra en el fondo genético Col. Empleado en los ensayos de complementación, germinación y transpiración.
- Mutante *aba2-1*: Suministrado por el ABRC con número de lote CS156. Obtenido mediante mutagénesis con EMS. Se encuentra en el fondo genético Col. Empleado en los ensayos de complementación, germinación y transpiración.
- Mutante *aba3-2*: Suministrado por el ABRC con número de lote CS158. Obtenido mediante mutagénesis con rayos gamma. Se encuentra en el fondo genético La-*er*. Empleado en los ensayos de complementación.
- Mutante *aoa3-1*: Suministrado por el Dr. Tomokazu Koshiba (Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Metropolitana de Tokio, Japón). Obtenido mediante mutagénesis con EMS. Se encuentra en el fondo genético La-*er*. Empleado en los ensayos de complementación, germinación y transpiración.

3. Mutantes insensibles a ácido abscísico:

- Mutante *abi1-1*: Suministrado por el ABRC con número de lote CS22. Obtenido mediante mutagénesis por EMS. Se encuentra en el fondo genético La-*er*. Empleado en los ensayos de germinación y transpiración

Escherichia coli.

Las distintas cepas empleadas se encuentran listadas a continuación. Se incluyen las principales características (genotipo) y para que se han empleado.

- XL1-Blue MRF': *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ Δ(mcrA)183 Δ(mcr CB-hsd SMR-mm^r)173 F' [proAB⁺ lacI^q lacZ ΔM15 Tn10 (tet^r)]*. Cepa comercial suministrada por StratageneTM. Empleada en la técnica del rescate plasmídico.
- JM110: *dam dcm supE44 hsdR17 thi leu rpsL lacY galK galT ara tonA thr tsx Δ(lac-proAB) F'[traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ ΔM15]*. Empleada como cepa de transformación de DNA recombinante.
- DH5α: *supE44 ΔlacU169 (φ80 lacZ ΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*. Empleada como cepa convencional de transformación de DNA recombinante.
- BL21(DE3): *hsdS gal (λcIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)*. Empleada en la expresión y purificación de proteínas recombinantes.

Agrobacterium tumefaciens.

Se empleo la cepa de *A. tumefaciens* GV3101 C58C1 que contiene al plásmido Ti desarmado pGV2260 (Amp^R) (Deblaere, R. et al., 1985).

Vectores de clonación y transformación.

- Plásmido pBluescriptSK+: plásmido multicopia suministrado por StratageneTM y empleado como vector convencional de clonación. Posee el gen marcador de resistencia bacteriana al antibiótico ampicilina y el gen *LacZ* para confirmar la existencia de inserto en el sitio de clonación.

- Plásmido pET-28a: suministrado por NovagenTM y empleado para la expresión y aislamiento de proteínas recombinantes en *E. coli*. Permite producir proteínas recombinantes de fusión con una cola de histidinas, que facilita su purificación en columnas, y varios epitopos que permiten su detección inmunológica. Como marcador posee el gen bacteriano de resistencia a kanamicina. Para la expresión posee la RNA pol del fago T7 bajo el control de un promotor inducido por IPTG y la pauta abierta de lectura (ORF) de la proteína recombinante bajo el control del promotor reconocido por la RNA pol del fago T7. De este modo, la adición de IPTG al medio de crecimiento bacteriano induce la producción de la RNA pol del fago T7 y esto a su vez lleva a cabo la transcripción de la ORF de la proteína recombinante.
- Plásmido pBIN19: vector binario empleado para la transformación de *Arabidopsis thaliana*. Posee un gran número de secuencias dianas para enzimas de restricción que permiten la clonación de fragmentos de DNA. Además posee el gen de resistencia NPTII al antibiótico kanamicina para la selección de las plantas transformadas con el plásmido.
- Construcción pPZP211-AAO3: suministrada por el Dr. Tomokazu Koshiba (Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Metropolitana de Tokio, Japón) y descrita en (Seo, M. et al., 2000bb). Esta construcción posee un fragmento de 7,8 kb de la región geonómica del gen AAO3, que incluye la ORF y el promotor del gen. Se emplea en los ensayos de complementación de los mutantes. El plásmido posee el gen bacteriano de resistencia al antibiótico espectinomicina para la selección de transformantes en bacterias y el gen de resistencia NPTII al antibiótico kanamicina para la selección de las plantas transgénicas.
- Cromosomas artificiales de bacterias competentes en transformación (TAC): el clón TAC K8A10 fue suministrado por el ABRC. Fue empleado en el ensayo de complementación de mutantes.

3.2. Material no Biológico.

Reactivos.

- (±)-Ácido abscísico (ABA): suministrado por Sigma, referencia A-1049. El producto suministrado es una mezcla racémica de los isómeros 2-cis,4-trans-ABA.
- Xantoxina: fue suministrado amablemente por el profesor Jan D. Zeevaart (MSU-DOE Plant Research Laboratory, Michigan State University, USA) como un producto liofilizado consistente en una mezcla de los isómeros 2-cis,4-trans y 2-trans,4-trans, prácticamente en proporción 1:1.
- Aldehído abscísico: fue suministrado también por el profesor Jan D. Zeevaart como un producto liofilizado. El producto es una mezcla de los isómeros 2-cis,4-trans y 2-trans,4-trans, aunque el isómero mayoritario es el 2-cis,4-trans.

Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos empleados como cebadores fueron adquiridos comercialmente a la empresa Isogen y se encuentran detallados en la tabla de la página siguiente:

Nombre	Secuencia (5'-3')	Empleo
5'ABA2	GTC TGT GTC AAT AGT GAG GCA	Secuenciación del gen ABA2 para la identificación de las mutaciones en el gen.
5'ABA2-795	AGG AGA CTA TGG TGC GAT TGG	
3'ABA2	AGA CAT GAT AAA TTG GCG GAC	
5'ABA2BRI	CGC GGA TCC GAA TTC ATG TCA ACG AAC ACT GAA TCT	Amplificación y clonación del cDNA del gen ABA2 en el vector de expresión de proteínas pET28a
3'ABA2B	CGC GGA TCC TCA TCT GAA GAC TTT AAA GGA	
5'ABA1	ATG GGT TCA ACT CCG TTT TGC	Secuenciación del gen ABA1 para la identificación de las mutaciones en el gen.
5'ABA1-300	GGC TAA GAA GAA AGG ATT CGA	
5'ABA1-1710	ATT GGA GCT TGA TGA AGC ATG G	
3'ABA1	TCA AGC TGT CTG AAG TAA TTT ATC	
3'ABA1-1700	TTT CCA TGC TTC ATC AAG CTC	
5'AAO3-5	AAA TCT AAC CTT ATA ATT GG	Secuenciación del gen AAO3 para la identificación de las mutaciones en el gen.
5'AAO3-900	CAA AGA CCA TCT TGT AAC AT	
5'AAO3-1800	CAC CTT GCA CTC GGA ATA TA	
5'AAO3-2672	GCT GAG CGAV AAG ATA ATC TCC	
5'AAO3-3550	GAT CCT GAT GAA TAT ACA CTG CC	
5'AAO3-4360	TCC GAT ATT ATT TAT GAC TGT GG	
3'AAO3-1010	ATG TTA TGA AGC TCA GCC AC	
3'AAO3-1880	ATC AAG ACT ACA TAT TCT AT	
3'AAO3-2790	GAA GTA CTG TGA CCC TAG CC	
3'AAO3-3661	GGT ACT CGA GAA ATC CCT CTC	
3'AAO3-4544	CAG TAG TGT ACT CTT CCA TCA TG	
3'AAO3-5139	TGT AAC TTA GCA GCA ACG AGA G	
5'2g47130BRI	CGC GGA TCC GAA TTC ATG TCG GGA CTC AGA TTG GAT	Amplificación y clonación del cDNA de los genes At2g47130 y At3g29250 en el vector de expresión de proteínas pET28a
3'2g47130B	CGC GGA TCC TCA AAT GGG CTT AAC GAC GCT	
3'3g29250B	CGC GGA TCC TCA CGT GGT CAT GAG CTT AAC	
5'35S	CAA CAT GGT GGA GCA CGA CA	Amplificación del intesificador de la transcripción 35S presente en el T-DNA. Obtención de DNA sonda para el análisis "Southern blot"
3'35S	GGG ATC TAG ATA TCA CAT CA	
5'DREB2A	ATG GCA GTT TAT GAT CAG AGT	Amplificación del gen DREB2A (At5g05410). Obtención de DNA sonda para el análisis "Northern blot"
3'DREB2A	TTA GTT CTC CAG ATC CAA GTA	
5'RAB18	ATG GCG TCT TAC CAG AAC CGT	Amplificación del gen RAB18 (At5g66400). Obtención de DNA sonda para el análisis "Northern blot"
3'RAB18	CCA GAT CCG GAG CGG TGA AGC	
5'RD29A	TAA TAT GGA AGT GAC TGA TGA GTC T	Amplificación del gen RD29A (At5g52310). Obtención de DNA sonda para el análisis "Northern blot"
3'RD29A	TTA AAG CTC CTT CTG CAC CGG AAC	
3'GST6	CTA CTG CTT CTG GAG GTC AAT	Amplificación del gen GST6 (At2g47730). Obtención de DNA sonda para el análisis Northern blot
5'GST6	CAC ACA GTA CCT AGC AGA GGA	
5'TUB	CCT GAT AAC TTC GTC TTT GG	Amplificación del gen TUBULINA3 (At5g62700). Obtención de DNA sonda para el análisis Northern blot
3'TUB	GTG AAC TCC ATC TCG TCC AT	
5'NCED3	ATG GCT TCT TTC ACG GCA ACG G	Amplificación del gen NCED3 (At3g14440). Obtención de DNA sonda para el análisis Northern blot
3'NCED3-860	TCA AAA TCG AAC CGA CCA ACG G	

4. Métodos.

4.1. Manipulación y crecimiento de *Arabidopsis thaliana*.

En condiciones de invernadero las plantas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (ecotipo Columbia [Col]) fueron cultivadas en una mezcla 1:2 de vermiculita:turba, y regadas con agua.

Para el cultivo *in vitro* las semillas de *Arabidopsis* fueron esterilizadas en su superficie tratándolas primero con una solución al 70% de etanol durante 15 minutos y después con una solución compuesta de lejía comercial al 2,5% y 0,05% tritón X-100 durante 10 minutos. Finalmente las semillas se lavaron 3 veces con agua MiliQ estéril. La estratificación de las semillas se llevó a cabo después de haber sido esterilizadas, almacenándolas a 4°C durante un periodo de 4 días en oscuridad. La germinación se llevo a cabo en placas petri (Sterilin) que contenían medio de cultivo Murashige-Skoog (MS) compuesto de sales mínimas MS (Sigma), sacarosa al 1% (p/v) y MES al 0,1% (p/v), ajustado el pH a 5,7 con KOH y solidificado con agar al 1% (p/v). Las placas se sellaron con parafilm y se incubaron en una cámara con condiciones controladas de 22°C de temperatura, fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad y una intensidad de luz entre 80-100 $\mu\text{Em}^{-2}\text{sec}^{-1}$.

4.2. Búsqueda y análisis de mutantes.

Rastreo de líneas de A. thaliana mutagenizadas con T-DNA.

La población S₀ (de Selección) de líneas transgénicas fue analizada mediante un rastreo primario con alta densidad de semillas (aproximadamente 4.000 semillas por placa). Este rastreo fue realizado en placas petri de 14 cm de diámetro con medio MS suplementado con 200 mM de NaCl. Las semillas fueron esterilizaron en superficie, puestas en una solución de agarosa 0,1% (p/v) y distribuidas manualmente en la placa petri con un asa de vidrio. A continuación las placas fueron cerradas con parafilm e incubadas en las condiciones descritas en el apartado anterior. Las plántulas fueron consideradas como resistentes si mostraban germinación y establecimiento de plántula (emergencia de la raíz y ambos cotiledones verdes expandidos). Estas plántulas S₁ fueron rescatadas del medio con sal y puestas a crecer en tierra para obtener la siguiente generación.

La generación S₂ fue analizada mediante un rastreo secundario con baja densidad de semillas para confirmar el fenotipo de resistencia a sal observado en el rastreo primario. El rastreo secundario fue llevado a cabo en placas petri de 9 cm de diámetro con medio MS suplementado con NaCl 150 o 200 mM y empleando 200 semillas por placa. Las semillas se esterilizaron en superficie y fueron puestas en placa de forma individual utilizando una micropipeta automática de 1mL.

Análisis genético.

Los mutantes *sre* (*salt resistant*) fueron cruzados entre ellos, con los mutantes deficiente en ABA y con los ecotipos Columbia (Col) y Landsberg *erecta* (La-*er*) descritos en el punto 3.1. Los cruces se realizaron mediante la polinización manual de flores emasculadas.

Para la determinación de la segregación del carácter en los mutantes *sre*, las semillas F₁ del cruce de cada mutante con el ecotipo silvestre fueron sembradas en tierra para obtener la generación F₂ por autopolinización. Las semillas F₂ se recogieron y se determinaron los porcentajes de germinación y establecimiento de plántula a los 5 días en placas con medio MS sólido suplementadas con NaCl 150 mM.

El test de alelismo se realizó empleando las semillas F₁ de los cruces entre mutantes. Las semillas fueron puestas a germinar en placas con medio MS sólido suplementado con NaCl 150 mM, determinándose la germinación a los 5 días.

Análisis de la presencia de T-DNA.

Se extrajo DNA genómico de 20 semillas S₂ de cada mutante crecidas en medio MS líquido (sin agar 1%) durante 15 días y en agitación en la cámara de cultivo *in vitro*. El DNA extraído se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI*, *BamHI* y *HindIII*, cargándose las digestiones en un gel de agarosa 0,8% (p/v). Posteriormente se realizó un análisis “Southern blot” empleando dos sondas específicas del T-DNA (Figura 3.1.):

- **Sonda 35S.** Identifica el extremo derecho del T-DNA. Obtenida por PCR al amplificar el intensificador de la transcripción 35S CaMV que posee el T-DNA con la pareja de cebadores 5'35S y 3'35S.

- **Sonda BAR.** Identifica el gen de selección en planta BAR, localizado en el extremo izquierdo del T-DNA. Se obtuvo digiriendo el vector pSK0115 con los enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, y aislando la banda correspondiente.

Análisis de cosegregación.

El análisis de cosegregación permite determinar si existe ligamiento entre el T-DNA presente en el genoma de la planta mutante y el fenotipo que muestra. Para llevar a cabo este análisis se seleccionaron plantas mutantes homocigotas de la población segregante F₂ del cruce entre el mutante y el ecotipo silvestre. Estas plantas fueron crecidas en medio líquido MS y en agitación durante 15 días en la cámara de cultivo *in vitro*. Se extrajo el DNA genómico de forma individual y aproximadamente 2 µg de DNA genómico fue digerido con la enzima de restricción *EcoRI*. A continuación se realizó un análisis “Southern blot” para determinar la presencia o ausencia de inserciones de T-DNA en el genoma de los individuos mutantes utilizando sondas específicas del T-DNA. Si no existe cosegregación la probabilidad de encontrar el T-DNA en cada planta seleccionada según el fenotipo de resistencia será aproximadamente del 50%. Una frecuencia de detección mayor indicaría que existe ligamiento entre el T-DNA y el fenotipo mutante. Finalmente si el fenotipo mutante está causado por la inserción del T-DNA, todos los individuos F₂ homocigoto mutantes poseerán el T-DNA en su genoma.

Rescate plasmídico.

Esta técnica utiliza el plásmido pUC19 incluido en el T-DNA (Figura 3.1.) para localizar el punto de inserción del T-DNA en el genoma de la planta mutante. Consiste en digerir el DNA genómico del mutante con una enzima de restricción y extraer el plásmido del T-DNA junto con la secuencia genómica flanqueante a la inserción del T-DNA.

Brevemente, 5 µg de DNA genómico de la planta mutante fue digerido con uno de las enzimas de restricción *EcoRI* o *BamHI*. Se limpió la digestión con un volumen de PCI (Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico, en proporción 25:24:1) y el DNA de la fase acuosa se precipito con dos volúmenes de AcNa 0,3 M-Etanol Absoluto. El

DNA se resuspendió nuevamente en agua MiliQ y se recircularizó empleando 10 unidades de la enzima Ligasa T4 (5u/ μ L) (Boehringer) en presencia de tampón de ligación durante toda la noche a 14°C. Seguidamente el DNA se precipitó de nuevo con dos volúmenes de AcNa 0,3 M-Etanol absoluto, se lavó dos veces con etanol 70% y se resuspendió en 20 μ L de agua MiliQ.

Para la electroporación se emplearon 5 μ L de DNA recircularizado y una alicuota de células de *Escherichia coli* cepa XL1-Blue MRF'. Las condiciones de electroporación están descritas en el apartado 4.7. Finalmente los plásmidos aislados fueron enviados a secuenciar.

Cartografía del locus mutante mediante marcadores moleculares (mapeo posicional).

La población de plantas mutantes empleada para el mapeo posicional del *locus* mutante *sre1* fue obtenida cruzando los mutantes homocigotos con plantas del ecotipo silvestre La-*er*. Las semillas F₁ heterocigotas se sembraron en tierra para obtener la siguiente generación por autofecundación. Se seleccionaron los individuos homocigotos mutantes *sre1* de la generación F₂ segregante mediante el análisis de la germinación en medios MS suplementados con NaCl 150 mM. Estos individuos se rescataron del medio con sal y se crecieron de forma individual en medio MS líquido durante 15 días, extrayéndoles a continuación el DNA genómico.

La localización del *locus* mutante fue llevada a cabo analizando el ligamiento con marcadores moleculares localizados en el genoma de *A. thaliana*. Paralelo se desarrollaron nuevos marcadores en base a repeticiones simples y a inserciones/delecciones de las secuencias genómicas conocidas. En el apéndice se listan los marcadores moleculares empleados.

4.3. Ensayos de germinación.

Las semillas y medios fueron preparados como se describe en el apartado 4.1. Para los ensayos en condiciones de estrés se añadió la cantidad correspondiente de NaCl o manitol al medio MS antes de ser autoclavado. Para los ensayos con la hormona vegetal ABA y el compuesto inhibidor de la biosíntesis de giberelinas paclobutrazol se esterilizaron soluciones de ambos compuestos por filtración con

filtros de 25 micras de tamaño de poro (Millex-GV) y se añadieron al medio MS después de haber sido autoclavado. El porcentaje de germinación fue determinado al cabo de 5 y 7 días para el ensayo en condiciones de estrés salino y al cabo de 7 y 9 días para el resto de ensayos.

Para los ensayos de latencia de las semillas se seleccionaron silículas con un desarrollo de semillas de 16-18 días después de la polinización (DAP). Estas semillas fueron separadas de las silículas, esterilizadas en superficie e inmediatamente fueron puestas a germinar en placas MS. Las placas fueron selladas con parafilm y se incubaron en las condiciones descritas anteriormente. El porcentaje de germinación de las semillas fue determinado a los 5, 7 y 10 días.

4.4. Ensayos de transpiración.

Se emplearon 2-3 hojas de roseta de plantas crecidas en invernadero. Las hojas se cortaron a la altura del peciolo y se pesaron. Se dejaron a temperatura ambiente y se siguió la disminución del peso de las hojas realizando una pesada cada 5 minutos. Cada experimento fue realizado por duplicado, con dos replicas por muestra en cada experimento.

4.5. Determinación de ácido abscísico.

En hojas de roseta.

Se tomaron hojas de rosetas de 10-12 plantas de unas 4 semanas. Además de hojas control, se realizaron dos tratamientos: un tratamiento de estrés salino (regando las plantas con NaCl 200 mM durante 5 días) y un tratamiento de estrés por sequía (las plantas sin regar durante 7 días). Las muestras fueron recogidas, congeladas en nitrógeno líquido y liofilizadas. Posteriormente las muestras liofilizadas fueron molidas en un mortero para homogenizarlas. Para determinar la cantidad de ABA presente en las muestras se emplearon 50 mg de material liofilizado, realizándose cada muestra por duplicado.

La extracción del ABA de las muestras se realizó añadiendo 5 mL del tampón de extracción (acetona 80% (v/v), ácido cítrico 500 mg/L, Butilhidroxitolueno (BHT) 100 mg/L) al material liofilizado e incubando las muestras durante 16 horas en

oscuridad a 4°C. A continuación el material fue homogenizado en un politrón a máxima velocidad durante un minuto y centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos. Una alícuota de 1 mL de cada muestra fue evaporada en un “speedvac”. El residuo resultante fue resuspendido en 100 µL del tampón TBS (Tris 50mM, MgCl₂ 1mM, NaCl 150mM ajustado a pH 7,8 con HCl) y analizado directamente o mediante diluciones con TBS para conseguir incluir la medida dentro del rango lineal determinado por la curva patrón de ABA. El ABA presente en cada muestra fue cuantificado mediante el método indirecto ELISA (Walker-Simmons, M. K. et al., 2000). Los anticuerpos contra el ABA fueron suministrados por los Laboratorios IDEX (San Bruno, CA).

En semilla.

Se analizaron muestras control y muestras tratadas con estrés salino. Se esterilizaron en superficie 100 mg de semillas por muestra y se incubaron en medio MS como tratamiento control, o en medio MS suplementado con NaCl 200 mM durante 2 días. Acabado el tratamiento se lavaron las semillas dos veces con agua MiliQ y se molieron en frío con mortero. Para extraer el ABA de las muestras se añadió 2,5 mL del tampón de extracción (acetona 80% (v/v), ácido cítrico 500 mg/L, Butilhidroxitolueno (BHT) 100 mg/L) y se incubó durante 14-16 horas a 4°C en oscuridad. Una alícuota de 1 mL de cada muestra fue evaporada en un speedvac. El residuo resultante fue resuspendido en 100 µL del tampón TBS (Tris 50mM, MgCl₂ 1mM, NaCl 150mM ajustado a pH 7,8 con HCl) y analizado directamente o mediante diluciones con TBS para conseguir incluir la medida dentro del rango lineal determinado por la curva patrón de ABA. El ABA presente en cada muestra fue cuantificado mediante el método indirecto ELISA proporcionado por el estuche de medición “Phytodetek ABA” (Agdia, Indiana, USA) siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante.

4.6. Determinación de prolina.

Se siguió el protocolo descrito en Bates et al., (1973), basado en la reacción que tiene lugar entre dos moléculas de ninhidrina ácida y el grupo amino de un

aminoácido. Como resultado se produce un pigmento púrpura, cuya absorbancia es fácilmente medible a 520 nm con un espectofotómetro.

Brevemente, una hoja de roseta de aproximadamente 50 mg se congeló con nitrógeno líquido y se molió en mortero. Se le añadió 1 mL de una solución 3% de ácido sulfosalicílico (Sigma) para extraer los aminoácidos y se agitó. A continuación se centrifugó y se tomó 0,5 mL del sobrenadante. Este se mezcló con 0,5 mL de ácido acético glacial (AcH) y 0,5 mL de una solución de ninhidrina ácida (ninhidrina ácida 2,5% (p/v), AcH 60% (v/v), H₃PO₄ 2,5 M). La mezcla se incubó durante 1 hora a 100°C y posteriormente se paró la reacción incubando la mezcla durante 10 minutos en hielo. Finalmente se realizó la extracción de los productos de la reacción con 1 mL de tolueno y se realizó la medición de la absorbancia de los productos de reacción a 520 nm. La cuantificación de los niveles de prolina de las muestras se realizó mediante la comparación con una curva patrón con las concentraciones de 0, 10, 20, 30, 70 nmoles de prolina.

4.7. Manipulación y cultivo de *Escherichia coli*.

Se emplearon los procedimientos habituales de cultivo y manipulación (Sambrook, J. and Russell, D., 2000). El medio LB para el crecimiento contenía triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5 % (p/v) y NaCl 1% (p/v), ajustado a pH 7 con NaOH y esterilizado en autoclave. Para preparar medio LB sólido se añadió agar 1% (p/v) al medio antes de ser esterilizado en autoclave. Los distintos antibióticos utilizados fueron esterilizados por filtración y añadidos a los medios después de ser autoclavados.

El medio SOC contenía triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0,5 % (p/v), NaCl 0,05% (p/v) y KCl 25 mM, ajustado a pH 7 con NaOH y esterilizado en autoclave. Posteriormente se añadía MgCl₂ y glucosa en soluciones estériles hasta unas concentraciones finales de MgCl₂ 10 mM y glucosa 20mM.

Preparación de células competentes.

Método químico con choque térmico.

Las células competentes para la transformación por choque térmico fueron preparadas según se describe en Sambrook et al., (2000). La preparación de las

células competentes se llevó a cabo creciendo las bacterias en 300 mL de medio de cultivo LB hasta una A_{660} de 0,3-0,4. Tras recoger las células por centrifugación en frío, se resuspendieron en 60 mL de una solución fría que contenía RbCl 0,1 M, MnCl₂ 50 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol 15 % (v/v), acetato potásico (pH 7,5) 30 mM, ajustada a pH 5,8 con ácido acético 0,2 M. Tras 30 minutos de incubación en hielo, las células eran nuevamente recogidas por centrifugación en frío y resuspendidas en 10 mL de una solución fría conteniendo RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM, glicerol 15 % (v/v) y MOPS (ácido 2-(N-morfolino)propanosulfónico) 10 mM, ajustada a pH 6,8 con NaOH. Tras 15 min de incubación en hielo, las células se distribuían en alícuotas de 100 μ L (para una transformación) y se guardaban congeladas a -80°C .

Ocasionalmente se empleo un protocolo más simplificado. Brevemente, se inoculo 100 mL de medio LB con 1 mL de cultivo saturado de bacterias, y se dejo crecer hasta alcanzar una A_{660} de 0,4. A partir de este punto se manejaron las células en hielo y las soluciones preenfriadas. Las células se recogieron por centrifugación a 4.000 rpm durante 10 minutos, se lavaron con 50 mL de una solución de CaCl₂ 50 mM y se recogieron de nuevo por centrifugación. Seguidamente las células se resuspendieron en un 1 mL de una solución CaCl₂ 50 mM, glicerol 10% (v/v), y finalmente las células se distribuyeron en alícuotas de 100 μ L, guardándose a -80°C a continuación.

Electroporación

Las células competentes para electroporación se prepararon de la cepa bacteriana XL1-BlueMRF' según el método habitual descrito en Sambrook et al, (2000) aunque con algunas modificaciones. A partir de una colonia se inocularon 4 mL de medio LB con el antibiótico tetraciclina (50 μ g/mL), y se creció el cultivo hasta saturación. Este cultivo se distribuyó en 100 mL de medio LB líquido sin antibiótico, creciendo las bacterias hasta una A_{660} de 0,6-0,8 y seguidamente las células fueron recogidas mediante centrifugación a 4.000 rpm durante 10 minutos. A partir de este punto se manejaron las células en hielo y las soluciones preenfriadas. Las células se lavaron dos veces con 400 mL de agua MiliQ estéril y una vez con 50 mL de glicerol 10% (v/v), siendo recogidas después de cada lavado por centrifugación. Finalmente las células se resuspendieron en 2 mL de glicerol 10% y se distribuyeron en alícuotas de 100 μ L que se guardaron a -80°C .

Transformación.

Método de choque térmico.

Primeramente se añadió el plásmido a transformar a una alícuota de células competentes y se incubó 10 minutos en hielo. Seguidamente se llevó a cabo la transformación mediante el método de choque térmico empleando las condiciones habituales de choque de 45 segundos a 42°C (Sambrook, J. and Russell, D., 2000). Después del choque térmico las células se diluyeron en 1 mL de medio LB, se crecieron en agitación durante 1 hora a 37 °C y se extendieron en una placa de medio LB sólido con el antibiótico de selección del plásmido.

Electroporación

Se añadió el plásmido a transformar a una alícuota de las células competentes y la mezcla se pasó a una cubeta de electroporación fría de 1 mm de separación entre electrodos. La electroporación fue llevada a cabo empleando el aparato Gene Pulser™ (Bio-Rad) con las condiciones de 200 Ω , 25 μ F y 1,7 kV. Después de la electroporación, las células se diluyeron en 1mL de medio SOC, se incubaron durante 1 hora a 37 °C en agitación y se extendieron en medio sólido LB con el antibiótico de selección.

4.8. Manipulación y cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*.

Se emplearon los procedimientos habituales de cultivo y manipulación descrito en Sambrook et al, (2000). El medio LB para el crecimiento contenía triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5 % (p/v) y NaCl 1% (p/v), ajustado a pH 7 con NaOH y esterilizado en autoclave. Para preparar medio LB sólido se añadió agar 1% (p/v) antes de ser esterilizado en autoclave. Los distintos antibióticos utilizados fueron esterilizados por filtración y añadidos al medio después de ser autoclavado.

Preparación de células competentes

Para la preparación de las células competentes de *A. tumefaciens* se realizó el protocolo ya descrito para *E. coli* pero con algunas modificaciones. Las células competentes se prepararon partiendo de un cultivo de 10 mL de medio LB con ampicilina (100 μ g/mL) crecido durante 2 días a 28° C. 1 mL de este cultivo se

empleo para inocular 100 mL de medio LB sin antibiótico, que fue crecido a 28°C en agitación durante 24 horas. Las células fueron recogidas por centrifugación a 4.000 rpm durante 10 minutos y lavadas 2 veces con agua MiliQ estéril. Finalmente las células fueron resuspendidas en 4 mL de glicerol 10% frío, y guardadas a -80°C en alícuotas de 100 µL.

Transformación mediante electroporación.

El protocolo de transformación empleado fue el mismo que el descrito para *E.coli*. Sin embargo, las condiciones de electroporación fueron en este caso de 1000 Ω, 25 µF y 2 kV en cubetas de 2 mm de separación entre los electrodos.

4.9. Transformación de *A. thaliana* mediada por *A. tumefaciens*.

El material vegetal fue preparado sembrando 15 semillas de *A. thaliana* en una maceta de 12 cm de diámetro. Las plantas se crecieron en invernadero hasta que la inflorescencia primaria alcanzó alrededor de 10 cm de longitud. En ese momento se decapitó el tallo de la inflorescencia primaria para favorecer la aparición de inflorescencias secundarias. La transformación del material vegetal se realizó cuando aparecieron las primeras flores en las inflorescencias secundarias, aproximadamente una semana después de haber decapitado la inflorescencia primaria.

Para la transformación se generó en primer lugar un cultivo saturado de *A. tumefaciens* transformado con el vector a partir de una colonia. Con 1 mL de este cultivo saturado se inocularon 200 mL de medio LB con el antibiótico de selección kanamicina (50 µg/mL) y se incubó el cultivo durante 24 horas en agitación a 28°C. Las células fueron recogidas mediante centrifugación en frío a 4.000 rpm durante 10 minutos y posteriormente fueron resuspendidas en 500 mL de solución de transformación compuesta por sacarosa 5% (p/v) y detergente Silwet L-77 0,02% (v/v) (Lehle seeds, USA)

La solución de transformación con el *A. tumefaciens* se colocó en un recipiente de plástico, y sobre él se colocó en forma invertida la maceta con las plantas de *A. thaliana* a transformar, quedando la parte aérea de las plantas sumergida en la solución durante 20 segundos aproximadamente. Posteriormente, las plantas transformadas se cubrieron con bolsas de plástico y se llevaron al invernadero.

Después de 24 horas tapadas se eliminaron las bolsas y las plantas fueron crecidas en el invernadero hasta recoger la población de semillas transgénicas T_0 .

Selección de líneas transgénicas.

Las semillas transgénicas T_0 fueron sembradas en placas petri de 14 cm de diámetro con medio sólido MS. Para la selección de las líneas transgénicas se suplementaron las placas con los antibióticos cefotaxima (100 μ g/mL), antibiótico que impide el crecimiento de microorganismos contaminantes, y kanamicina (50 μ g/mL) como el antibiótico de selección de las líneas transgénicas. Después de dos semanas, las plántulas T_1 kanamicina resistentes fueron rescatadas y puestas a crecer en maceta para obtener la generación T_2 . Las semillas T_2 fueron ensayadas en placas con medio de selección para comprobar la segregación del carácter resistencia a kanamicina. De aquellas líneas transgénicas cuyas semillas T_2 mostraban una segregación del tipo 3:1 (resistente:sensible) para el carácter, se pasaron unas 12 plántulas T_2 resistentes a maceta para obtener la siguiente generación T_3 . Las semillas T_3 se ensayaron en medio con kanamicina para identificar aquellas líneas transgénicas homocigotas.

4.10. Técnicas de DNA recombinante.

Se emplearon las técnicas habituales y básicas de modificación del DNA (digestión con enzimas de restricción, ligación, etc) de acuerdo con los protocolos estándar (Sambrook, J. and Russell, D., 2000).

Síntesis y clonación de cDNA.

Los cDNA empleados se sintetizaron a partir de RNA mensajero del ecotipo Col con la transcriptasa en reverso y cebadores específicos. Seguidamente se amplificó el cDNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se clonó en el plásmido pSKBluescriptSK+ (Stratagene).

Para la síntesis de la primera cadena de cDNA se preparó una primera mezcla que contenía el RNA mensajero, tampón de la transcriptasa en reverso y 0,1 μ M del cebador específico que permite retrotranscribir la molécula de RNA. Esta mezcla se

incubó 15 minutos a 50°C para que tuviera lugar el anillamiento específico del cebador con el RNA mensajero. Seguidamente se añadió una segunda mezcla que contenía 1 unidad del inhibidor de las RNasas RNasin (Boehringer), 20 nmoles de cada uno de los cuatro desoxirribonucleotidos trifosfato y 10 unidades de la enzima polimerasa en reverso RT M-MuLV (Boehringer) y la mezcla se incubó 60 minutos a 37°C para que tuviera lugar la polimerización.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un volumen final de 50 µl que contenía tampón de la reacción en cadena de la polimerasa (Biotools), 20 nmoles de cada uno de los cuatro desoxirribonucleotidos trifosfato, 0,4 µM de cada uno de los cebadores específicos para amplificar la molécula de cDNA, 1/10 de la reacción de la polimerasa en reverso y 1 unidad de Taq polimerasa (1u/µL, Biotools). El producto se visualizó en gel de agarosa 0,8% TAE1X, se purificó y se clonó en el vector pSKBluescriptSK+ (Stratagene).

El cDNA clonado fue amplificado por PCR empleando cebadores específicos con sitios de restricción *Bam*HI en los extremos de su secuencia para permitir su posterior clonación en fase en el vector de expresión pET28a (Novagen) digerido también con la enzima de restricción *Bam*HI. Varios clones diferentes fueron enviados a secuenciar para comprobar la identidad de los fragmentos clonados.

4.11. Manipulación y análisis de ácidos nucleicos.

Preparación de DNA plasmídico.

Escherichia coli

Se empleó el método de lisis alcalina con calor Studier, F. W., 1991. Las células del cultivo bacteriano recogidas por centrifugación se resuspendieron en solución de lisis (NaOH 0,1M, EDTA (pH 8) 10mM, SDS 2% (p/v)) y se calentaron durante 2 minutos a 95°C. A continuación se añadieron las soluciones de MgCl₂ 1M y AcK 5M (equilibrado a pH 5 con ácido acético glacial) para neutralizar la solución, se agitó la mezcla y se precipitaron los restos celulares mediante centrifugación. Se recogió el sobrenadante y el DNA plásmidico fue precipitado incubando en frío con dos volúmenes de etanol absoluto. Finalmente, el DNA plásmidico fue resuspendido en 30 µl de TE 1X (Tris 10mM, EDTA (pH 8) 1mM).

Adicionalmente se empleo el estuche de biología molecular “Concert-Rapid plasmid miniprep system” (GibcoBRL-Life Technologies) siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante, para aislar los plasmidos que iba a ser enviados a secuenciar.

Agrobacterium tumefaciens.

Las células de un cultivo saturado de *Agrobacterium* crecido en medio LB con kanamicina (50µg/mL) fueron recogidas por centrifugación y resuspendidas en tampón de lisis preenfriado (Glucosa 50 mM, Tris-HCl (pH 7,5) 25 mM, EDTA (pH 8) 10 mM, lisozima (4mg/mL)). La mezcla se agitó vigorosamente y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadió a la suspensión de células la solución de lisis (NaOH 0,2 M, SDS 1% (p/v)), incubándose a temperatura ambiente durante 30 minutos más. La mezcla de lisis fue neutralizada con AcK 3M (pH 4,8) y los restos celulares precipitados mediante centrifugación. El sobrenadante se extrajo con PCI (Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamilico, en proporción 25:24:1) y se precipitó el DNA plásmidico en frío con etanol absoluto. El DNA plasmídico se lavó con etanol 70% (v/v) y se resuspendió en TE1X.

Preparación de DNA genómico de Arabidopsis thaliana.

Se empleo una adaptación del método del CTAB (bromuro de cetil trimetilamonio; Murray, M. G. and Thompson, W. F., 1980) descrita en McKinney, E. C. et al., 1995). Brevemente, 1 gramo de material vegetal fue congelado con nitrógeno líquido y homogenizado en mortero. Al homogenizado se le añadió 2 mL de tampón de extracción CTAB2X (CTAB 2 % (p/v), Tris-HCl (pH 8) 100 mM, PVP (Mr. 40.000) 1 % (p/v), EDTA (pH 8) 20 mM, NaCl 1,4 M) y se incubó 10 minutos a 60°C. La mezcla fue extraída con 2 mL de Cloroformo: Alcohol Isoamilico (24:1). Se tomo la fase acuosa resultante y se le añadió 0,1 volúmenes de la solución CTAB10X (CTAB 10% (p/v), NaCl 0,7 M). La mezcla se incubó 2 minutos a 65°C y a continuación se le añadieron dos volúmenes de agua MiliQ fría para inducir la precipitación del complejo CTAB/DNA-RNA. Se incubó 15 minutos en hielo y se recogió el complejo precipitado mediante centrifugación. La precipitación específica del DNA se consiguió resuspendiendo el precipitado anterior en 0,4 mL de NaCl 1M e incubando en frío con 0,8 mL de etanol absoluto. El DNA precipitado se lavo dos

veces con etanol 70% para quitar el exceso de sal y fue resuspendido en 20 μ L de TE 0,1X (Tris 1mM, EDTA (pH 8) 0,1mM).

Aislamiento de RNA de Arabidopsis thaliana.

Purificación de RNA total.

El material vegetal empleado para el aislamiento del RNA fueron habitualmente hojas de roseta de plantas crecidas en invernadero. Sin embargo hubo experimentos en los que se empleo otro material vegetal. En el experimento con los diferentes tratamientos de estrés se emplearon plántulas crecidas en cultivo líquido durante 12 días a las que se les añadió el estrés correspondiente durante los tiempos indicados. Acabado el tratamiento, el material vegetal se lavó tres veces con agua MiliQ para evitar interferencias en la extracción del RNA y fue congelado en nitrógeno líquido. En el análisis de expresión en diferentes órganos el material vegetal se obtuvo de plantas crecidas en invernadero, salvo el de raíz, que fue obtenido de plantas crecidas en cultivos líquidos. Para el análisis de expresión en semillas se emplearon de 200 mg de semillas que fueron esterilizadas en superficie y embebidas en medio MS líquido con y sin estrés.

Independientemente del tipo de material, el protocolo de extracción de RNA fue el siguiente. Un gramo de material congelado se molió en mortero. Se le añadió 1 mL de TCES (Tris 0,2 M, NaCl 0,2 M, EDTA (pH 8) 50mM, SDS 2% (p/v), ajustado a pH 8 con HCl) y 1 mL de PCI precalentados a 50°C y se agitó. Se incubó 10 minutos a 50°C y a continuación las fases fueron separadas mediante centrifugación. Se recogió la fase acuosa y se extrajo con un volumen de Cloroformo:Alcohol Isoamílico (en proporción 24:1). El RNA fue separado de la fase acuosa precipitándolo específicamente con un volumen de LiCl 6M durante 30 minutos a -20°C. El RNA fue recogido por centrifugación, lavado con etanol 70% y resuspendido en agua MiliQ tratada con DEPC (dietil pirocarbonato). La valoración de la integridad y la cuantificación aproximada del RNA se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa 1% (p/v) en tampón TAE1X (Tris 40mM, AcH 20 mM, EDTA 2mM) mediante comparación con un patrón de rRNA (Boehringer).

Purificación del RNA mensajero.

El RNA mensajero se purificó del RNA total empleando el estuche de biología molecular “Dynabeads biomagnetic separation system”(DynaL, Oslo). Este estuche está compuesto por bolitas magnéticas de poliestireno que poseen un oligo(dT)25 unido covalentemente a su superficie. El RNA mensajero se une por su cola poli(A)+ al oligo(dT)25 de las bolitas y ambos se separan de la solución con el RNA total empleando un imán. Para la purificación se siguieron las instrucciones suministradas por el fabricante.

Electroforesis de DNA.

Habitualmente se emplearon geles de agarosa 0,8% (D-1, bajaEEO, Pronadisa) fundida en tampón de electroforesis TAE1X (Tris 40mM, AcH 20 mM, EDTA 2mM). Tanto al tampón de electroforesis como al gel se les añadió Bromuro de Etidio (BrEt) 0,005% (p/v) (Sigma). Para distinguir los fragmentos de DNA de los marcadores moleculares SSLP se emplearon geles de agarosa al 3%.

Como tampones de carga se utilizaron:

- Solución 6X naranja compuesta por glicerol 50% (v/v), Tris-HCl (pH 8) 60 mM, EDTA 6 Mm, Orange G (Sigma) 0,35% (p/v).
- Solución 6X azul cuya composición es sacarosa 40% (p/v), azul de bromofenol (Sigma) 0,25%(p/v), y EDTA 0,1M.

Como marcadores de tamaño molecular se utilizaron los patrones comerciales λ /HindIII y 1kb (GibcoBRL-Life Technologies).

Para la purificación de fragmentos de DNA en gel se usó el estuche de biología molecular “Concert-Rapid Gel Extraction System” (GibcoBRL-Life Technologies) siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante.

Electroforesis de RNA.

Condiciones no desnaturalizantes.

Los geles no desnaturalizantes fueron geles de agarosa 1% TAE1X y se emplearon para la cuantificación y visualización de la integridad del RNA total aislado. Para evitar la degradación del RNA se lavó todo el material con agua y

jabón, y todas las soluciones se hicieron justo antes de usarse con agua MiliQ recién obtenida.

Condiciones desnaturalizantes.

Los geles empleados en condiciones desnaturalizantes fueron geles de agarosa 1% en tampón MAE1X (MOPS 20 mM, AcNa 5mM, EDTA 1mM, ajustado a pH 7 con NaOH) con formaldehído 2,2% (v/v) para desnaturalizar el RNA. Como tampón de electroforesis se utilizó tampón MAE1X con 1,1% de formaldehído.

Las muestras de RNA fueron mezcladas con el tampón de carga 1,25X cuya composición es formamida 55% (v/v), formaldehído 20% (v/v), MAE10X 12,5% (v/v), glicerol 8%(v/v), azul de bromofenol 0,05%(p/v) y BrEt 0,001% (p/v). Como marcador de pesos moleculares se utilizó el marcador comercial “RNA ladder” (GibcoBRL-Life Technologies).

Análisis “Southern blot”.

Se utilizaron 2 µg de DNA genómico de *Arabidopsis* para cada digestión enzimática. La separación de los fragmentos de restricción de la digestión enzimática se realizó en un gel de agarosa 0,8 %TAE1X corrido durante 14-16 horas a un voltaje de 20V. El DNA fue desnaturalizado y transferido a membrana de nailon (Hybon-N+, Amershan) mediante la técnica de transferencia de DNA en medio alcalino (Sambrook, J. and Russell, D., 2000). A continuación el DNA fue fijado a la membrana por radiación ultravioleta y se prehibrido con tampón de hibridación (Na₂HPO₄ (pH 7,2) 0,4 M, EDTA 1mM, SDS 7% (p/v)) durante 10 minutos.

La detección del DNA en la membrana se realizó mediante la hibridación de la membrana con la sonda radioactiva durante 14-16 horas a 65°C en tampón de hibridación. Posteriormente se realizaron los lavados del filtro con la solución de lavado (Na₂HPO₄ (pH 7,2) 40 mM, EDTA 1mM, SDS 5% (p/v)), 2 lavados de 30 minutos a 65°C y uno final de 5 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente la membrana fue sellada con plástico y revelada mediante autoradiografía. Habitualmente se empleaba primero el sistema analizador BAS-1500 (Fujifilm, España), con placas de imagen Bas-IP, MP 2040S y posteriormente se exponía la membrana con película Hyperfilm (Amersham Pharmacia) a -80 °C en presencia de

pantallas intensificadoras. Estas películas fueron reveladas en una procesadora automática M35X-Omat (Kodak).

Análisis “Northern blot”.

El RNA fue separado en geles desnaturalizantes de agarosa con formaldehído y transferido a membrana de nailon (Hybond-N, Amersham) por capilaridad en tampón SSC10X (1,5 M NaCl, 0,15 M citrato sódico, ajustado a pH 7 con HCl). El RNA se fijó a la membrana con ultravioleta y se prehibridó con tampón de hibridación (Na_2HPO_4 (pH 7,2) 0,4 M, EDTA 1mM, SDS 7% (p/v)) durante 10 minutos. La detección del RNA se realizó mediante la hibridación de la membrana con la respectiva sonda marcada radioactivamente en tampón de hibridación durante 14-16 horas a 65°C. La sonda no unida específicamente fue eliminada del filtro mediante dos lavados de 5 minutos a 65°C con la solución SSC 4X, SDS 0,1% (p/v) y seguidamente se realizaron dos lavados con la solución SSC 0,4X, SDS 0,1% (p/v), un lavado de 5 minutos a 65°C y otro a temperatura ambiente. Después se selló el filtro con plástico y se realizó la autoradiografía del mismo modo que en el punto anterior.

Marcaje radioactivo de sondas.

Normalmente el DNA molde empleado para la síntesis de las sondas radioactivas fue obtenido mediante amplificación por PCR de DNA genómico con la pareja de cebadores específicos para cada sonda. El producto de PCR fue visualizado en geles de agarosa 0,8% TAE 1X y purificado utilizando el estuche de biología molecular “Concert-Rapid Gel Extraction System” (GibcoBRL-Life Technologies) siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante.

Las sondas empleadas en los experimentos de “Southern” y “Northern blots” fueron sintetizadas mediante el método de marcaje con hexanucleótidos (“random-priming”) (Sambrook, J. and Russell, D., 2000). Como DNA molde se emplearon entre 50 y 100 ng de DNA por sonda. El DNA molde se desnaturalizó a 95°C durante 10 minutos, añadiendo seguidamente la solución de marcaje que contenía MES 20 mM, DTT 1mM, MgCl_2 5mM, 1 μg de hexanucleotidos al azar (“hexanucleotides random primers”, Boehringer), 20 μM de dATP, 20 μM de dGTP, 20 μM de dTTP

(como nucleótidos fríos). A continuación se añadieron 10 unidades del fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli* (Boehringer, 10u/ μ L) como enzima responsable de la síntesis de la sonda, BSA para estabilizar la enzima y 2000 kBq de [α - 32 P]dCTP (110 TBq/mmol, Amersham) como nucleótido radioactivo, incubando seguidamente la reacción de marcaje entre 6 y 10 horas a temperatura ambiente. Después de este tiempo se añadió TE1X para detener la reacción, se desnaturalizó nuevamente el DNA y se añadió al tubo de hibridación con la membrana a hibridar.

4.12. Expresión, preparación y análisis de proteína recombinante.

Expresión y purificación.

La obtención de la proteína recombinante se llevó a cabo empleando el vector de expresión de *E. coli* pET28a (Novagen). Este vector añade a la proteína recombinante una cola de histidinas capaz de unirse y ser retenida por iones Ni^+ , lo cual permite la purificación de la proteína recombinante a partir de extractos crudos en columnas con una resina de agarosa Ni-NTA (Quiagen, CA) previamente cargada con NiSO_4 .

Siguiendo las especificaciones del fabricante se transformó la cepa de *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido pET28a en el que se había subclonado el cDNA de la proteína a purificar. Para producir la proteína recombinante se inocularon 100 mL de medio LB con kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con 1 mL de un cultivo saturado de bacterias con el plásmido de expresión de la proteína recombinante y se incubó a 37°C en agitación. Las bacterias se crecieron hasta que el cultivo poseía una A_{660} de 0,5-0,6. En este punto de crecimiento exponencial bacteriano se indujo la producción de la proteína recombinante añadiendo IPTG (Isopropil β -D-TioGalactopiranosido) al medio hasta una concentración final de 1mM. Pasadas entre dos y tres horas de incubación las células se recogieron por centrifugación y se guardaron a -80°C.

Para la purificación, las células descongeladas se resuspendieron en el tampón de sonicación/equilibrado (fosfato potásico (pH 7,2) 50mM, KCl 250 mM, Tween-20 0,1 % (v/v), β -mercaptoetanol 10mM, glicerol 10 % (v/v)), centrifugándose a continuación. Las células volvieron a resuspendirse en tampón de sonicación/equilibrado y fueron sometidas a sonicación para romper las membranas celulares utilizando 3 pulsos de 20 segundos a una potencia del 50% en un sonicador

Branson 250, manteniendo las muestras en hielo. Posteriormente se centrifugaron las muestras para precipitar los restos celulares y el sobrenadante se aplicó a una columna que contenía la resina de agarosa Ni-NTA (Quiagen,CA). Seguidamente se realizó una serie de lavados de la columna con la solución de lavado (fosfato potásico (pH 7,2) 50mM, KCl 250 mM, Tween-20 0,1 % (v/v), β -mercaptoetanol 10mM, glicerol 20 % (v/v), imidazol 30 mM, ajustado el pH a 7,2 con HCl). El imidazol compite por la unión a los iones níquel de la columna, y a esta concentración elimina las uniones inespecíficas de otras proteínas a la columna, pero no puede deshacer la unión de los iones de Ni^+ de la columna con la cola de histidinas. La elución de la proteína recombinante se llevó a cabo en 5 fracciones, de 200 μl cada una, con tampón de elución (fosfato potásico (pH 7,2) 50mM, KCl 250 mM, Tween-20 0,1 % (v/v), β -mercaptoetanol 10mM, glicerol 20 % (v/v), imidazol 250 mM, ajustado el pH a 7,2 con HCl). El aumento de la concentración de imidazol a 250 mM provoca la sustitución de la cola de histidinas de la proteína recombinante por el imidazol en la unión con los iones de níquel de la columna.

Las fracciones eluidas recolectadas fueron entonces analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS/PAGE) y análisis “Western blot” para identificar aquellas fracciones que contenían la proteína recombinante. La proteína recombinante obtenida fue cuantificada en cada una de las fracciones por el método de Bradford (Bradford, M. M., 1976; Kruger, N. J., 1994) empleando el reactivo de Bradford (Biorad) y comparando con un patrón de γ -globulina bovina (BSA).

Finalmente se regeneró la resina de la columna para un nuevo uso lavándola una vez con solución de regeneración (AcH 0,2M, glicerol 30% (v/v)) y un posterior lavado con agua MiliQ. Las columnas fueron almacenadas en etanol 30% a 4°C.

Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Las proteínas recombinantes fueron separadas en función del tamaño mediante electroforesis vertical en mini-geles desnaturizantes de poliacrilamida/SDS de 1,5 mm de grosor, utilizando el sistema de Laemmli para la compactación de las muestras (Laemmli, U. K., 1970). El gel constaba de dos partes: una superior de aproximadamente 3 cm de longitud en la que se cargan las muestras, compuesta por Tris 125 mM, acrilamida-bisacrilamida (19:1) 3,4 % (v/v), SDS 0,1 %, llevado a pH 6,8 con HCl, y que sirve para que las muestras se concentren; y otra parte inferior,

ocupando la mayor parte del gel, compuesta por Tris 375 mM, acrilamida-bisacrilamida (19:1) 10 % (v/v), SDS 0,1 %, llevado a pH 8,8 con HCl, y que sirve para separar las proteínas en función de su tamaño.

La polimerización de los mini-geles se realizó entre dos vidrios con separadores de 1,5 mm mediante la adición de TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina) y APS (persulfato amónico) a concentraciones finales de 0,067 % (v/v) y 0,05 % (p/v), respectivamente. Las electroforesis se llevaron a cabo verticalmente en un sistema *Mini-PROTEAN®3* (BioRad), con un tampón de electroforesis Tris-glicina (14,4 g glicina/L) pH 8,3, SDS 0,1 % (p/v).

La visualización de las proteínas en el gel se realizó mediante la tinción con una solución de colorante Coomassie Blue R (metanol 50 %, AcH 10 % y Coomassie Blue R 0,05 % (p/v)). Los lavados para eliminar el exceso de colorante en el gel se realizaron con una solución 10 % metanol y 10 % AcH.

Análisis “Western blot”.

La detección inmunológica con anticuerpos específicos de las proteínas recombinantes resueltas mediante SDS/PAGE se realizó mediante su transferencia a membranas de nitrocelulosa, técnica comúnmente conocida como “Western blot” (Burnette, W. N., 1981). La transferencia a membranas de nitrocelulosa (Millipore) de las proteínas se llevó a cabo situando la membrana en contacto con el gel y efectuando una electroforesis perpendicular al gel en el tampón de Dunn de transferencia con carbonato (CO_3HNa 10 mM, CO_3Na_2 3 mM; Dunn, S. D., 1986) conteniendo metanol 15 % (v/v) y SDS 0,01 % (p/v). La transferencia de las proteínas recombinantes a la membrana fue visualizada mediante la tinción de la membrana con una solución colorante Ponceau S (Ponceau S 0,1 % (p/v) y AcH 1%). Seguidamente se eliminó el colorante de la membrana y se incubó con solución de bloqueo para reducir la unión del anticuerpo a zonas inespecíficas de la membrana compuesta por tampón TBS (NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,6) conteniendo leche desnatada 2 % (p/v) en polvo como agente bloqueante.

Tras la incubación de la membrana con solución de bloqueo, se llevó a cabo la reacción con el anticuerpo primario monoclonal Anti-T7 (Promega) diluido en la misma solución de bloqueo (dilución 1:10.000), durante una hora a temperatura ambiente con agitación suave. La membrana fue entonces lavada varias veces con

solución de bloqueo y una última vez con tampón TBS, tras lo cual se realizaba la incubación con el anticuerpo secundario, unido a fosfatasa alcalina (Anti-Mouse IgG-AP conjugate, Promega) (Blake, M. S. et al., 1984), y diluido en tampón TBS (dilución 1:5.000), incubación que se llevó a cabo durante media hora a temperatura ambiente y con agitación suave. Tras varios lavados cortos con tampón TBS y un último lavado con tampón de fosfatasa alcalina (NaCl 0,1 M, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 0,1 M, pH 9,0), se llevó a cabo la reacción de color de la fosfatasa alcalina incubando la membrana en 10 mL recién preparados de tampón de fosfatasa alcalina con 66 μ L de una solución al 5 % de NBT (cloruro de tetrazolio nitroazul) en 70 % (v/v) dimetilformamida, y 66 μ L de una solución al 2,5 % de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, sal de toluidina) en dimetilformamida pura, parando la reacción de color con agua abundante.

Ensayo enzimático.

Ensayo enzimático de la actividad alcohol deshidrogenasa.

El ensayo de la actividad alcohol deshidrogenasa de la proteína recombinante se realizó en 1 mL de un medio que contenía K₂HPO₄ (pH 7,2) 100 mM, NAD⁺ 100 μ M como coenzima, y diferentes concentraciones del sustrato. El ensayo fue incubado a 25°C desde 0 hasta 120 minutos. La reacción fue visualizada empleando el incremento de A₃₄₀ nm debido a la reducción de NAD⁺ a NADH mediante un espectrofotómetro de barrido de ultravioleta-visible Hewlett-Packard 8453. Se realizaron dos ensayos independientes para las diferentes concentraciones de sustrato analizadas (10, 20, 60 y 10 μ M).

El análisis de regresión se llevo a cabo empleando el programa Microsoft Excel, calculándose la velocidad inicial de la reacción, V₀, para cada concentración de sustrato. La K_m fue calculada mediante la representación de dobles inversos, 1/V₀ frente a 1/S, para cada una de las concentraciones de sustrato analizada.

Determinación de los productos de la reacción.

Para determinar los productos de la reacción enzimática, se extrajo dos veces la mezcla de reacción con 1 mL de acetato de etilo. Estas dos fracciones fueron

combinadas, concentradas y analizadas mediante HPLC-espectrometría de masas (HPLC-MS).

El análisis de HPLC-espectrometría de masas fue llevado a cabo utilizando un cromatógrafo Waters 1525 acoplado directamente a un espectrómetro de masas ZD Micromass (Waters, Milford MA) en el modo de ionización negativo de “electrospray” bajo los siguientes parámetros: voltaje de capilaridad de 2.500 V; voltaje del cono de 40 V; temperatura del bloque fuente de 100°C; temperatura de desolvatación de 300°C. Las muestras fueron inyectadas en una columna de fase reversa del tipo C18 Symmetry (5 µm de tamaño de partícula, 4,6 X 150mm; Waters) equilibrada con ácido acético 1%. La columna fue eluida con un gradiente lineal entre el solvente A (ácido acético 1%) y el solvente B (metanol) a un flujo de 1mL/min aplicado durante 20 minutos. La elución de la columna fue seguida mediante un detector de absorbancia Waters 486 a una longitud de onda de 285 nm. El espectro de cromatografía líquida-espectrometría de masas fue realizado en el rango de carga de masa de 100 a 300

5. Resultados.

5.1. Rastreo de las líneas de T-DNA

Condiciones de búsqueda.

Tal como se describe en el capítulo de materiales y métodos, las líneas transgénicas empleadas en este estudio fueron construidas por el laboratorio del Dr. D. Weigel (The Salk Institute, La Jolla, CA) en el ecotipo silvestre Col empleando un T-DNA que posee 4 secuencias 35S amplificadoras de la transcripción del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Weigel, D. et al., 2000). De este modo, los mutantes obtenidos pueden ser tanto mutantes recesivos por la inserción del T-DNA en un gen como mutantes dominantes debidos a la sobreexpresión de un gen causado por las secuencias 35S. La búsqueda de mutantes resistentes a sal fue dividido en dos fases: un rastreo primario a alta densidad de semillas para identificar posibles mutantes y un rastreo secundario en el que se analizaron y confirmaron individualmente las líneas candidatas obtenidas en el rastreo primario.

En primer lugar se determinaron las condiciones del rastreo primario a alta densidad de semillas. Los ensayos se encaminaron a determinar la concentración mínima de NaCl a la que el ecotipo silvestre Col no es capaz de germinar y establecer la plántula y la cantidad adecuada de semillas que debían emplearse. Para la determinación de las condiciones del rastreo se empleo una población de semillas del ecotipo silvestre. Los resultados mostraron que había una correlación muy fuerte entre la densidad de semillas y la concentración de NaCl presente en el medio. Para una cantidad de 2.000 semillas, distribuidas prácticamente de forma individual en una placa de 14 cm de diámetro, la concentración de NaCl a la cual el ecotipo silvestre no germinaba fue de 150 mM. Para una cantidad de 4.000 semillas, con una distribución en grupos de 10-30 semillas, la concentración mínima a la cual el ecotipo silvestre no germinaba fue de NaCl 200 mM. A mayor número de semillas por placa los resultados variaban enormemente entre las réplicas realizadas. De este modo, las condiciones elegidas para el rastreo primario de las líneas transgénicas fueron de 4.000 semillas por placa y NaCl 200 mM.

En segundo lugar se procedió a determinar las condiciones óptimas para el rastreo secundario a baja densidad de semillas. La finalidad de este rastreo secundario consistía en determinar de forma inequívoca el fenotipo mutante y su

transmisión a la siguiente generación. El ensayo determinó que la concentración mínima a la que las semillas del ecotipo silvestre no germinaban era de NaCl 150 mM, de modo que estas fueron las condiciones elegidas para el rastreo secundario.

Búsqueda y aislamiento de los mutantes *sre* (“salt resistant”).

Las líneas transgénicas suministradas por el ABRC fueron aproximadamente 16.500. Estas líneas constituyeron la población de semillas que se denominó S₀ (de Selección), para que resultara más fácil y comprensible el seguimiento del rastreo y de las diferentes generaciones.

Aproximadamente 200.000 semillas S₀ fueron analizadas en el rastreo primario según se describe en el apartado de materiales y métodos. Como resultado se obtuvieron 112 plantas candidatas S₁ que eran capaces de germinar y establecer la plántula en condiciones de estrés salino (NaCl 200mM). En sentido estricto se define la germinación de una semilla como la emergencia de la radícula, pero en este caso la germinación fue definida como emergencia de la radícula y desarrollo de cotiledones verdes (Figura 5.1.B), de modo que en realidad se estaba valorando tanto la germinación de la semilla como el establecimiento temprano de la plántula. Estos 112 individuos candidatos S₁ fueron rescatados del medio con sal y puestos en tierra para obtener la siguiente generación S₂. Paralelamente al rastreo de las líneas transgénicas mutagenizadas con T-DNA, 12.000 semillas del ecotipo silvestre fueron analizadas en las mismas condiciones, obteniendo 4 plantas candidatas S₁ que también fueron rescatadas y trasladadas a tierra para obtener la siguiente generación S₂.

A continuación se realizó la segunda fase de la búsqueda, el rastreo secundario a baja densidad de semillas de las líneas candidatas S₁ empleando semillas S₂ (Figura 5.1.C). Este rastreo determinó que de las 112 líneas S₁ analizadas únicamente 5 de ellas poseían la capacidad de germinar y establecer el estadio de plántula en un medio con NaCl 150 mM en un tiempo de 5 a 7 días. Estas 5 líneas transgénicas fueron entonces consideradas como mutantes *sre*. El análisis de las plantas candidatas S₁ se completó analizando las líneas obtenidas en el rastreo primario de la población control Col. El resultado mostró que ninguna de los 4 líneas S₁ era capaz de germinar en un medio suplementado con NaCl 150 mM.

Los resultados obtenidos del rastreo de ambas poblaciones de semillas indicaron que las condiciones empleadas para la búsqueda de mutantes resistentes a sal habían sido muy exigentes, de modo que líneas con un fenotipo más suave no fueron consideradas.

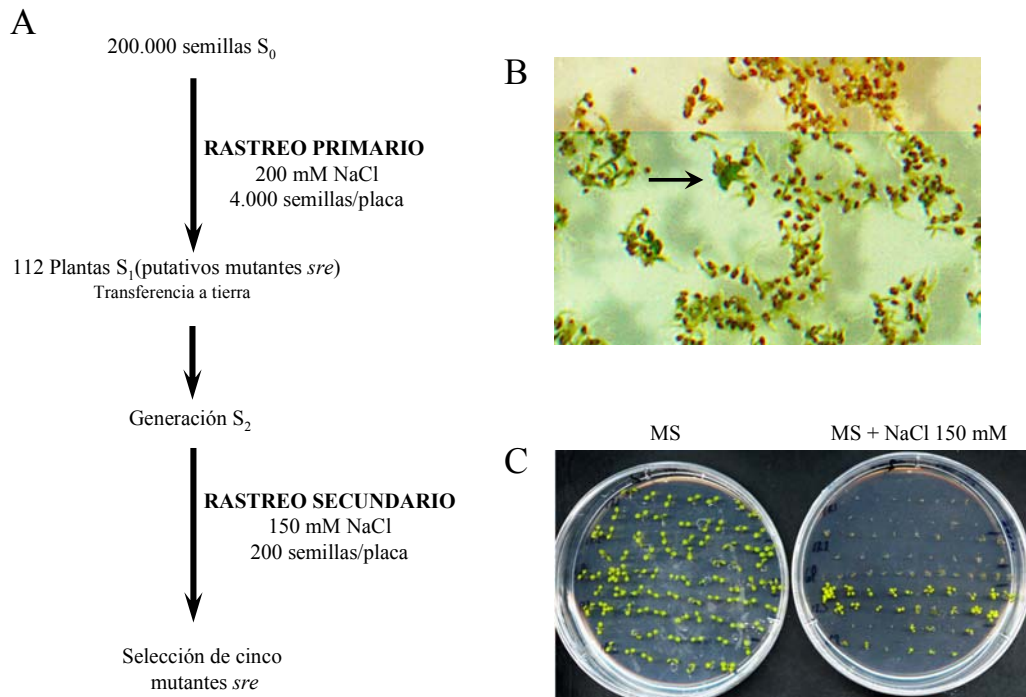


Figura 5.1.- Aislamiento de los mutantes *sre* (“salt resistant”).

(A) Esquema del rastreo empleado en el aislamiento de los mutantes *sre*. Se indican las condiciones de los rastreos primarios y secundarios.

(B) Detalle de una placa del rastreo primario. La flecha señala una plántula S_1 aislada en el rastreo primario. Esta plántula muestra los cotiledones verdes y expandidos mientras que el resto de semillas solo muestran emergencia de la radícula. La fotografía fue tomada a los 7 días.

(C) Rastreo secundario. Dos filas de semillas S_2 de varios candidatos S_1 fueron sembradas en varias placas con medio MS (izquierda) y MS suplementado con NaCl 150 mM (derecha). La fotografía fue tomada a los 5 días.

Análisis genético.

El siguiente paso en el análisis de los mutantes *sre* consistió en definir el carácter dominante/recesivo de la mutación y establecer los grupos de complementación. Para ello los mutantes *sre* fueron cruzados con el ecotipo silvestre y las generaciones F_1 y F_2 de cada cruce fueron ensayadas en medios MS con NaCl 150 mM. El análisis de la generación F_1 indicaba que todas las mutaciones eran recesivas de modo que se analizó la segregación del carácter mediante el análisis estadístico χ^2 (Parker, R. E., 1981) empleando como hipótesis una segregación

fenotípica del tipo 3:1 (silvestre:mutante), que corresponde a un patrón de transmisión para el carácter del tipo monogénico recesivo.

Tabla 5.1.: Análisis genético de los mutantes *sre*.

Los grupos de complementación se determinaron analizando las semillas F₁ de los cruces entre los mutantes *sre*. El análisis genético se realizó en semillas F₂ obtenidas por autofecundación de plantas F₁ del cruce de cada mutante con el ecotipo silvestre. Las semillas se analizaron en medio MS suplementado con NaCl 150 mM y los datos de germinación fueron tomados a los 5 días. p: probabilidad.

Cruces (♀ x ♂)	Generación	Semillas totales sembradas	Semillas germinadas	χ^2 (3:1); p
Col x <i>sre1-1/sre1-1</i>	F ₂	223	49	0,93; p>0,5
Col x <i>sre1-2/sre1-2</i>	F ₂	269	62	0,55; p>0,5
Col x <i>sre2-1/sre2-1</i>	F ₂	1377	304	6,26; p>0,025
Col x <i>sre2-2/sre2-2</i>	F ₂	1444	359	0,015; p>0,97
Col x <i>sre3/sre3</i>	F ₂	1125	280	0,007; p>0,97
<i>sre1-1/sre1-1</i> x <i>sre1-2/sre1-2</i>	F ₁	111	106	-
<i>sre1-1/sre1-1</i> x <i>sre2-1/sre2-1</i>	F ₁	112	0	-
<i>sre1-1/sre1-1</i> x <i>sre3/sre3</i>	F ₁	72	0	-
<i>sre2-1/sre2-1</i> x <i>sre2-2/sre2-2</i>	F ₁	154	135	-
<i>sre2-1/sre2-1</i> x <i>sre3/sre3</i>	F ₁	104	0	-

El resultado del análisis genético muestra que todos los mutantes, salvo el mutante *sre2-1*, poseen un valor de χ^2 que corresponde a una probabilidad mayor de 0,5. Tomando el valor general de referencia de p>0,05 para rechazar o aceptar la hipótesis, se observa que los datos no permiten rechazar una segregación del tipo monogénica recesiva salvo en el caso del mutante *sre2-1*.

Para determinar los grupos de complementación obtenidos en el rastreo se cruzaron los 5 mutantes *sre* entre ellos. Como se observa en la Tabla 5.1., el test de alelismo determinó la existencia de 3 grupos distintos en los mutantes *sre* aislados, grupos que fueron denominados *sre1*, *sre2* y *sre3* respectivamente.

- El grupo *sre1* constaba de dos mutantes, que se denominaron *sre1-1* y *sre1-2*.
- El grupo *sre2* también estaba compuesto por otros dos mutantes, que se denominaron *sre2-1* y *sre2-2*.
- El grupo *sre3* solo contenía un mutante.

Análisis de la presencia de T-DNA en los mutantes sre.

Dado que los mutantes *sre* procedían de una colección de líneas transgénicas mutagenizadas con T-DNA, se procedió a realizar un análisis “Southern blot” para determinar la presencia de T-DNA en el genoma de los mutantes aislados, empleando sondas específicas del T-DNA (ver punto 4.2. de materiales y métodos) (Figura 5.2.).

El análisis reveló que:

- El mutante *sre1-1* hibridaba con la sonda 35S pero no con la sonda BAR. Esto indicaba que poseía dos inserciones incompletas de T-DNA en su genoma.
- El mutante *sre1-2* no poseía ninguna inserción de T-DNA en su genoma.
- El mutante *sre2-1* poseía 4 inserciones de T-DNA que parecían estar completas puesto que se obtenía hibridación con ambas sondas específicas del T-DNA.
- El mutante *sre2-2* poseía una inserción de T-DNA que parecía completa, puesto que también hibridaba con ambas sondas específicas del T-DNA.
- El mutante *sre3* poseía varias inserciones de T-DNA, de las cuales al menos 2 de ellas parecían ser inserciones de T-DNA completas.

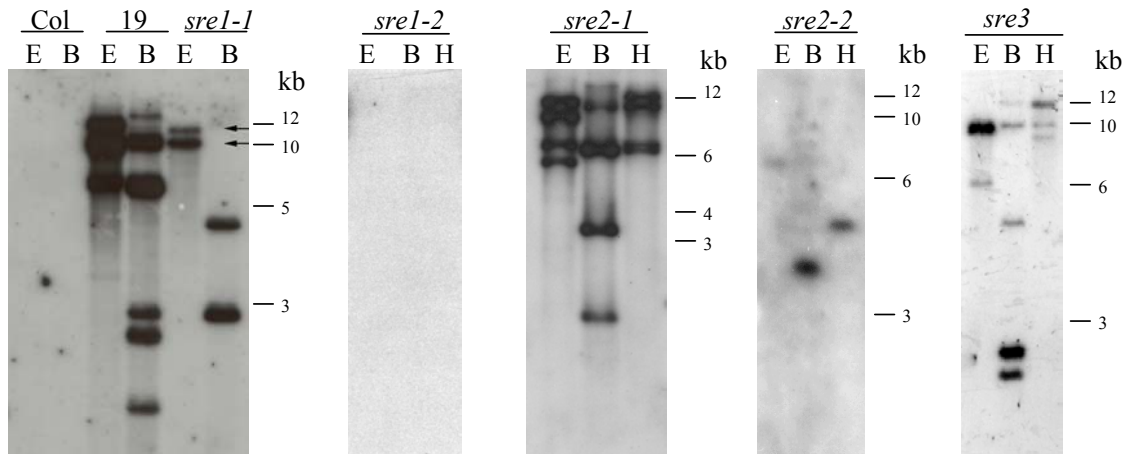
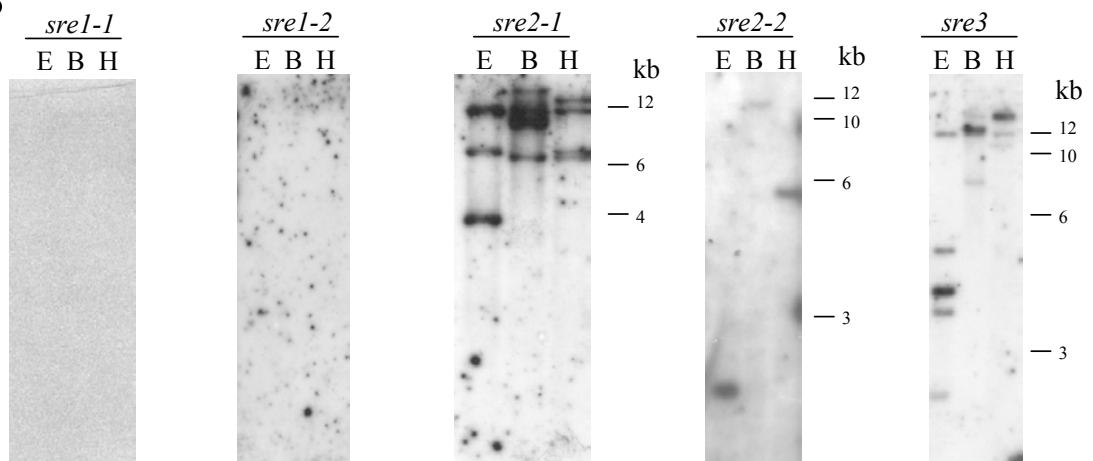
A**B**

Figura 5.2.- Identificación de las inserciones de T-DNA en los mutantes *sre*. Las membranas poseían 2 µg de DNA genómico en cada carrera, bien del ecotipo silvestre Col o bien de los mutante *sre*, digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* (E), *BamHI* (B) y *HindIII* (H).

(A) Hibridación empleando la sonda 35S. Se incluye una línea transgénica con varias inserciones de T-DNA (línea transgénica nº 19) como control de la hibridación.

(B) Hibridación empleando la sonda BAR.

Análisis de cosegregación.

En aquellos mutantes *sre* que poseían al menos una inserción de T-DNA en su DNA genómico se llevó a cabo un análisis de cosegregación entre el fenotipo del mutante y el T-DNA. Este análisis permite determinar si existe ligamiento entre el

T-DNA y el fenotipo mutante, indicando en caso de ligamiento que la inserción de T-DNA puede ser la responsable del fenotipo.

En un primer momento se realizó el análisis con un número de 30 individuos F₂ homocigotos mutantes, obteniendo que los individuos mutantes *sre1-1*, *sre2-2* y *sre3* no mostraban cosegregación. En estos mutantes se observaba que los T-DNA segregaban con una probabilidad del 50% en los individuos F₂ mutantes, lo que indicaba que el *locus* correspondiente y el T-DNA estarían en cromosomas distintos o bien a una distancia considerable (Figura 5.3.). En cambio, el mutante *sre2-1* mostró una cosegregación positiva. De las 4 inserciones completas de T-DNA incluidas en el genoma de las plantas mutantes, 3 de ellas segregaban siempre juntas como una integración compleja de más de 30 kb en los individuos F₂ homocigotos mutantes (Figura 5.3.). Para confirmar esta cosegregación se completó el análisis hasta un total de 88 individuos F₂ homocigotos *sre2-1*, obteniendo una cosegregación positiva en todos ellos. Así pues, mediante el análisis de cosegregación se pudo determinar que el T-DNA y el *locus* SRE2 estaban a una distancia genética menor de 0,57 cM y que probablemente la inserción compleja de T-DNA presente en el genoma del mutante *sre2-1* era responsable del fenotipo mutante.

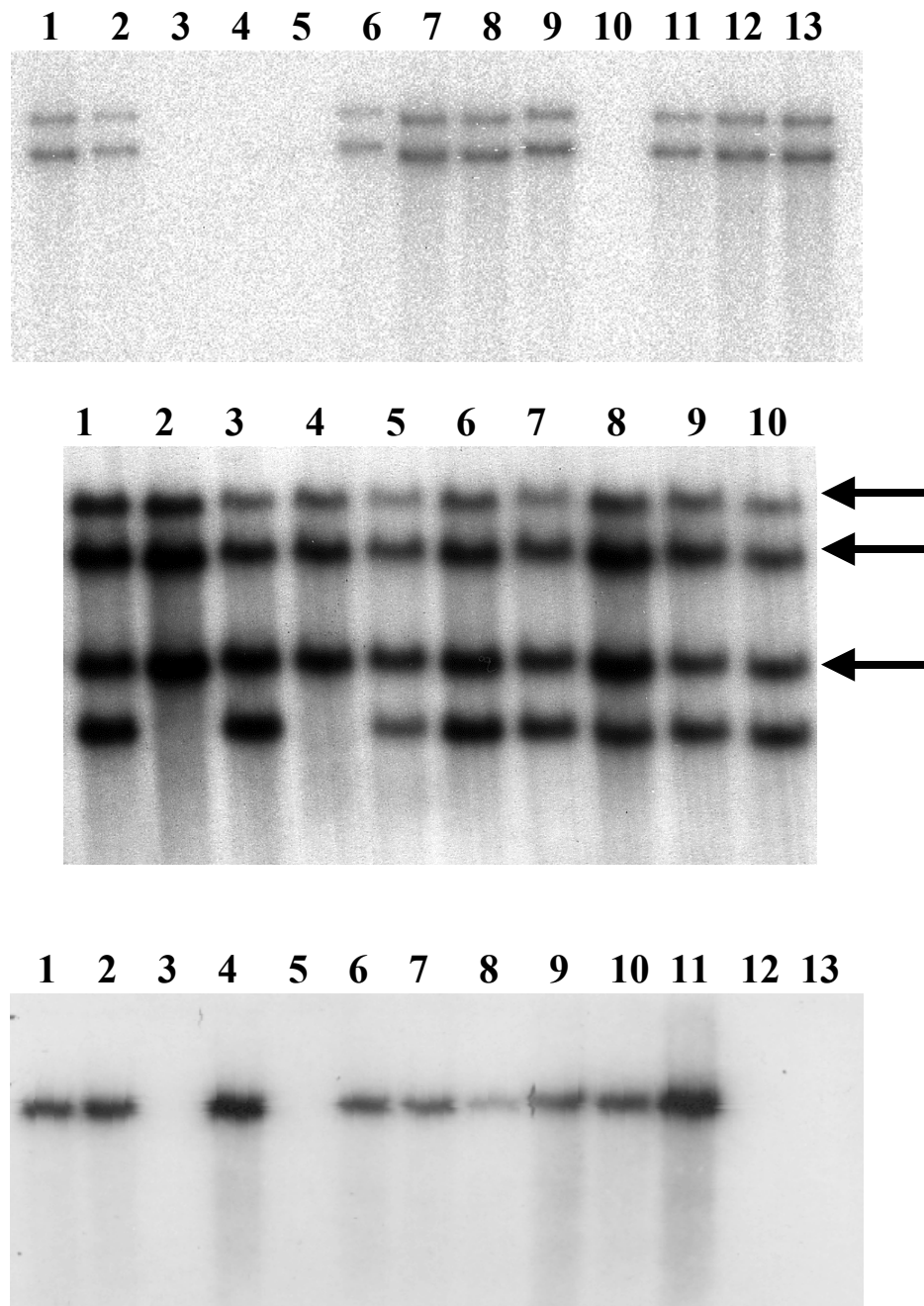


Figura 5.3. Análisis de cosegregación en los mutantes *sre1-1*, *sre2-1* y *sre3*.

DNA genómico de individuos F₂ homocigotos *sre1-1* (arriba), *sre2-1* (centro) y *sre3* (abajo) fue digerido con la enzima de restricción *EcoRI* e hibridado con la sonda 35S del T-DNA. Cada número se refiere a un individuo F₂ homocigoto mutante. Se indican con flechas las inserciones de T-DNA que cosegregan juntas y con el fenotipo en el mutante *sre2-1*.

Caracterización fenotípica de los mutantes sre.

Ensayos de germinación y establecimiento de plántula.

Los mutantes *sre* fueron aislados gracias a su capacidad de germinación y establecimiento de la plántula en un medio suplementado con NaCl 200-150 mM. Sin embargo, el estrés salino está compuesto por el estrés iónico generado por los iones (Na^+ y Cl^-) y por el estrés osmótico generado por la alta concentración de sal. Para estudiar ambas componentes, semillas de los distintos mutantes *sre* fueron puestas a germinar en medios con distintas concentraciones de NaCl y de manitol. Como resultado se obtuvo que todos los mutantes *sre* mostraban un elevado porcentaje de germinación (superior al 80%) en ambas condiciones (Figura 5.4.A.).

Más detalladamente, a los 5 días de haber sido puestas a germinar en un medio suplementado con NaCl o manitol, las semillas de los mutantes *sre* habían germinado e iniciaban el establecimiento del estadio de plántula mientras que las semillas del ecotipo Col solo mostraban una ligera emergencia de la radícula. A los 7 días estas mismas semillas mutantes *sre* ya se habían desarrollado totalmente al estadio de plántula, con unos cotiledones verdes y totalmente expandidos. Sin embargo las semillas del ecotipo Col solo habían sacado ligeramente la radícula, siendo incapaces de continuar el establecimiento de la plántula (Figura 5.4.B.).

Estos resultados muestran claramente como los mutantes *sre* son capaces de evitar la detención en la germinación de las semillas inducido por las condiciones de estrés salino y osmótico. En cambio en el ecotipo silvestre ocurre justo lo contrario, siendo las semillas incapaces de germinar aunque se las deje varias semanas.

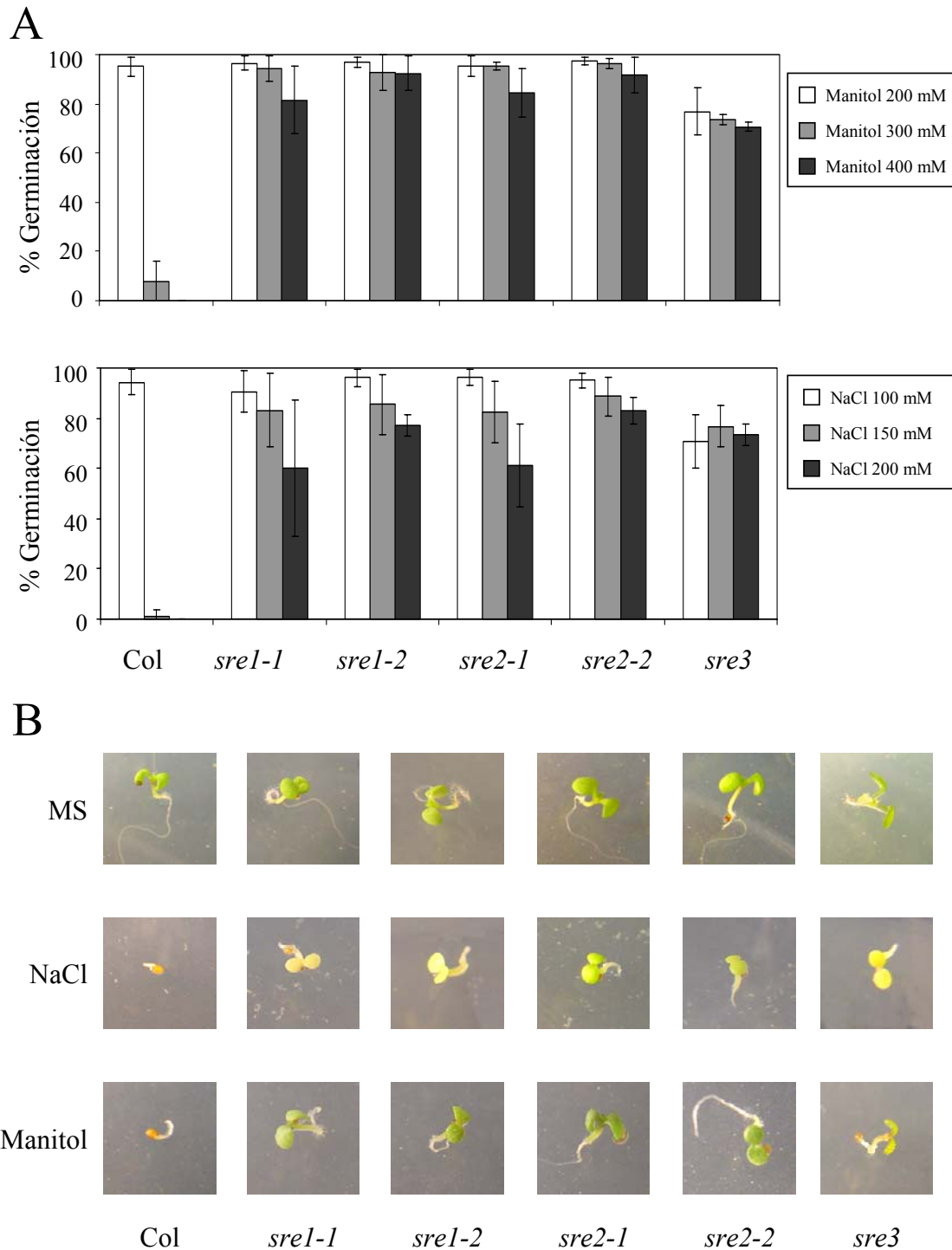


Figura 5.4. Germinación y establecimiento temprano de las plántulas mutantes *sre* y el ecotipo silvestre en medios suplementados con NaCl y manitol.

(A) Porcentajes de germinación del ecotipo silvestre y de los mutantes *sre* en medios suplementados con manitol (arriba) y NaCl (abajo). Las semillas fueron sembradas en medios suplementados con manitol (200mM, 300mM y 400mM) y con NaCl (100mM, 150 mM y 200 mM). Los porcentajes de germinación fueron determinados a los 5 días (NaCl) y 8 días (manitol).

(B) Fenotipo de germinación y establecimiento de plántula de los mutantes *sre*. Germinación de las semillas en medios MS control (arriba), MS con NaCl 200 mM (medio) y MS con manitol 400 mM (abajo). Las fotografías fueron tomadas a los 5 días (MS y NaCl) y 8 días (manitol).

Durante el transcurso de la caracterización fenotípica se realizó la observación que los mutantes *sre* mostraban fenotipo de marchitamiento cuando eran trasladados de una atmósfera con alta humedad a una con baja humedad, fenotipo que es muy característico de los mutantes deficientes e insensibles al ácido abscísico (ABA). Además, durante la realización esta tesis se describió que la búsqueda de mutantes resistentes a altas concentraciones de sal o de azúcares en ensayos de germinación había tenido como resultado el aislamiento de mutantes deficientes o insensibles al ABA (Huijser, C. et al., 2000; Laby, R. J. et al., 2000; Quesada, V. et al., 2000).

De acuerdo con estas observaciones se procedió a analizar si los mutantes *sre* eran mutantes insensibles o deficientes a ABA. Un primer ensayo consistió en determinar la sensibilidad de la germinación de los mutantes *sre* en medios suplementados con la fitohormona ABA y con el inhibidor de las giberelinas paclobutrazol (Tabla 5.2.). En general, los mutantes insensibles a ABA normalmente son capaces de germinar en un medio suplementado con ABA mientras que los mutantes deficientes normalmente germinan mejor en un medio suplementado con paclobutrazol (Leung, J. and Giraudat, J., 1998; Rock, C. D., 2000).

Tabla 5.2. Porcentajes de germinación y desarrollo temprano de la plántula de los mutantes *sre* y del ecotipo silvestre en medios suplementados con ABA y paclobutrazol.

Semillas de los ecotipos silvestres (Col y La-er), de mutantes deficiente e insensibles a ABA y de los mutantes *sre* fueron sembradas en medio MS suplementado con ABA y paclobutrazol. Los porcentajes de germinación fueron determinados a los 8 días. La desviación estándar fue calculada a partir de al menos tres experimentos independientes.

	1 μ M ABA	3 μ M ABA	1 μ M Paclobutrazol	10 μ M Paclobutrazol
Col	0 \pm 0	0 \pm 0	12 \pm 1	1 \pm 1
La-er	4 \pm 2	0 \pm 0	2 \pm 1	0 \pm 0
<i>sre1-1</i>	0 \pm 0	0 \pm 0	77 \pm 15	90 \pm 5
<i>sre1-2</i>	0 \pm 0	0 \pm 0	73 \pm 6	87 \pm 6
<i>sre2-1</i>	0 \pm 0	0 \pm 0	56 \pm 27	76 \pm 19
<i>sre2-2</i>	0 \pm 0	0 \pm 0	46 \pm 33	87 \pm 15
<i>sre3</i>	0 \pm 0	0 \pm 0	70 \pm 8	73 \pm 8
<i>aba2-1</i>	nd	0 \pm 0	65 \pm 12	89 \pm 6
<i>aa03-1</i>	0 \pm 0	0 \pm 0	2 \pm 1	3 \pm 4
<i>abi1-1</i>	94 \pm 4	92 \pm 3	65 \pm 6	21 \pm 15

El análisis de la germinación de los mutantes *sre* en medios suplementados con 2 concentraciones diferentes de ABA indicaba que estos no eran mutantes insensibles al ABA. Sin embargo el análisis de la germinación en medios suplementados con paclobutrazol mostró como los mutantes *sre* eran capaces de germinar en un medio suplementado con paclobutrazol 10 μM en 8 días. Los porcentajes de germinación de los mutantes *sre* fueron superiores al 70% y bastantes similares a los porcentajes de los mutantes deficientes en ABA (Tabla 5.2.). Así, este último ensayo sugería que los mutantes *sre* podían representar nuevos *loci* o alelos de mutantes deficientes en ABA.

Una de las funciones fisiológicas de la hormona ABA es la inducción de la fase de latencia de las semillas. De esta forma, una característica de los mutantes con déficit o insensibilidad al ABA es la reducida o nula latencia presente en sus semillas, llegando en algunos mutantes de maíz incluso a germinar antes de abandonar la planta materna (Zeevaart, J. A. and Creelman, R. A., 1988). Por lo tanto se analizó la latencia en las semillas de los mutantes *sre* (Figura 5.5.).

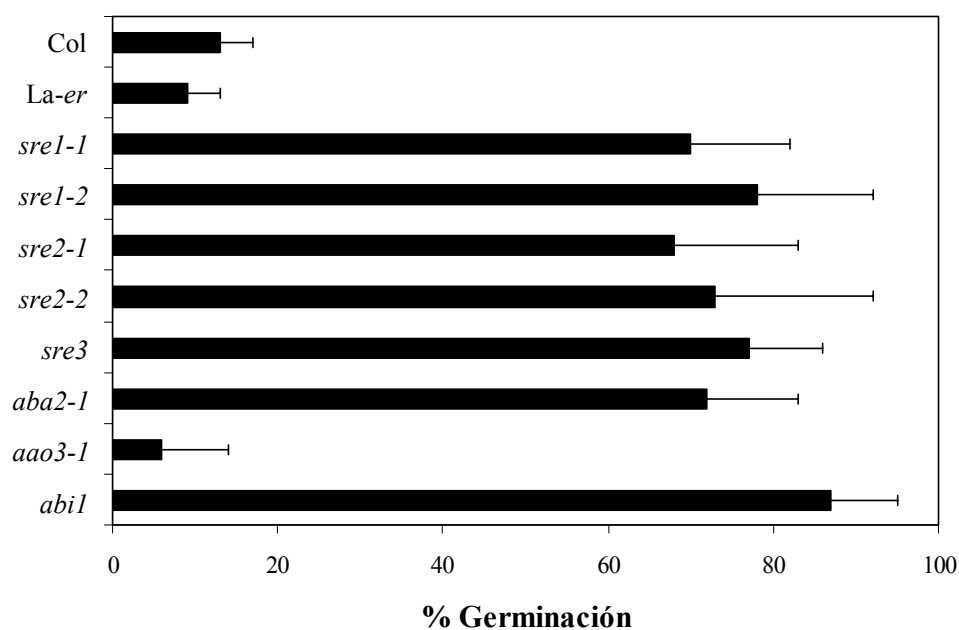


Figura 5.5. Latencia de las semillas de los mutantes *sre*.

Semillas recién recogidas de los ecotipos silvestres (Col y La-er), de mutantes deficientes e insensibles a ABA y de los mutantes *sre* fueron sembradas en medio MS. Los porcentajes de germinación se determinaron a los 5 días. La desviación estándar fue calculada a partir de tres experimentos independientes con 200 semillas en cada uno de ellos.

Como resultado del ensayo se obtuvo que a los 5 días de haber sido puestos germinar a una placa con medio MS, las semillas de los mutantes *sre* eran capaces de germinar con un porcentaje muy elevado (70%-80%), mientras que las semillas del ecotipo silvestre apenas germinaban un 15% (Figura 5.5.). Esta elevada germinación implica una reducción notable de la latencia de las semillas de los mutantes *sre*, siendo los valores de germinación obtenidos muy similares a los que poseían tanto los mutantes de biosíntesis como los insensibles a ABA empleados como controles. Este dato de latencia de las semillas indicaba un posible déficit de la hormona ABA en las semillas de los mutantes *sre*.

Cabe mencionar que la variabilidad en la germinación para los mutantes *sre* en los diferentes ensayos realizados no fue muy elevada, con un porcentaje de germinación que estuvo entre el 87% y el 68%. Así, la desviación estándar calculada estuvo entre el 19% y el 12 % de los valores, siendo estas desviaciones no muy elevadas para un ensayo que es altamente influenciado por las condiciones ambientales.

Ensayo de transpiración.

Ante una situación de estrés hídrico, una de las primeras reacciones de la planta es el cierre de los estomas para reducir la pérdida de agua debida a la transpiración. Este cierre de los estomas está mediado por la hormona ABA, que aumenta sus niveles en condiciones de estrés e inicia una ruta de señalización que tiene como resultado final el cierre de los estomas. Por tanto, los mutantes deficientes o insensibles a ABA no pueden cerrar adecuadamente los estomas bajo condiciones de estrés, produciéndose un desequilibrio hídrico y un fenotipo de marchitamiento en la planta. Esta disminución del contenido de agua de la planta en condiciones de estrés puede ser visualizada y cuantificada empleando cinéticas de pérdida de agua.

Los ensayos de transpiración con los mutantes *sre* permitieron obtener unas cinéticas de pérdida de agua que mostraban una mayor disminución en el peso fresco de los mutantes *sre* que en el ecotipo silvestre, indicando que todos ellos cerraban peor los estomas que el ecotipo silvestre (Figura 5.6.). El resultado obtenido en todos los mutantes *sre* fue bastante similar, con una pérdida ponderada de aproximadamente el 50% de su peso fresco a los 60 minutos frente al 20% que pierde el ecotipo silvestre. Únicamente el mutante *sre1-2* mostró una cinética de pérdida de

peso fresco significativamente mayor que la que poseen el resto de mutantes *sre* (Figura 5.6.).

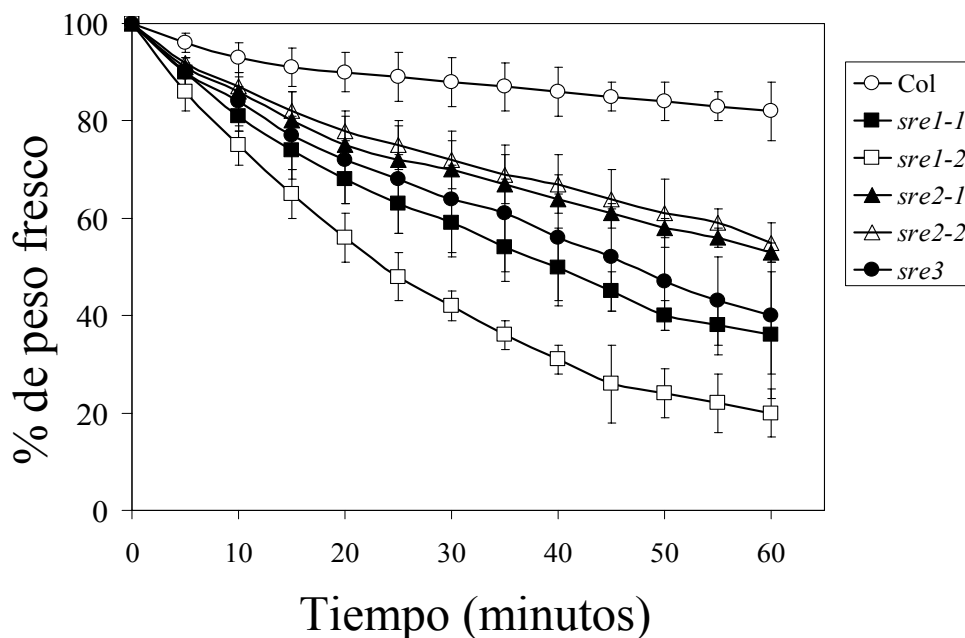


Figura 5.6.- Cinéticas de pérdida de agua de los mutantes *sre*.

Se emplearon hojas de roseta de los ecotipo silvestre Col y de los mutantes *sre*. Se representa el porcentaje de peso fresco respecto del inicial frente al tiempo para el ecotipo silvestre Col y los mutantes *sre1-1*, *sre1-2*, *sre2-1*, *sre2-2* y *sre3*. El error estándar fue calculado a partir de dos experimentos independientes con dos réplicas en cada uno de ellos.

Medidas de Ácido Abscísico.

Los datos de los diferentes ensayos de germinación y de los ensayos de transpiración sugerían que los mutantes *sre* podían ser mutantes deficientes en ácido abscísico. Para confirmarlo se realizó la medición de los niveles de ácido abscísico en las hojas de roseta de plantas silvestres y mutantes. Estas medidas se realizaron tanto en condiciones sin estrés como en condiciones de estrés salino o por sequía, condiciones que inducen fuertemente la síntesis de ABA. La Tabla 5.3. presenta los niveles de ABA obtenidos en los diferentes ensayos realizados.

Las medidas de ABA en condiciones sin estrés confirmaron un menor nivel de la hormona ABA en todos los mutantes *sre*. En el mutante *sre1-1* el nivel de ABA resultó ser aproximadamente el 25 % del nivel del ecotipo silvestre, mientras que en ambos alelos del mutante *sre2* los niveles de ABA fueron aproximadamente el 30% del silvestre. Como control del experimento se midió la cantidad de ABA presente en

el mutante deficiente *aba2-1*. En condiciones de estrés, salino o sequía, las medidas mostraron que el ecotipo silvestre poseía alrededor de 8 veces más ABA en condiciones de estrés que sin estrés y entre 20 y 30 veces más ABA que los mutantes *sre1*. Sin embargo el aumento observado para el mutante *sre1-1* en condiciones de estrés fue solamente de 1,5 veces, resultados que fueron muy similares a los que se obtuvieron para el mutante *aba2-1*. En cambio, las plantas mutantes *sre2* fueron capaces de aumentar sus niveles de ABA hasta 5 veces, aunque sus niveles finales de ABA en condiciones de estrés resultaron ser 5 veces menores que el nivel de ABA en el ecotipo silvestre. En los mutantes *sre1-2* y *sre3* fue imposible determinar de forma fiable los niveles de ABA tanto en condiciones de estrés como sin estrés. En ambos casos, los valores obtenidos indicaban que los niveles de ABA estaban por debajo del límite de detección de la técnica empleada. Estos resultados permitían concluir que los mutantes *sre* poseían menores niveles de ABA que el ecotipo silvestre en las mismas condiciones, y que por tanto posiblemente tendrían afectada la biosíntesis de ABA.

Tabla 5.3. Niveles de ABA (ng ABA/g peso seco) en hojas de roseta de plantas del ecotipo silvestre Col y de los mutantes *sre1-1*, *sre1-2*, *sre2-1*, *sre2-2*, *sre3* y *aba2-1*.

Se emplearon hojas de roseta sin tratar, tratadas con 200 mM NaCl durante 5 días (estrés salino) y mantenidas 7 días sin regar (estrés por sequía). La desviación estándar fue calculada a partir de dos experimentos independientes con dos réplicas en cada uno.

Genotipo	Sin estrés	Estrés salino	Estrés por sequía
Col	103±13	828±70	811±76
<i>sre1-1</i>	25± 3	35±5	27±5
<i>sre1-2</i>	<20	<20	<20
<i>sre2-1</i>	30± 3	122±13	112±15
<i>sre2-2</i>	35± 5	191±19	162±16
<i>sre3</i>	<20	<20	<20
<i>aba2-1</i>	22± 3	45± 4	46±4

Medidas de prolina.

La prolina es una molécula que se acumula en muchos organismos, expuestos a estreses ambientales (Delauney, A. J. et al., 1993). En las plantas superiores bajo condiciones de estrés hídrico, las posibles funciones de la prolina serían actuar como mediador en el ajuste osmótico, como estabilizador de estructuras subcelulares o como un eliminador de radicales libres. En plantas superiores se sintetiza mediante la ruta del ácido glutámico y de la ornitina. De ambas rutas, la ruta del ácido glutámico parece ser la actúa en condiciones de estrés. Esta compuesta por dos enzimas, siendo

la enzima P5CS1 (delta 1-pirrolina-5-carboxilato sintasa A), que cataliza el primer paso de la ruta, la enzima crucial en la síntesis de prolina y cuya expresión es inducida por condiciones de estrés (Yoshida, Y. et al., 1999).

Tabla 5.4. Niveles de prolina ($\mu\text{moles/g}$ peso fresco) en hojas de roseta del ecotipo silvestre y de los mutantes *sre1-1*, *sre2-1* y *aba2-1*.

Se utilizaron hojas de roseta de plantas del ecotipo silvestre y de los mutantes *sre* sin tratar, tratadas con 200 mM NaCl durante 5 días (estrés salino) y mantenidas 7 días sin regar (estrés por sequía). El error estándar fue calculado a partir de dos experimentos independientes con dos réplicas en cada uno.

Genotipo	Sin estrés	Estrés salino	Estrés por sequía
Col	0,73 \pm 0,31	8,78 \pm 0,76	14,05 \pm 0,77
<i>sre1-1</i>	2,85 \pm 0,48	2,18 \pm 0,32	1,97 \pm 0,42
<i>sre2-1</i>	1,09 \pm 0,24	5,66 \pm 0,83	7,52 \pm 0,95
<i>aba2-1</i>	2,45 \pm 0,35	1,77 \pm 0,44	1,63 \pm 0,42

Los valores obtenidos de los niveles de prolina en hojas de roseta de los mutantes *sre1-1* y *sre2-1* muestran que existe una menor producción del aminoácido bajo condiciones de estrés respecto al ecotipo silvestre. Sin embargo, ambos mutantes poseen mayores niveles en condiciones sin estrés que el ecotipo silvestre.

Ensayos de complementación con mutantes deficientes en ABA.

La medida de los niveles de ABA mostró como los mutantes *sre* tenían menores niveles de ABA en hojas de roseta (Tabla 5.3.). Este déficit en la fitohormona ABA podía ser debido a varias causas. En primer lugar podía ser un problema en la biosíntesis del ácido abscísico, de modo que los mutantes *sre* podían corresponder a *loci* implicados en la biosíntesis de ABA ya descritos o bien podían ser nuevos *loci* todavía no descritos, tales como la actividad isomerasa que catalizada la transformación de la trans-violaxantina en 9-cis-violaxantina. Sin embargo, los menores niveles de ABA podrían también ser debidos a una mayor degradación del ABA en la célula. En este caso los *loci* SRE estarían implicados en las rutas del metabolismo del ABA, bien directamente como actividades de las rutas o bien indirectamente como reguladores de estas rutas. Finalmente existe una tercera posibilidad, que los *loci* SRE estén implicados en la percepción del estrés osmótico, de modo que no se observa inducción de la síntesis de ABA en condiciones de estrés porque los mutantes no pueden percibir el estrés adecuadamente.

Para determinar si los mutantes *sre* aislados eran mutantes ABA deficientes ya descritos se procedió a cruzarlos con los mutantes de biosíntesis de ácido abscísico (Tabla 5.5.). Algunos de estos mutantes se encuentran disponibles en el fondo genético Columbia (Col) y otros en el fondo Lansdberg *erecta* (La-*er*), aunque el análisis de los fondos genéticos en las condiciones del ensayo determinó que ambos fondos se comportaban de forma muy similar.

Tabla 5.5. Análisis de complementación entre mutantes deficientes en ABA y los mutantes *sre*.

Semillas F₁ de cada cruce fueron germinadas en medio MS suplementado con NaCl 150 mM. La dirección del cruce se encuentra indicada. La germinación fue determinada a los 5 días.

Cruce (♀ x ♂)	Sembradas	Germinadas
<i>sre1-1/sre1-1</i> x <i>aba1-5/aba1-5</i>	70	0
<i>sre1-1/sre1-1</i> x <i>aba2-1/aba2-1</i>	147	145
<i>aba2-1/aba2-1</i> x <i>sre1-2/sre1-2</i>	78	73
<i>sre1-1/sre1-1</i> x <i>aba3-2/aba3-2</i>	92	0
<i>aba1-5/aba1-5</i> x <i>sre2-1/sre2-1</i>	107	0
<i>sre2-1/sre2-1</i> x <i>aba2-1/aba2-1</i>	112	0
<i>sre2-1/sre2-1</i> x <i>aba3-2/aba3-2</i>	113	0
<i>sre2-1/sre2-1</i> x <i>aao3-1/aao3-1</i>	89	74
<i>sre2-2/sre2-2</i> x <i>aao3-1/aao3-1</i>	85	71
<i>aba1-5/aba1-5</i> x <i>sre3/sre3</i>	95	93
<i>aba2-2/aba2-1</i> x <i>sre3/sre3</i>	77	0
<i>aba3-2/aba3-2</i> x <i>sre3/sre3</i>	99	0

Como resultado del análisis de los cruces se obtuvo que:

- Los mutantes *sre1* eran alélicos al mutante *aba2-1*. Dada la existencia de al menos 7 nuevos alelos conocidos, se empezó una nueva serie alélica donde estarían incluidos los dos alelos mutantes *sre1*, pasando a

denominar a los mutantes *sre1-1* y *sre1-2* como *aba2-11* y *aba2-12* respectivamente.

- Los mutantes *sre2* eran alélicos al mutante *aa03-1*. Solo existe un alelo descrito en la bibliografía para este *locus*, de modo que se renombraron los alelos mutantes *sre2-1* y *sre2-2*, como *aa03-2* y *aa03-3* respectivamente.
- El mutante *sre3* representaba un nuevo alelo del mutante *aba1*. Se decidió renombrarlo como *aba1-101*. Esta numeración alélica fue escogida para evitar confusiones con los alelos *aba1* previamente aislados, de los cuales hay al menos dos series alélicas (Koornneef, M. et al., 1982; Comunicación personal de A. Marion-Poll a P.L. Rodríguez)

5.2. Mutantes *sre1-1/aba2-11* y *sre1-2/aba2-12*.

El mutante *aba2* de *Arabidopsis thaliana* fue identificado por primera vez en una búsqueda de mutantes capaces de germinar en presencia de paclobutrazol, un inhibidor de la biosíntesis de giberelinas (Leon-Kloosterziel, K. M. et al., 1996). Posteriormente se han identificados numerosos alelos *aba2* en diferentes rastreos (revisado en Rock, C. D., 2000; Finkelstein, R. R. and Rock, C. D., 2002). Extractos protéicos del mutante *aba2-1* mostraron en diversos ensayos una reducida capacidad para transformar xantoxina en ABA, aunque estos mismos extractos proteicos sí fueron capaces de transformar el hipotético intermediario aldehído abscísico en ABA. Esto llevo a que se propusiera que el paso catalizado por la actividad ABA2 sería la conversión de xantoxina en aldehído abscísico y lógicamente el último paso de la ruta de biosíntesis sería la oxidación de este aldehído abscísico a ABA por una actividad oxidasa de aldehído abscísico (Schwartz, S. H. et al., 1997a). En cambio, otros autores habían propuesto una ruta diferente en la que la xantoxina sería transformada a ácido xantóxico mediante la actividad aldehído oxidasa codificada por el gen AAO3 y el ácido xantóxico sería transformado en ABA mediante la actividad codificada por el gen ABA2 (Milborrow, B. V., 2001). Sin embargo, ninguna de estas dos posibles rutas podía ser contrastada. En primer lugar, la actividad oxidasa de aldehído abscísico codificada por el gen AAO3 era capaz de catalizar *in vitro* tanto la conversión de aldehído abscísico a xantoxina como de xantoxina a ácido xantóxico (Seo, M. and Koshiba, T., 2002). En segundo lugar, el gen ABA2 de *A.thaliana* no estaba clonado y por tanto no se conocía la identidad molecular del gen ni la actividad enzimática de su producto génico.

El punto 5.1. de esta tesis doctoral describe el aislamiento de dos nuevos alelos *aba2*, denominados *sre1-1/aba2-11* y *sre1-2/aba2-12*, así como una extensa caracterización fenotípica. En el presente punto se realizará la descripción general de ambos alelos mutantes, incluyendo un resumen de la caracterización fenotípica ya realizada. Además, se realizará una detallada caracterización molecular y bioquímica del gen y de la proteína ABA2, respectivamente.

Identificación de los mutantes.

En el transcurso de un análisis genético en *Arabidopsis thaliana* sobre la capacidad de germinación y establecimiento temprano de la plántula se identificaron dos mutantes que formaban el grupo *srel* que se denominaron *srel-1* y *srel-2*. Dado que ambos mutantes procedían de una colección de líneas mutagenizadas con T-DNA, se determinó la presencia de T-DNA en ambos alelos mutantes. El análisis mostró que el mutante *srel-1* poseía dos inserciones incompletas de T-DNA en su genoma, mientras que el mutante *srel-2* no poseía ningún T-DNA (Figura 5.2.). El análisis de cosegregación realizado entre el T-DNA y el fenotipo del alelo mutante *srel-2* concluyó que el T-DNA no cosegregaba con el fenotipo (Figura 5.3.).

El análisis de complementación entre los mutantes deficientes en ABA y *sre* determinó que los mutantes *srel-1* y *srel-2* eran alélicos al mutante *aba2-1* (ver Tabla 5.5.). Así, los mutantes *srel-1* y *srel-2* fueron renombrados como *aba2-11* y *aba2-12* respectivamente, iniciando una nueva serie alélica junto con 2 nuevos alelos aislados por el grupo del profesor José Luis Micol, Universidad Miguel Hernández, Elche (Alicante).

Caracterización fenotípica.

En el presente punto de la tesis se incluye un pequeño resumen de los fenotipos descritos anteriormente en el punto 5.1 de resultados, y además se incluyen los resultados obtenidos con otro de los alelos, el mutante *aba2-1* (incluido como control).

Ensayos de germinación y establecimiento de plántula.

En primer lugar se analizó la germinación de las semillas tanto en condiciones de estrés salino y osmótico como en medios MS con paclobutrazol. Los resultados obtenidos muestran que todos los mutantes *aba2* poseen unos porcentajes de germinación elevados, alrededor del 80 %, tanto en medios suplementados con NaCl y manitol como en medios con paclobutrazol (Figura 5.7.).

En segundo lugar se analizó la latencia de las semillas, obteniendo unos resultados que muestran claramente que las semillas de todos los mutantes *aba2* poseen una reducida latencia comparada con las semillas del ecotipo silvestre (Figura 5.7.).

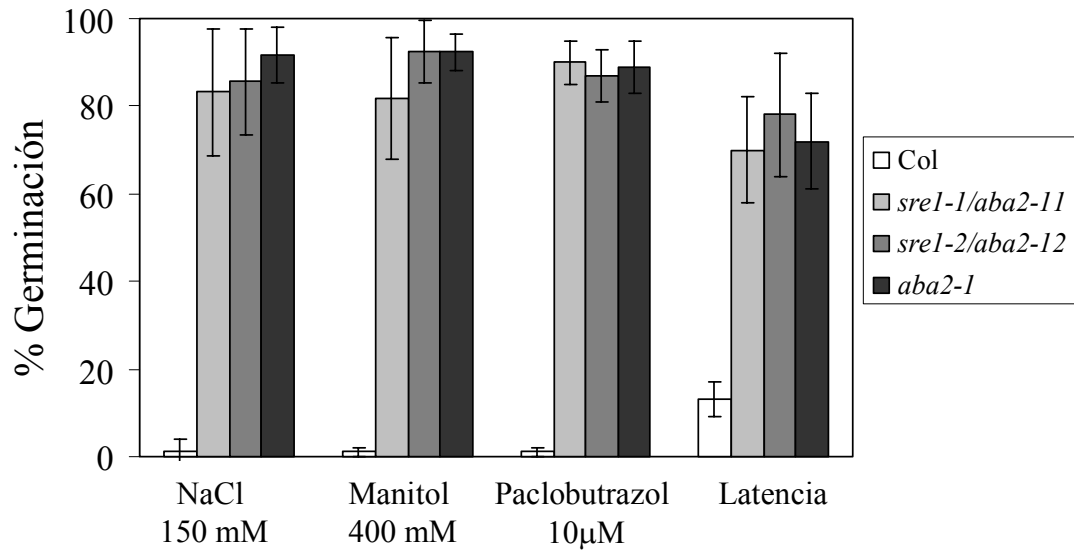


Figura 5.7.- Porcentajes de germinación de los mutantes *aba2*.

Las semillas germinaron en medios suplementados con NaCl 150 mM, manitol 400 mM y paclobutrazol 10 μM. Se determinó el porcentaje de germinación y desarrollo temprano de la plántula a 5 días (NaCl) y a 8 días (manitol y paclobutrazol). Para analizar la latencia de las semillas se emplearon semillas con un desarrollo de 16-18 días después de la polinización y el porcentaje de germinación se determinó a los 5 días.

Ensayo de sensibilidad a estrés en plántulas.

Además de analizar la germinación de las semillas en medios suplementados con NaCl y manitol, se analizó también el crecimiento de plántulas en estos mismos medios. Las semillas fueron germinadas en placas con medio MS y posteriormente las plántulas fueron transferidas a unas placas con medio MS sin sacarosa suplementadas con NaCl o manitol. A las dos semanas las plántulas mutantes *sre1-1/aba2-11* mostraban una mayor sensibilidad al estrés salino u osmótico que las plántulas del ecotipo silvestre. La Figura 5.8. muestra como a las dos semanas se haber sido puestas a crecer, las plántulas del mutante *sre1-1/aba2-11* estaban prácticamente muertas mientras que las plántulas del ecotipo silvestre eran capaces de sobrevivir y continuar el crecimiento.

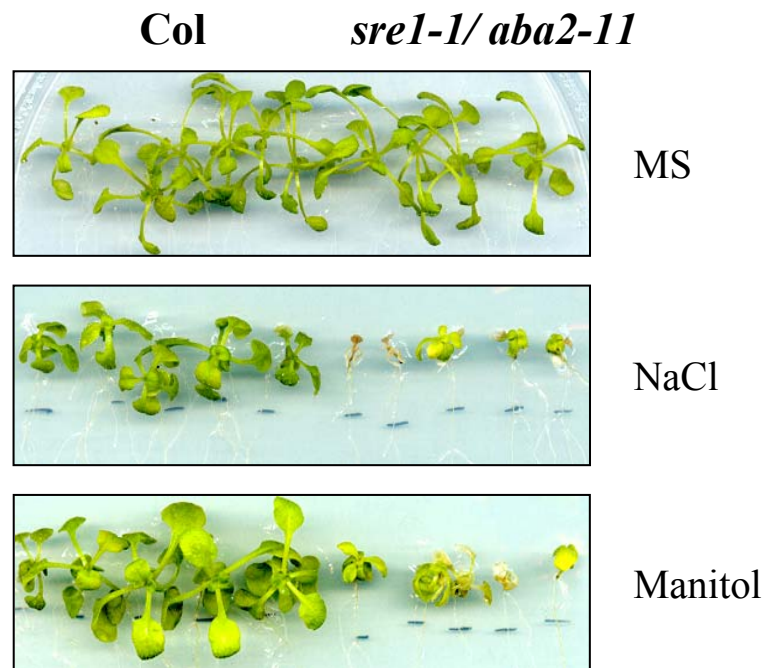


Figura 5.8. Sensibilidad al estrés osmótico de las plántulas *sre1-1/aba2-11*.

Plántulas de seis días del ecotipo silvestre y del mutante *sre1-1/aba2-11* fueron transferidas de placas con medio MS a otras con MS sin sacarosa y suplementadas con NaCl 100 mM o manitol 200 mM. Las placas se sellaron con cinta Micropore™ para permitir el intercambio gaseoso con el ambiente y se pusieron en una cámara de crecimiento *in vitro*. La fotografía se tomó 2 semanas después que las plántulas fueran transferidas a las placas.

Ensayo de transpiración.

El ensayo fue realizado como se describe en el apartado 4.4. Los resultados obtenidos muestran claramente como los alelos mutantes *aba2-1*, *sre1-1/aba2-11* y *sre1-2/aba2-12* poseen una pérdida de agua mayor que la del ecotipo silvestre. De todos los mutantes, el mutante *sre1-2/aba2-12* fue el que más redujo su porcentaje de peso fresco, llegando a perder hasta un 80 % de su peso fresco en 60 minutos. En cambio el mutante *sre1-1/aba2-11* perdió hasta un 60 % y el *aba 2-1* hasta un 40% (Figura 5.9).

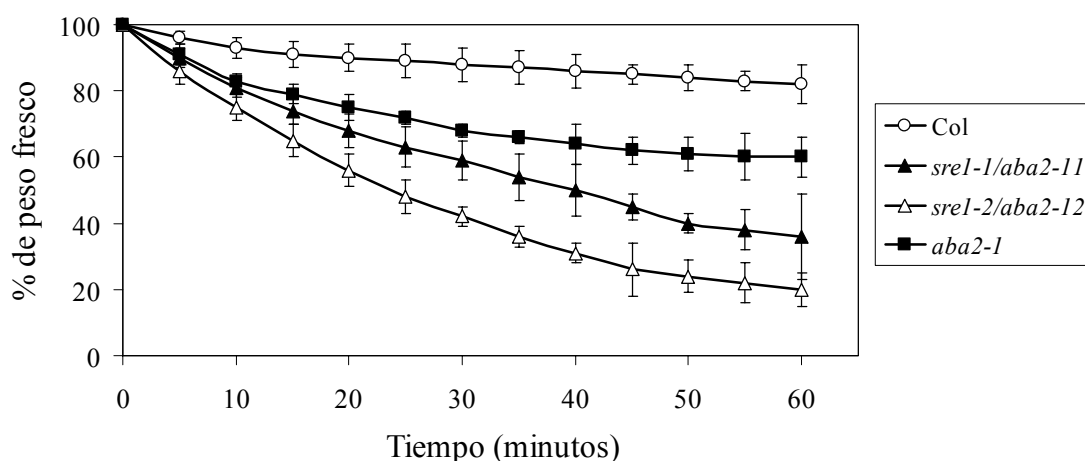


Figura 5.9. Cinética de pérdida de agua de los mutantes *aba2*.

Se cortaron 2-3 hojas de roseta de cada planta y se pesaron cada 5 minutos. Se representa la pérdida de peso en porcentaje para el ecotipo silvestre Col y los mutantes *sre1-1/aba2-11*, *sre1-2/aba2-12* y *aba2-1*.

Medidas de ácido abscísico y prolina.

Los diferentes ensayos de germinación realizados con los mutantes *aba2* mostraron que todos los alelos poseían unas respuestas similares. Sin embargo el ensayo de transpiración mostró una diferencia entre los alelos mutantes *aba2*, diferencia que podría ser debida a unos diferentes niveles de ABA. Esta hipótesis fue analizada mediante la realización de las medidas del ABA presente en las hojas de roseta de los alelos *aba2*. La Tabla 5.6. muestra las medidas de los niveles de ABA obtenidas en condiciones de estrés salino, de estrés por sequía y sin estrés.

Tabla 5.6. Niveles de ácido abscísico (ng ABA/gramo de peso seco).

Se emplearon hojas de roseta de plantas del ecotipo silvestre y de los mutantes *sre1-1/aba2-11* y *aba2-1* sin tratar, tratadas con NaCl 200 mM durante 5 días (estrés salino) y mantenidas 7 días sin regar (estrés por sequía).

	Sin estrés	Estrés salino	Estrés por sequía
Col	103±13	828±70	811±76
<i>sre1-1/aba2-11</i>	25± 3	35±5	27±5
<i>sre1-2/aba2-12</i>	<20	<20	<20
<i>aba2-1</i>	22± 3	45± 4	46±4

En condiciones sin estrés el contenido de ABA en los mutantes *aba2* es aproximadamente el 25 % del contenido de ABA del ecotipo silvestre. En condiciones de estrés los niveles de ABA en los mutantes *aba2* prácticamente no

aumentan mientras en el ecotipo silvestre aumentan hasta 8 veces. En estas condiciones, el ecotipo silvestre posee entre 20 y 30 veces más ABA que los mutantes *aba2* (Tabla 5.6.). De los tres alelos mutantes *aba2* analizados el que presenta menores niveles es el alelo *sre1-2/aba2-12*, niveles que están por debajo del límite fiable de detección de la técnica de medición.

La medición de los niveles de prolina mostró que los mutantes *sre1-1/aba2-11* y *aba2-1* poseen más cantidad de prolina en condiciones sin estrés, al contrario de lo que ocurre en el ecotipo silvestre. En cambio, en condiciones de estrés los niveles de prolina en el ecotipo silvestre aumentan mientras que en los mutantes *aba2* disminuyen.

Tabla 5.7. Niveles de prolina (μ moles prolina/gramo de peso seco).

La medición se realizó en hojas de roseta de plantas del ecotipo silvestre y de los mutantes *sre1-1/aba2-11* y *aba2-1*, en condiciones sin estrés, con estrés salino (200 mM NaCl durante 5 días) y con estrés por sequía (7 días sin regar).

Genotipo	Sin estrés	Estrés salino	Estrés por sequía
Col	0,73 \pm 0,31	8,78 \pm 0,76	1,41 \pm 0,77
<i>sre1-1/aba2-11</i>	2,85 \pm 0,48	2,18 \pm 0,32	1,97 \pm 0,42
<i>aba2-1</i>	2,45 \pm 0,35	1,77 \pm 0,44	1,63 \pm 0,42

Caracterización molecular.

Clonación mediante mapeo posicional del locus ABA2.

La población de mapeo empleada para la localización del gen ABA2 fue generada según se describe en el apartado 4.2. El listado de los distintos marcadores moleculares empleados se encuentra en el apéndice.

El mutante *aba2* fue aislado y mapeado por primera vez en el brazo pequeño del cromosoma I de *Arabidopsis thaliana* por Leon-Kloosterziel, K. M. et al., 1996) ligado al marcador morfológico ch1. Así inicialmente, se procedió a identificar a los marcadores *ciw1* (70 cM) y *nga280* (83 cM), localizados en el brazo inferior del cromosoma I, como los marcadores flanqueantes del *locus* ABA2, en posición centromérica y telomérica respectivamente (Figura 5.10.). El intervalo donde se localizaba el gen ABA2 se fue reduciendo por ambos extremos de acuerdo con los puntos de recombinación definidos por los nuevos marcadores moleculares SSLP desarrollados, llegando a establecer un “contig” de cromosomas artificiales de bacterias (BACs) que contenía al *locus* ABA2. Finalmente se definió un intervalo

que incluía los BACs F5F19, F9I5, F19K6 y F6D8 en el cual ya no era posible encontrar individuos recombinantes en la población mutante y cuyos extremos eran los marcadores localizados en los BACs F5F19 y F6D8 (Figura 5.10.).

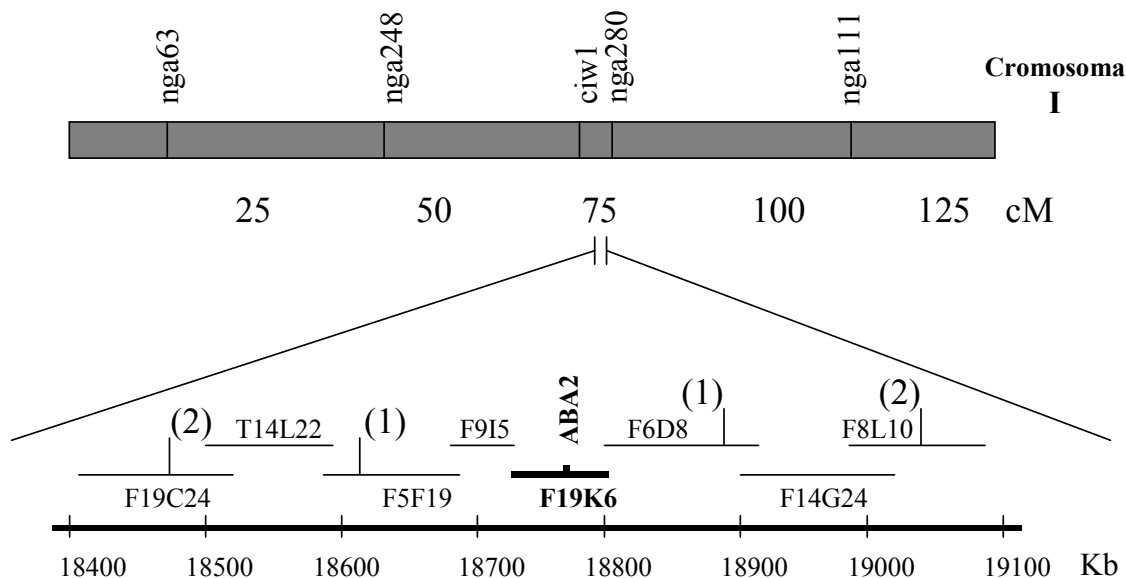


Figura 5.10. Localización mediante mapeo posicional del gen ABA2 en el clon BAC F19K6 situado en el brazo pequeño del cromosoma I.

Los marcadores SSLP *ciw1* y *nga280* fueron inicialmente identificados como los marcadores cosegregantes y flanqueantes en la región del *locus* diana en posición centromérica y telomérica, respectivamente. Las barras verticales representan los marcadores SSLP polimórficos empleados para localizar los puntos de recombinación (el número de recombinantes para cada marcador está indicado entre paréntesis) y para construir un “contig” de BACs que contiene al *locus* ABA2. Se indica la posición del “contig” de BACs con respecto al mapa AGI (Arabidopsis Genome Initiative, <http://www.arabidopsis.org/servlets/mapper>). cM, centimorgan. Kb, kilobases.

En este punto, se continuó la identificación del gen ABA2 mediante la hipótesis del gen candidato. Para ello se analizaron en detalle los genes de los BACs incluidos en el intervalo definido por los marcadores localizados en los BACs F5F19 y F6D8. En este análisis se identificaron varios genes candidatos que codificaban proteínas cuya función podía corresponder a la de la proteína ABA2. Los datos disponibles en la bibliografía indicaban que el paso de transformación de la xantoxina a aldehído abscísico catalizado por la actividad ABA2 consistiría en la oxidación a cetona del grupo 4'-hidroxilo seguido de la apertura del anillo epóxido de la xantoxina y la desturación del enlace 2'3' mediante una o varias actividades. Así de los genes candidatos, el gen At1g52340 localizado en el BAC F19K6 y que codifica un miembro de la familia de las alcohol deshidrogenasas de cadena corta parecía ser el mejor gen candidato, de acuerdo con la hipotética actividad ABA2

(Schwartz, S. H. et al., 1997a) y a los posteriores indicios suministrados sobre la identidad del gen ABA2 (Rook, F. et al., 2001) .

El gen At1g52340, de 1531 nucleótidos de longitud, fue amplificado del DNA genómico del ecotipo silvestre y de los mutantes *sre1-1/aba2-11* y *sre1-2/aba2-12*, empleando los cebadores específicos 5'ABA2 y 3'ABA2 (Figura 5.11.A). El análisis de los productos de PCR mediante electroforesis mostró que el fragmento amplificado en las plantas mutantes *sre1-1/aba2-11* era menor que el correspondiente para el ecotipo silvestre y para el otro alelo mutante, indicando una posible delección en la secuencia del gen At1g52340 (Figura 5.11.B). La existencia de una serie alélica de mutaciones en un gen que cosegrega con un fenotipo mutante es evidencia de que el gen representa el *locus* mutante. Así la caracterización molecular de las mutaciones de varios alelos *aba2* confirmó inequívocamente al gen At1g52340 como el gen ABA2 (ver Tabla 5.8.)

Caracterización molecular de las mutaciones.

Para la caracterización molecular de las mutaciones se procedió a secuenciar el gen At1g52340/ABA2 en los mutantes *aba2* empleando los cebadores denominados 5'ABA2, 5'ABA2-795 y 3'ABA2 (Figura 5.11.A.). Los productos de PCR obtenidos con las parejas de cebadores (5'ABA2, 3'ABA2) y (5'ABA2-795, 3'ABA2) fueron clonados y varios clones diferentes se enviaron a secuenciar para evitar los posibles errores cometidos por la polimerasa en la reacción de amplificación.

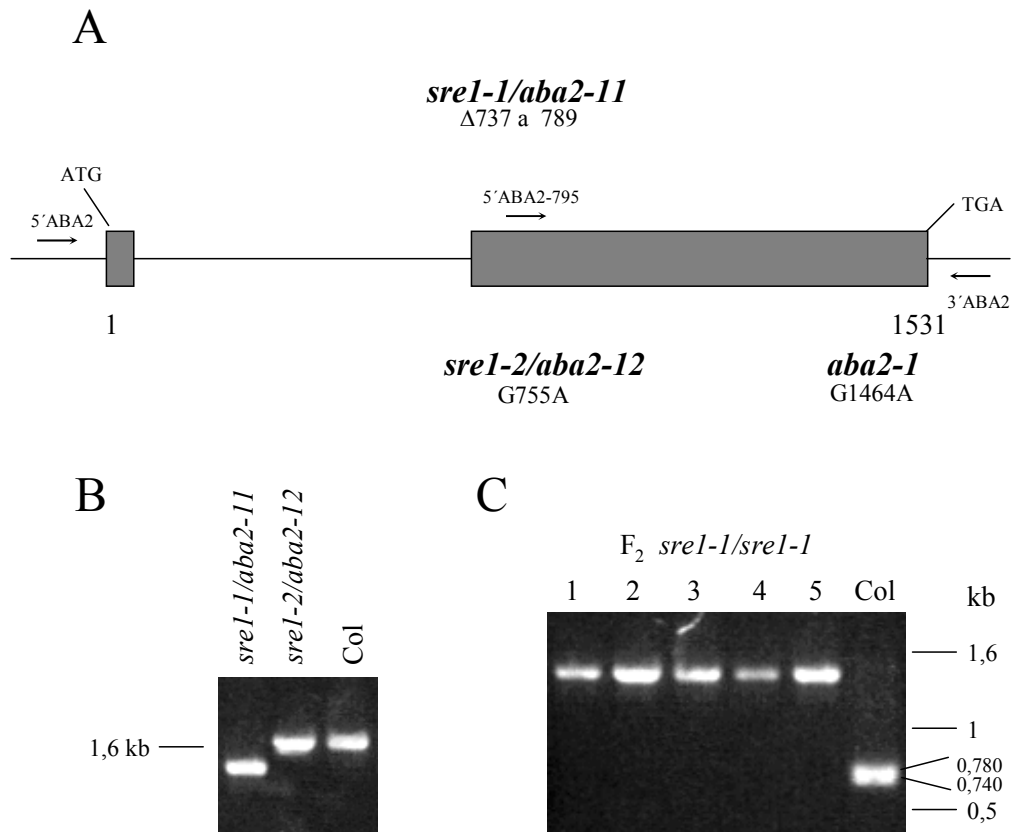


Figura 5.11. Estructura genómica del gen ABA2 y de las mutaciones en los mutantes *aba2*.

(A) Estructura del gen ABA2 y localización de las mutaciones en los mutantes *aba2*. La numeración se inicia en el codón del inicio de la traducción ATG. Los bloques representan la pauta abierta de lectura. Se indica la posición de los cebadores empleados para la identificación de las mutaciones en los alelos *aba2*.

(B) Electroforesis del gen ABA2 amplificado con los cebadores 5'ABA2 y 3'ABA2 a partir de DNA genómico del ecotipo silvestre y los mutantes *sre1-1/aba2-11* y *sre1-2/aba2-12*. Se indica la posición de la banda de 1,6 Kb del marcador.

(C) Marcador polimórfico CAPS. DNA de individuos F₂ homocigotos *sre1-1/aba2-11* fue amplificado empleando los cebadores 5'ABA2 y 3'ABA2 y el fragmento obtenido fue digerido con la enzima de restricción *BclI*. La digestión fue visualizada en un gel de agarosa 1%. Se indica el tamaño de las dos bandas que forman la banda observada en el ecotipo silvestre.

La secuenciación en el mutante *sre1-1/aba2-11* permitió identificar una delección de 53 nucleótidos en la secuencia del gen. Esta delección comprendía desde el nucleótido 737 al 789 y además provocaba un cambio en la pauta de lectura de gen. Así, la traducción del RNA mensajero del gen en el mutante produciría una proteína truncada de solo 22 aminoácidos, de los cuales los 10 últimos serían erróneos debido al cambio en la pauta de lectura del gen, siendo presumiblemente un alelo nulo del gen ABA2. La identificación de esta delección en la secuencia del gen permitió desarrollar un marcador polimórfico CAPS basado en la pérdida de un sitio de corte para la enzima de restricción *BclI*, localizado en el nucleótido 744 contando

desde el ATG. Este marcador CAPS fue empleado para analizar la presencia de la delección en los cromosomas de individuos F₂ homocigotos *sre1-1/aba2-11*. Para ello DNA de plantas F₂ homocigotas mutantes y del ecotipo silvestre se amplificaron con los cebadores 5'ABA2 y 3'ABA2. El fragmento amplificado, de 1,6 kb en el ecotipo silvestre y algo menor en las plantas mutantes (Figura 5.11.B.), fue digerido con la enzima de restricción *BclI* y el resultado de la digestión se visualizó empleando un gel de agarosa. Como resultado se obtuvo que las plantas homocigotas mutantes *sre1-1/aba2-11* no mostraron variación en el tamaño del fragmento, mientras que el ecotipo silvestre mostraba dos bandas solapadas de 780 y 810 pares de bases (pb) aproximadamente como resultado de la digestión del fragmento de 1,6 kb. El análisis de los individuos homocigotos *sre1-1/aba2-11* mostró que existía cosegregación entre el alelo *sre1-1/aba2-11* del marcador CAPS y el fenotipo deficiente en ABA (Figura 5.11.C.).

La secuenciación del producto de amplificación con los cebadores 5'ABA2 y 3'ABA2 en el mutante *sre1-2/aba2-12* permitió identificar un cambio nucleotídico en la secuencia del gen ABA2. Concretamente el nucleótido en posición 755 cambiaba de guanina a adenina (Figura 5.11.A.). Este cambio nucleotídico provocaba el cambio del aminoácido en posición 28 en el mutante, pasando de una glicina (G) a una arginina (R). También se realizó la secuenciación del gen ABA2 en el mutante *aba2-1*, encontrándose el cambio de la guanina en posición 1464 por una adenina, cambio que produciría en la proteína el cambio de la serina (S) en posición 264 por una asparagina (N) (Figura 5.12.).

Paralelamente al trabajo realizado en la presente tesis doctoral, el grupo del profesor José Luis Micol realizó el aislamiento (Quesada, V. et al., 2000) y la caracterización de los mutantes *salobreño* (*sañ*). En concreto, determinaron que los mutantes *sañ3-1* y *sañ3-2* contenían nuevos alelos mutantes del *locus* ABA2, los cuales se red denominaron como *aba2-13* y *aba2-14* respectivamente. La secuenciación del *locus* ABA2 en estos alelos mutantes determinó que el alelo *sañ3-1/aba2-13* posee el cambio de la citosina en posición 1200 a una timina, mientras que el alelo *sañ3-2/aba2-14* posee la delección de 951 nucleótidos, desde el nucleótido -492 hasta el nucleótido 459 (José Luis Micol, comunicación personal; Tabla 5.8.).

Tabla 5.8. Caracterización molecular de las mutaciones *aba2*.

El número del nucleótido está referido al codón de inicio ATG. EMS, etil metilsulfonato.

Alelo	Mutageno	Cambio nucleotídico	Cambio en la proteína
<i>aba2-1</i>	EMS	G1464A	Ser264Asn
<i>sre1-1/aba2-11</i>	T-DNA	Δ 53 pb, desde 737 a 789	Delección/ Cambio en la traducción
<i>sre1-2/aba2-12</i>	T-DNA	G755A	Gly28Arg
<i>sañ3-1/aba2-13</i>	EMS	C1200T	Ser176Phe
<i>sañ3-2/aba2-14</i>	Neutrones rápidos	Δ 951 pb, desde -492 a 459	Delección/ Cambio en la traducción

ABA2 codifica una alcohol deshidrogenasa de cadena corta.

El cDNA del gen ABA2 fue obtenido mediante la reacción de la transcriptasa en reverso empleando como molde RNA mensajero extraído del ecotipo silvestre y los cebadores específicos 5' ABA2 y 3' ABA2. Posteriormente el cDNA de ABA2 fue clonado y secuenciado en su totalidad. La comparación entre las secuencias del cDNA y del DNA genómico confirmaron que el gen ABA2 estaba compuesto por dos exones y un intron (Figura 5.11.). El cDNA contenía una pauta abierta de lectura de 858 pb que hipotéticamente codificaba una proteína de 285 aminoácidos (aa) con masa molecular de 30,2 kDa.

Diversas búsquedas en las bases de datos mostraron que la proteína ABA2 pertenece a la familia denominada alcohol deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDR) (Figura 5.12.). Esta familia de enzimas contiene deshidrogenasas de procariotas y de insectos, así como algunas enzimas de mamíferos como la 15-hidroxi prostanglandina deshidrogenasa y 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Persson, B. et al., 1991; Jornvall, H. et al., 1995). El análisis de la estructura primaria de la proteína ABA2 muestra los dos motivos de secuencia comunes en

todos los miembros de esta familia (Figura 5.12.). Estos son el motivo de unión del coenzima, definido por la secuencia Gly₂₇-X-X-X-Gly₃₁-X-Gly₃₃ y el motivo definido por la secuencia Tyr₁₇₃-X-X-X-Lys₁₇₇, localizado en el hipotético sitio activo de estas enzimas (Jornvall, H. et al., 1995). En general, las enzimas que pertenecen a la familia SDR muestran una identidad de residuos entre el 15-30%. No obstante, las estructuras terciarias resueltas de algunos de los miembros revelan una estructura similar de tipo un-dominio con un patrón de 7 a 8 hojas β en un entorno de estructuras α/β . En general, este patrón de plegamiento es típico del sitio de unión al coenzima de las enzimas deshidrogenasas (Rossmann, M. G. and Argos, P., 1978). Sin embargo, la estructura terciaria del tipo un-dominio constituye una clara diferencia con la estructura en dos-dominios de las enzimas conocidas como de cadena media. Estas enzimas de cadena media son también conocidas como clásicas e incluso deshidrogenasas dependientes de zinc e incluyen una serie de enzimas de levadura y mamíferos muy bien conocidas como las alcohol, lactato y malato deshidrogenasas y la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa.

El alelo mutante *sre1-1/aba2-11* codifica un péptido de solo 22 aminoácidos, sin embargo las mutaciones *sre1-2/aba2-12* y *aba2-1* producen un cambio aminoacídico en la secuencia de la proteína. La mutación *sre1-2/aba2-12* provoca la sustitución de la glicina en posición 28 por una arginina en el dominio de unión del coenzima. En cambio, la mutación *aba2-1* provoca la sustitución de la serina en posición 264 por una asparragina, cambio que afectaría al hipotético sitio de unión del sustrato, el cual parece estar situado en el extremo C-terminal de las SDR (Ghosh, D. et al., 1991; Jornvall, H. et al., 1995; Figura 5.12.).

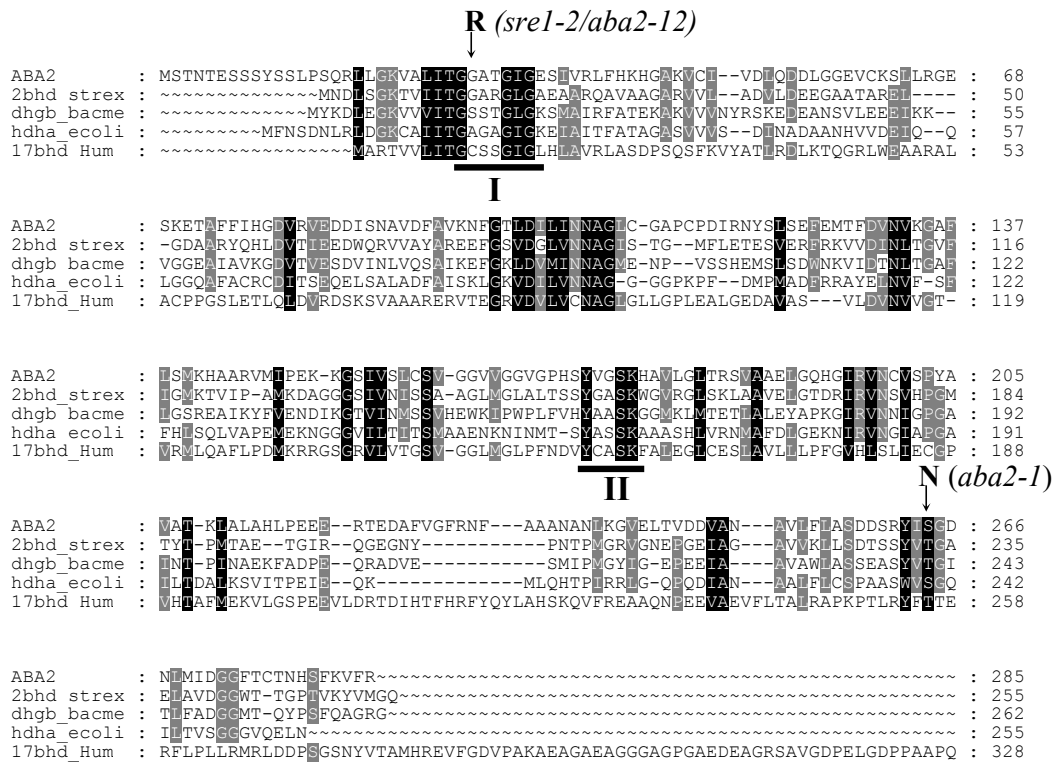


Figura 5.12. Alineamiento de la proteína ABA2 con otros miembros de la familia SDR.

Las secuencias de la proteína ABA2 de *A.thaliana* (At1g52340), 3α 20 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa de *Streptomyces exfoliatus* (2bhd strex), Glc 1-deshidrogenasa de *Bacillus megaterium* (dhgb bacme), 7α -hidroxiesteroide deshidrogenasa de *E. coli* (hdha ecoli) y 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa de humanos (17bhd Hum) fueron alineadas empleando los programas PileUp y Genedoc. Las posiciones con residuos de aminoácidos idénticos o sustituciones conservativas están resaltadas en color negro cuando son idénticas en todas las proteínas o en gris cuando solo coinciden 4 de las 5. Los residuos GXXXGXG del sitio de unión del coenzima (I) y del motivo (II) con secuencia YXXXXK están subrayados. Los cambios de aminoácidos resultantes de las mutaciones *aba2-1* y *sre1-2/aba2-12* están indicados.

Caracterización bioquímica de la proteína ABA2.

La secuencia codificante del gen ABA2 fue amplificada mediante RT-PCR empleando RNA mensajero del ecotipo silvestre y de los mutantes *aba2-1* y *sre1-2/aba2-12* con los cebadores específicos 5'ABA2BRI y 3'ABA2B (ver punto 3.2. de materiales). El cDNA resultante fue clonado en el vector de expresión pET28a, en fase con una secuencia que codifica una cola de histidinas. Las proteínas recombinantes fueron expresadas en *E. coli* y purificadas mediante un sistema de cromatografía de afinidad con resina de agarosa Ni-NTA. Además de la proteína ABA2, se purificaron las proteínas recombinantes S264N *aba2-1* y G28R *aba2-12* para poder determinar el efecto ambas mutaciones en la actividad de la enzima (Figura 5.14.A).

Inicialmente se determinó la actividad alcohol deshidrogenasa de la proteína recombinante ABA2 empleando una serie de alcoholes con una estructura cada vez más compleja y similar al ABA. Asimismo se analizó si la reacción era dependiente del coenzima NAD^+ , NADP^+ o se podían emplear ambos indistintamente. Se emplearon alcoholes como el etanol, isopropanol, butanol, ciclohexanol, 2,6-dimetilciclohexanol y 3,5,5'-trimetil ciclohexanol (Figura 5.14.D.). El resultado fue negativo en todos los casos salvo con el alcohol 3,5,5'-trimetil ciclohexanol, compuesto que posee un anillo estructuralmente similar al de la xantoxina, que si fue oxidado por la proteína ABA2 con un valor de K_m de 10 mM. Además la reacción de oxidación catalizada por la enzima ABA2 resultó totalmente dependiente del coenzima NAD^+ , puesto que el NADP^+ no pudo reemplazar al NAD^+ como coenzima.

A continuación se determinó la actividad alcohol deshidrogenasa empleando el hipotético sustrato natural de la enzima xantoxina (Figura 5.13). La xantoxina y el aldehído abscísico fueron suministrados por el Dr Jan A.D. Zeevaart (MSU-DOE Plant Research Laboratory, Michigan State University, USA). La solución de xantoxina estaba compuesta por una mezcla 1:1 de los isómeros 2-cis,4-trans y 2-trans,4-trans, la cual se obtiene simplemente por la exposición de la xantoxina a la luz (Burden, R. S. and Taylor, H. F., 1970). En cambio la solución estándar de aldehído abscísico estaba compuesta mayoritariamente el isómero 2-cis,4-trans, aunque también se puede detectar un pequeño pico correspondiente al isómero 2-trans,4-trans (Figura 5.13.A.).

Para determinar los productos de la reacción se incubó el sustrato xantoxina con la proteína ABA2 en presencia de la coenzima NAD^+ , y al cabo de una hora se analizaron los productos mediante HPLC-espectrometría de masas. Los productos de la reacción fueron identificados como 2-cis,4-trans aldehído abscísico (pico con un tiempo de retención de 13,30 minutos) y 2-trans,4-trans aldehído abscísico (pico con un tiempo de retención de 12,77 minutos) mediante la comparación de los perfiles cromatográficos de HPLC y de la espectrofotometría de masas del estándar aldehído abscísico (Figura 5.13.B). El análisis de los productos mostró que la proteína ABA2 fue capaz de convertir cada isómero de xantoxina a su correspondiente isómero de aldehído abscísico, aunque el isómero 2-cis,4-trans xantoxina fue transformado más eficientemente. Esta mayor eficiencia posee sentido biológico puesto que el corte de

9-cis-epoxicarotenoide por la enzima NECD produce el isómero 2-cis,4-trans-xantoxina (Schwartz, S. H. et al., 1997b).

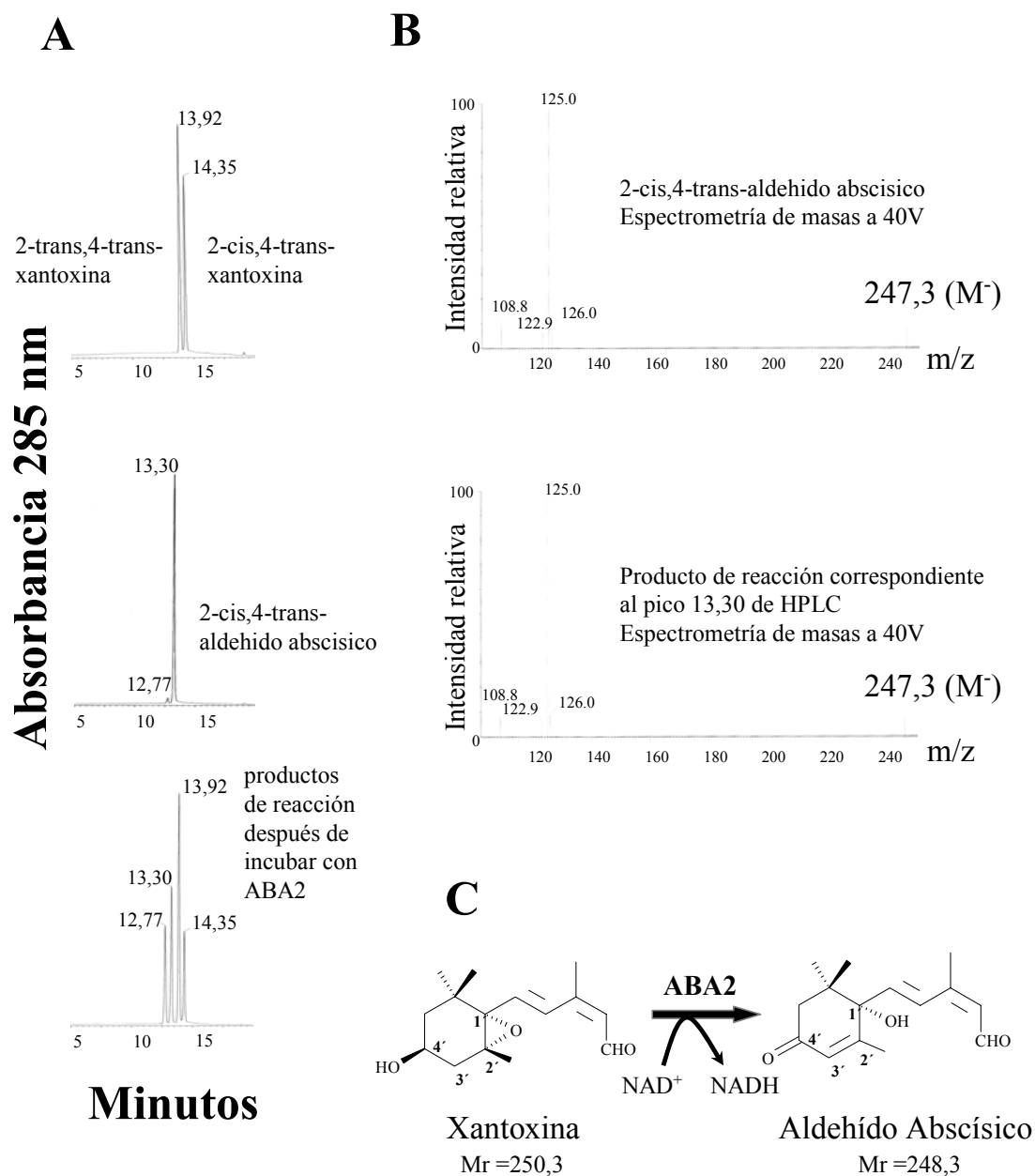


Figura 5.13. Identificación mediante análisis por HPLC-Espectrometría de masas de los productos de la reacción después de la incubación de xantoxina con la proteína recombinante ABA2.

(A) Cromatogramas de HPLC del sustrato xantoxina (arriba), el estándar de aldehído abscísico (centro) y de los productos de reacción después de la incubación con la proteína ABA2 (abajo).

(B) Espectro de masas del estándar 2-cis,4-trans aldehído abscísico (arriba) y del producto de reacción con un tiempo de retención de 13,30 minutos (abajo). El anión molecular del compuesto (M^-) está indicado. Un espectro similar fue obtenido para el producto de reacción eluido al tiempo de retención de 12,77, que corresponde al isómero 2-trans,4-trans producido a partir de la 2-trans,4-trans xantoxina.

(C) Reacción catalizada por la proteína ABA2. La conversión de xantoxina a aldehído abscísico implica la oxidación del grupo cetona en posición C4' así como la apertura del grupo epoxido en posición 1'-2'. La apertura del grupo epoxido provoca la desaturación del doble enlace 2'-3' y la formación de un grupo hidroxilo en C1'. Se indican los pesos moleculares (Mr) de los dos compuestos.

Finalmente se realizó el estudio de la actividad xantoxina oxidasa catalizada por la proteína ABA2. La proteína recombinante ABA2 fue capaz de catalizar la reacción de oxidación de la xantoxina dependiente del coenzima NAD^+ con un valor de K_m de $19 \mu\text{M}$ (Figura 5.14.B). El análisis se completó determinando la baja capacidad de las proteínas recombinantes S264A *aba2-1* y G28R *aba2-12* para catalizar la oxidación de la xantoxina (Figura 5.14.C).

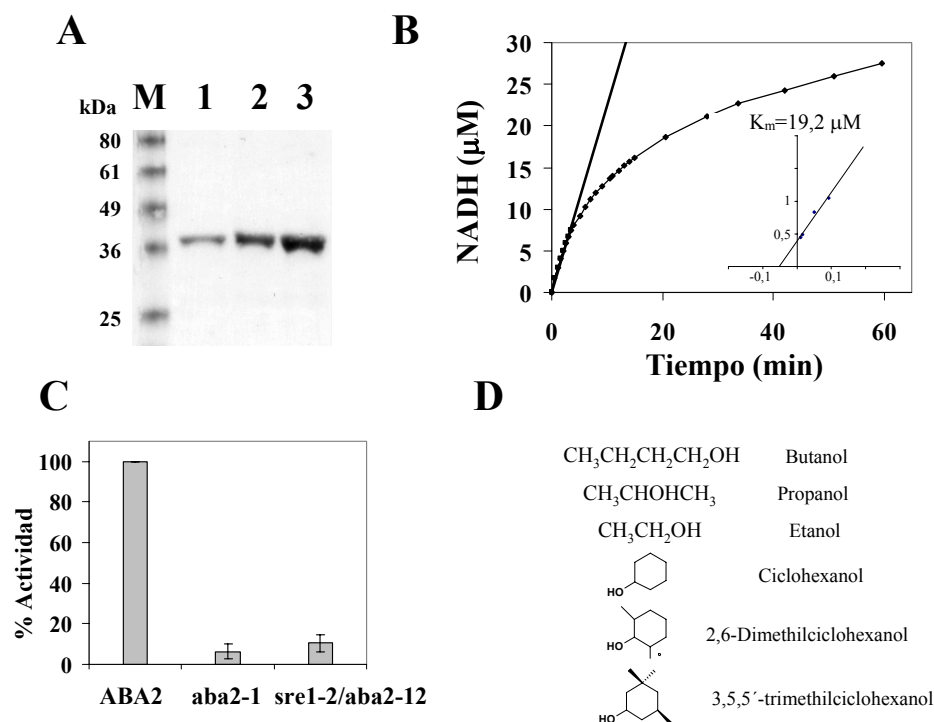


Figura 5.14. Ensayo de la actividad ABA2.

(A) SDS-PAGE de las proteínas recombinantes ABA2, *aba2-1* y *sre1-2/aba2-12*. Las líneas 1, 2 y 3 contienen 3, 6 y 9 μg de la proteína recombinante ABA2, *aba2-1* o *sre1-2/aba2-12*, respectivamente. Los patrones de masa molecular (M) están indicados en kDa.

(B) Cinética de la actividad enzimática de ABA2 utilizando xantoxina como sustrato. La proteína ABA2 fue incubada en una solución que contenía K_2HPO_4 100 mM pH 7,2 como tampón, xantoxina $100 \mu\text{M}$ como sustrato y NAD^+ $100 \mu\text{M}$ como coenzima. La reducción de la coenzima NAD^+ a NADH fue seguida mediante la medición de la A_{340} de la solución. El análisis de regresión de los datos ($R^2=0,99$) fue realizado empleando el programa Microsoft Excell para calcular la velocidad inicial (V_0) de la reacción ($224 \mu\text{M NADH}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) a esta concentración de sustrato (S). El recuadro muestra la representación de dobles inversos de $1/V_0$ frente $1/S$ diferentes concentraciones de xantoxina (10, 20, 60 y $100 \mu\text{M}$)

(C) Comparación de las actividades de las proteínas recombinantes ABA2, *aba2-1* y *sre1-2/aba2-12*. Las condiciones del ensayo están descritas en (B), incubándose durante 20 minutos la reacción. La barra de error indica la desviación estándar calculada a partir de tres experimentos independientes.

(D) Sustratos empleados en los primeros ensayos de la actividad alcohol deshidrogenasa de la proteína recombinante ABA2. Las condiciones del ensayo son las mismas que las empleadas con el sustrato natural xantoxina.

Análisis de la expresión génica.

Análisis de la expresión del gen ABA2.

Se extrajo RNA total de diferentes tejidos de plantas del ecotipo silvestre y se analizó mediante “Northern blot” los niveles de expresión del gen ABA2. La expresión del gen ABA2 fue detectada en todos los tejidos de la planta analizados, aunque requería una exposición prolongada de la membrana (Figura 5.15.A). También se analizó la expresión del gen en los mutantes *sre1-1/aba2-11* y *sre1-2/aba2-12* empleando RNA total extraído de hojas de roseta, no detectándose en ambos mutantes ninguna diferencia significativa de expresión respecto del ecotipo silvestre (Figura 5.15.B).

El análisis de expresión del gen ABA2 fue completado analizando la expresión del gen en plantas sometidas a distintos tratamientos. El RNA total empleado se extrajo de plántulas crecidas en medio líquido sometidas a tratamiento con ABA, NaCl y manitol durante el tiempo indicado. El análisis mostró que la transcripción del gen ABA2 no variaba de forma significativa en respuesta a los distintos tratamientos, mientras que si se observaba una fuerte inducción de los genes control para los distintos tratamientos, RAB18 y RD29A (Figura 5.15.C).

El patrón de expresión obtenido para el gen ABA2 coincide con los datos disponibles que mostraban que el enzima codificado por el gen ABA2 es expresado constitutivamente (Sindhu, R. K. and Walton, D. C., 1987) y no se induce en tratamientos de estrés hídrico (Schwartz, S. H. et al., 1997a).

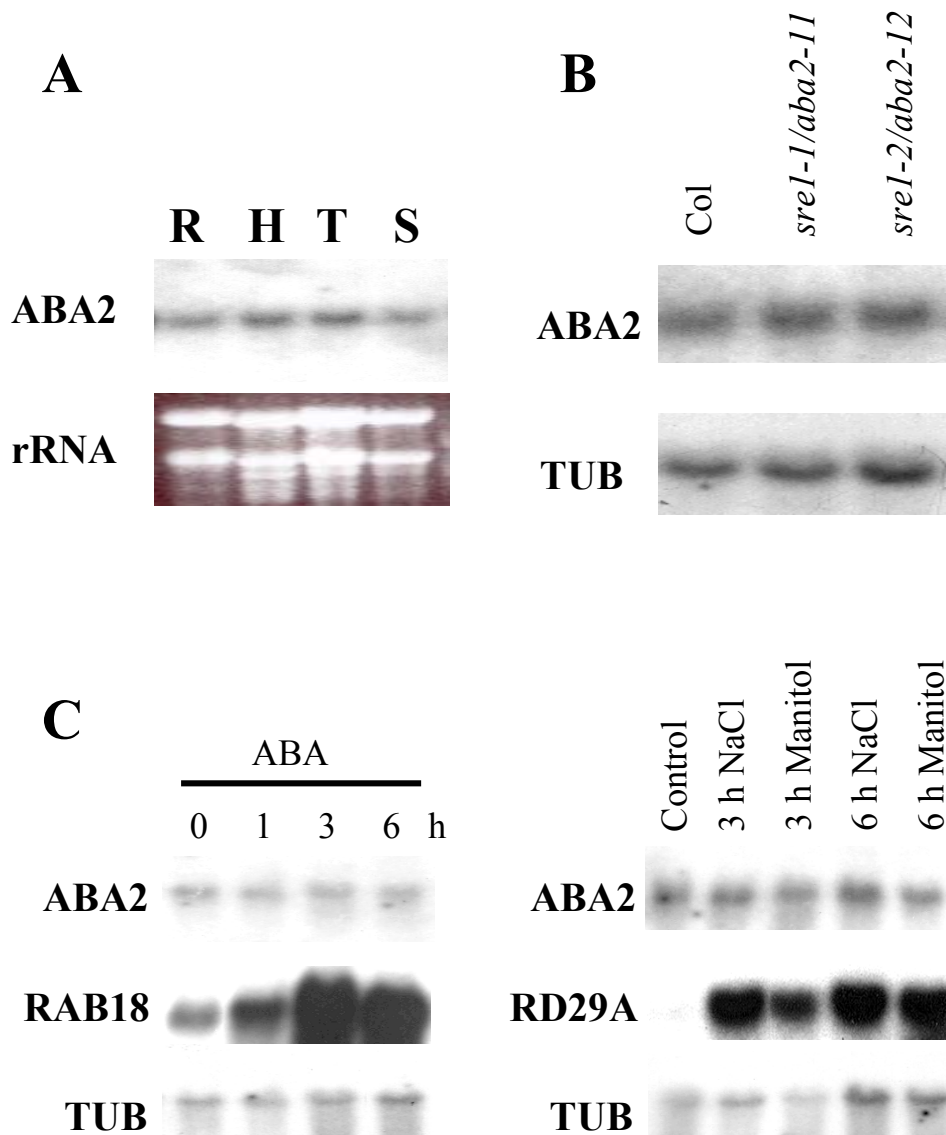


Figura 5.15. Análisis de la expresión del gen ABA2.

(A) Expresión del gen ABA2 en varios órganos de la planta. La membrana contenía aproximadamente 10 μ g de RNA total de raíz (R), hojas (H), tallo (T) y silicuas (S). La carga del gel se determinó mediante la tinción con bromuro de etidio del rRNA.

(B) Análisis de expresión del gen ABA2 en los mutantes *sre1-1/aba2-11* y *sre1-2/aba2-12*. La carga del gel se determinó mediante la hibridación con la sonda del gen de la tubulina (TUB).

(C) Análisis de la expresión de ABA2 en plantas tratadas con ABA 50 μ M (izquierda), NaCl 150 mM (derecha) o manitol 300 mM (derecha). Como control se analizaron los niveles de transcripción de los genes RAB18 y RD29A. La carga del gel se determinó mediante la hibridación con la sonda TUB.

Análisis de la expresión de genes de biosíntesis de ABA.

Puesto que el mutante *sre1-1/aba2-11* poseía un déficit marcado en ABA, resultaba interesante ver si ello afectaba la expresión de otros genes de biosíntesis de ABA como ABA1, AAO3 y NCED3.

En el caso del gen AAO3 no se detecto una expresión significativamente diferente entre el ecotipo silvestre y el mutante. Sin embargo para el gen ABA1 los niveles de expresión fueron mayores en el mutante, al contrario de lo que se observaba en el gen NCED3, donde el mutante poseía unos niveles de expresión prácticamente indetectables (Figura 5.16.).

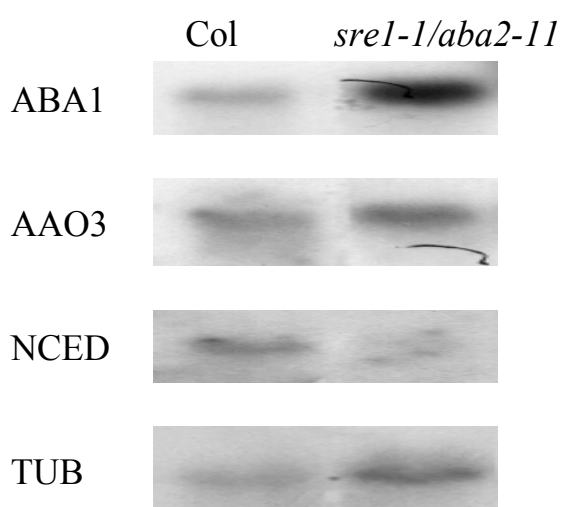


Figura 5.16. Análisis de la expresión de genes de biosíntesis de ABA en el mutantes *sre1-1/aba2-11*.

La membrana contiene aproximadamente 10 µg de RNA total del ecotipo silvestre y del mutante *sre1-1/aba2-11*. La carga del gel se determinó mediante la hibridación con la sonda TUB.

Análisis de la expresión de algunos genes inducibles por estrés.

El análisis fenotípico de las plantas *sre1-1/aba2-11* determinó que estas eran más sensibles al estrés salino. De modo que resultaba interesante examinar en el mutante la expresión de algunos de los genes implicados en la tolerancia al estrés. De los tres genes analizados, el gen RD29A poseía una inducción por estrés más tardía en el mutante y el gen DREB2A era más expresado en el mutante que en el tipo silvestre. El gen P5CS1, gen implicado en la biosíntesis de prolina, era más expresado en condiciones normales en el mutante que en el tipo silvestre (Figura 5.17.), datos que concuerdan perfectamente con los valores obtenidos de prolina en hojas de roseta (Tabla 5.7.).

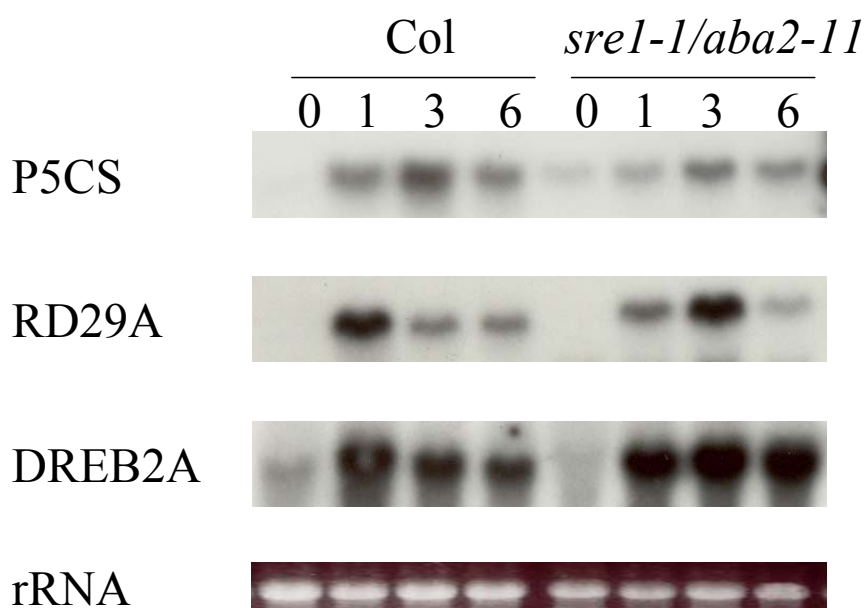


Figura 5.17. Análisis de la expresión de varios genes inducibles por estrés en el mutante *sre1-1/aba2-11*.

La membrana contiene aproximadamente 10 µg de RNA total del ecotipo silvestre y del mutante *sre1-1/aba2-11* preparado de plántulas crecidas en medio líquido durante 2 semanas. Posteriormente las plántulas fueron tratadas con NaCl 150 mM durante el tiempo especificado. La carga del gel fue visualizada mediante la tinción con bromuro de etidio.

Genes con similitud de secuencia a ABA2.

Aislamiento y caracterización.

La caracterización molecular del mutante *sre1-1/aba2-11* indicaba claramente que este mutante sería un alelo nulo para el gen ABA2. En tratamientos con estrés, el tipo silvestre poseía 30 veces más ABA que el mutante. En cambio, en condiciones normales el mutante *sre1-1/aba2-11* poseía unos niveles de ABA solo 4 veces menores que el tipo silvestre. Estos niveles de ABA residuales eran bastante más altos de lo esperado para un mutante nulo (Tabla 5.6.). Una posible explicación de estos niveles podría ser la redundancia génica, aunque la búsqueda en las bases de datos determinó la existencia de una única copia del gen ABA2 en el genoma de *A.thaliana*. No obstante, podrían existir genes en el genoma con similitud de secuencia al gen ABA2 que codificasen actividades enzimáticas capaces de realizar de forma inespecífica la reacción de oxidación de xantoxina a aldehído abscísico en ausencia de ABA2 aunque con muy baja eficiencia.

Para estudiar esta hipótesis se realizó una búsqueda de proteínas similares a ABA2 presentes en las bases de datos de *A.thaliana* empleando la secuencia de la proteína ABA2. Como resultado se obtuvieron una serie de proteínas que pertenecían a la misma familia que la proteína ABA2, la familia de proteínas SDR, entre las que se encontraban las enzimas tropinona reductasa o glucosa deshidrogenasa (Figura 5.18.).

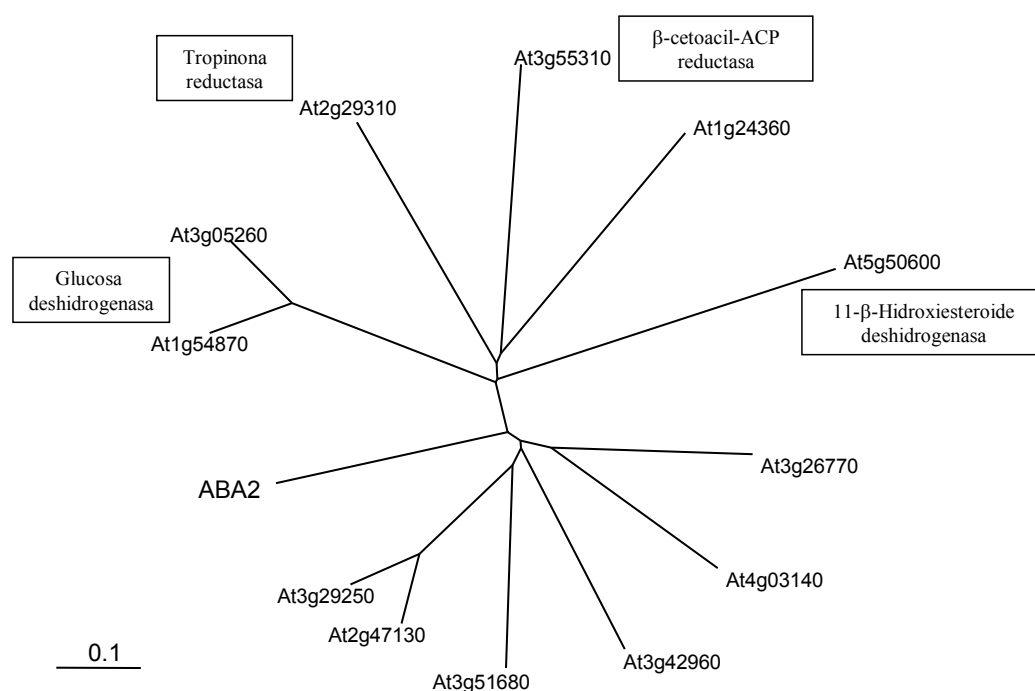


Figura 5.18. Enzimas SDR presentes en el genoma de *A. thaliana*.

La proteína ABA2 se usó para la búsqueda en la base de datos del TAIR empleando el programa PSI-BLAST. Se obtuvieron una serie de miembros representativos de la familia de SDR y se alinearon empleando el programa CLUSTALX 1.81. Se generó el dendrograma correspondiente y se visualizó mediante el programa Treeview. La barra de escala de 0,1 en el árbol sin raíz representa 0,1 sustituciones de aminoácidos por sitio.

De todas las proteínas pertenecientes a la familia SDR, las hipotéticas proteínas codificadas por los genes At3g29250, At2g47130, At3g51680, At3g49260, At4g03140, y At3g26770 fueron las que mostraron una mayor similitud de secuencia con la proteína ABA2 (aproximadamente el 60% de identidad a nivel de aa). Concretamente, estas proteínas mostraban una alta conservación de los residuos situados en dos de los dominios característicos de las alcohol deshidrogenasas de cadena corta, el dominio de unión al coenzima y un dominio localizado en el centro

catalítico de la enzima (indicados como I y II en la Figura 5.19.). Sin embargo, el hipotético sitio de unión de sustrato de las enzimas (indicado como III) no mostraba una elevada conservación de residuos aminoacídicos, indicando que probablemente catalizarían la oxidación específica de diferentes sustratos, aunque podrían catalizar inespecíficamente la conversión de xantoxina a aldehído abscísico.

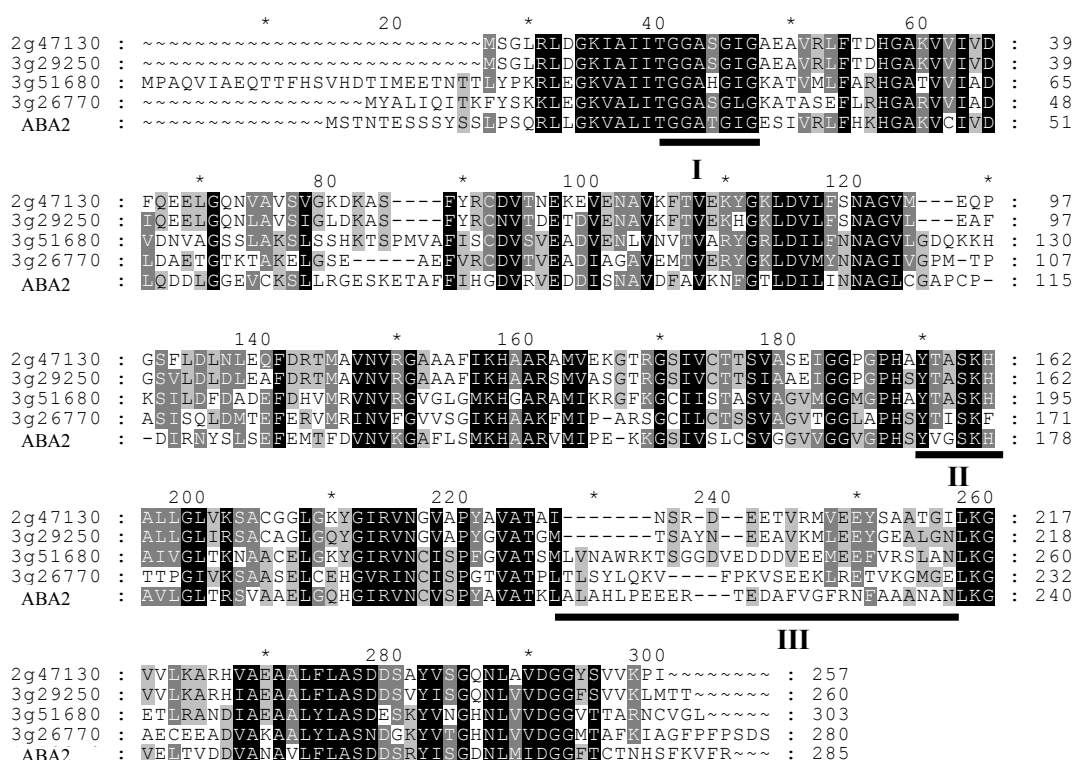


Figura 5.19. Alineamiento de las proteínas similares a ABA2 presentes en el en el genoma de *Arabidopsis thaliana*.

Las secuencias fueron alineadas empleando los programas PileUp y Genedoc. Se indican subrayados los residuos GXXXGXXG del sitio de unión del coenzima (I), del motivo (II) con secuencia YXXXK localizado en el centro catalítico y el sitio de unión a sustrato (III).

Ensayo de actividad

El análisis de las bases de datos de EST permitió identificar la existencia de dos clones, con códigos AV553151 y AV553850 que correspondían a los genes At2g47130 y At3g29250 respectivamente, cuyos productos génicos eran los que mostraban una mayor similitud con la proteína ABA2 (Figura 5.19.). Estos clones fueron suministrados por el Kazusa DNA Research Institute (Japón) y en base a su secuencia se diseñaron cebadores con sitios de corte en sus extremos para favorecer su posterior clonación en el vector de expresión pET28 (punto 3.2.). En este caso,

uno de los cebadores permitía amplificar ambos genes (5'2g47130BRI), mientras que el otro cebador si era específico para cada gen (3'2g47130B y 3'3g29250B; ver punto 3.2.). Los productos amplificados fueron clonados en el vector pET28a y fueron secuenciados para confirmar la identidad de los cDNAs. Las proteínas recombinantes se expresaron en *E. coli* y fueron purificadas mediante el sistema de cromatografía de afinidad con resina de agarosa Ni-NTA. A continuación se realizó el ensayo de actividad alcohol deshidrogenasa en las mismas condiciones que para la proteína recombinante ABA2.

El ensayo de actividad alcohol deshidrogenasa mostró que la proteína recombinante codificada por el gen At2g47130 era capaz de catalizar *in vitro* la oxidación dependiente de NAD^+ de la xantoxina a aldehído abscísico con un valor de K_m de 300 μM , mientras que la proteína codificada por el gen At3g29250 no pudo realizar la oxidación. Este hecho sugiere la existencia de enzimas capaces de llevar a cabo la conversión de xantoxina a aldehído abscísico en ausencia de la actividad ABA2 (Figura 5.20.).

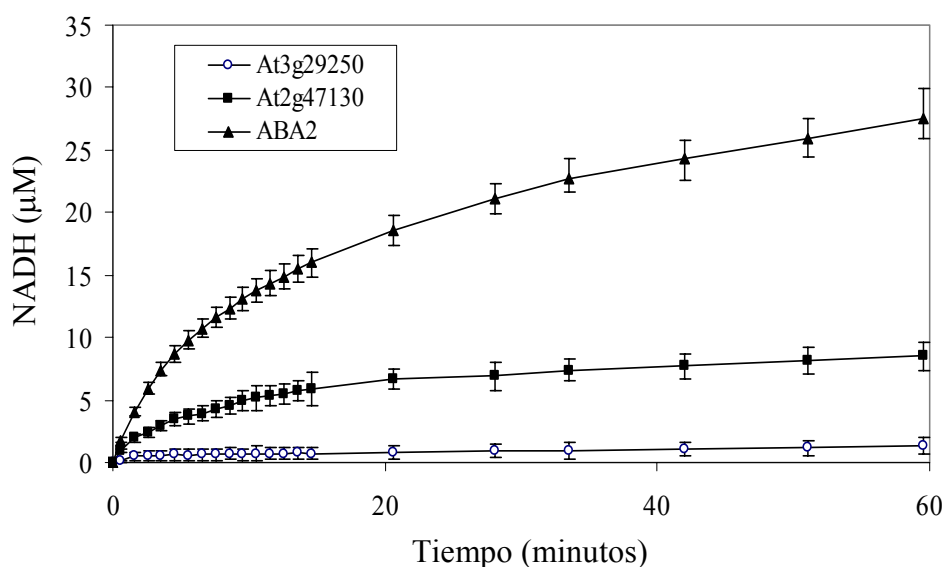


Figura 5.20. Análisis de la actividad alcohol deshidrogenasa de las proteínas recombinantes ABA2, aba2-1 y At2g47130.

Las condiciones de las reacciones son las mismas que las descritas para la proteína recombinante ABA2.

5.3. Mutantes *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3*.

En el genoma de *Arabidopsis thaliana* existen 4 genes que codifican enzimas con actividad aldehído oxidasa (AAO1-4). De ellos, el gen AAO3 codifica una enzima con actividad oxidasa de aldehído abscísico capaz de catalizar la conversión de aldehído abscísico a ácido abscísico, el último paso de la biosíntesis de ácido abscísico (Seo, M. et al., 2000a). Del *locus* AAO3 solo hay descrito el alelo mutante *aao3-1*. Las plantas mutantes *aao3-1* poseen una reducción del 60% en los niveles de ABA en hojas de roseta y en condiciones de baja humedad muestran un fenotipo de marchitamiento. Sin embargo, las semillas mutantes *aao3-1* poseen una reducción de solo el 40 % en los niveles de ABA y una latencia similar a la del ecotipo silvestre. Asimismo, el análisis de la expresión del gen AAO3 mostró que el RNA mensajero no es detectable en semillas. Por eso se concluyó que la actividad oxidasa de aldehído abscísico codificada por el gen AAO3 solo catalizaría el último paso de la biosíntesis de ABA en hojas, pero no en semillas donde se supone que estaría actuando otra enzima oxidasa de aldehído abscísico (Seo, M. et al., 2000b).

El punto 5.1 de esta tesis doctoral describe el aislamiento de dos nuevos alelos mutantes *aao3*, denominados *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3*. En el presente punto de tesis doctoral se incluye un resumen de la caracterización fenotípica realizada anteriormente junto con una detallada caracterización molecular de los nuevos mutantes *aao3* aislados. Así mismo se relacionan los datos obtenidos para los mutantes *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3* con datos del mutante *aao3-1* anteriormente caracterizado.

Identificación de los mutantes.

El análisis de complementación realizado entre los mutantes *sre* determinó la existencia de dos alelos para el grupo denominado *sre2*, los alelos *sre2-1* y *sre2-2*. El análisis sobre la presencia de T-DNA en el genoma de los mutantes indicó que ambos mutantes poseían integraciones de T-DNA en sus genomas. El mutante *sre2-1* poseía 4 integraciones de T-DNA completas que indicaban un patrón complejo de integración. En cambio, el mutante *sre2-2* solo poseía una integración completa de T-DNA (Figura 5.2.).

El análisis de cosegregación en una población F₂ homocigota *sre2-2* entre el fenotipo mutante y el T-DNA determinó que el T-DNA no era el causante del fenotipo en el mutante. Sin embargo, el análisis de 88 individuos F₂ homocigotos *sre2-1* determinó que 3 de las 4 integraciones detectadas en el genoma del mutante estaban siempre presentes y segregaban juntas en los individuos mutantes (Figura 5.3.), de modo que probablemente el T-DNA era el responsable del fenotipo en el mutante *sre2-1*.

El análisis de complementación realizado entre los mutantes *sre* y los mutantes de biosíntesis de ácido abscísico determinó que los mutantes *sre2* eran alélicos al mutante *aao3-1*, pasando desde ese momento a denominar a los mutantes *sre2-1* y *sre2-2* como *aao3-2* y *aao3-3*, respectivamente (Tabla 5.5.).

Caracterización fenotípica.

Ensayos de germinación y establecimiento de plántula.

Los mutantes *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3* mostraron un elevado porcentaje de germinación en medios MS suplementados con NaCl 150 o 200 mM y manitol 400 mM. También el mutante *aao3-1* mostró una germinación significativamente superior a la de su ecotipo silvestre (*La-er*) (Tabla 5.9.) y muy similar a la de los mutantes *sre2/aao3* en medios con manitol. Sin embargo, la germinación del mutante *aao3-1* resultó ser bastante inferior que la de los mutantes *sre2/aao3* en medios con NaCl. Asimismo, se realizó el análisis de la germinación de los distintos mutantes *aao3* en medio MS suplementado con paclobutrazol 10 µM. Como resultado se obtuvo que los mutantes *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3* poseían una germinación superior al 75% mientras que la germinación del mutante *aao3-1* no es significativamente diferente a la de su ecotipo silvestre (*La-er*) (Tabla 5.9.).

Además, las semillas de los mutantes *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3* mostraban una reducida latencia, siendo capaces de germinar inmediatamente después de haber sido recogidas con un porcentaje cercano al 70%. Sin embargo, las semillas del mutante *aao3-1* poseían una latencia equiparable a la que posee su ecotipo silvestre (Seo, M. et al., 2000b) (Tabla 5.9.).

Tabla 5.9.- Germinación de las semillas del ecotipo silvestre y de los mutantes *aao3* en diferentes medios.

Las semillas del ecotipo silvestre (Col o *La-er*) y de los mutantes *aao3* fueron sembradas en placas con medio MS suplementado con NaCl 150 mM o 200 M, manitol 400 mM y paclobutrazol 10 μ M. El porcentaje de germinación y establecimiento de plántula se determinó a 5 (NaCl) o 8 días (manitol y paclobutrazol). La germinación en placas con medio MS fue siempre entre el 95% y 100%. El ensayo de latencia se llevo a cabo con semillas con un desarrollo entre 16 y 18 días después de la polinización, puestas a germinar en placa con medio MS sin estratificación. Los porcentajes de germinación se determinaron a los 5 días. La desviación estándar fue calculada a partir de tres experimentos independientes.

Genotipo	NaCl 150 mM	NaCl 200 mM	Manitol 400 mM	Paclobutrazol 10 μ M	Latencia
Col	1,0 \pm 2,8	0,0 \pm 0	0,0 \pm 0	0,7 \pm 1,2	13,3 \pm 3,9
<i>sre2-1/aao3-2</i>	82,3 \pm 12,3	61,3 \pm 16,5	84,4 \pm 10,0	76,1 \pm 19,1	67,9 \pm 15,0
<i>sre2-2/aao3-3</i>	88,6 \pm 7,7	82,8 \pm 5,3	91,7 \pm 7,1	86,7 \pm 15,1	73,0 \pm 18,6
<i>La-er</i>	6,6 \pm 0,7	0,0 \pm 0	0,8 \pm 1,1	0,0 \pm 0	5,6 \pm 7,5
<i>aao3-1</i>	50,7 \pm 6,4	28,4 \pm 2,0	91,1 \pm 11,0	3,0 \pm 4,2	9,4 \pm 3,7

Así pues, el análisis fenotípico de las semillas mutantes *aao3* mostró diferencias significativas en la latencia y en la germinación en medios suplementados con paclobutrazol entre el mutante *aao3-1* y los mutantes *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3*. En cambio, la germinación bajo tratamiento de estrés salino u osmótico fue similar en todos los mutantes *aao3*, aunque los porcentajes de germinación mostrados por los mutantes *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3* fueron mayores que el porcentaje mostrado por el mutante *aao3-1*. Estos datos revelan la existencia de notables diferencias fenotípicas entre los mutante *aao3* y sugieren que al menos en el fondo genético Col, la actividad codificada por el gen AAO3 esta implicada en la biosíntesis de la hormona ABA en semillas. Por tanto los niveles de ABA en las semillas de los diferentes mutantes *aao3* deberían ser bastante diferentes.

Medidas de ABA en semillas.

Dados los diferentes fenotipos mostrados por las semillas mutantes *aao3*, se procedió a medir los niveles del ABA presente en las semillas del ecotipo silvestre y de los mutantes *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3*, tanto sin tratar como tratadas con estrés salino.

Los resultados obtenidos en ambos tratamientos mostraron que las semillas mutantes *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3* poseían alrededor del 35% del contenido en

ABA de las semillas del ecotipo silvestre Col. Asimismo, el contenido de ABA en las semillas tratadas con NaCl mostraba el aumento de los niveles de ABA como consecuencia del tratamiento tanto en el ecotipo silvestre Col como en los mutantes *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3*, siendo este aumento aproximadamente de 1,6 veces. No obstante, los niveles de ABA en las semillas mutantes seguían siendo alrededor del 35% de las semillas del ecotipo silvestre (Tabla 5.10.)

Tabla 5.10. Contenido de ABA (ng ABA/g peso seco) en semillas.

Los niveles de ABA en los mutantes *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3* fueron medidos en semillas embebidas en medio MS y MS con NaCl 200 mM. Se indica el porcentaje de ABA de las semillas respecto del ecotipo silvestre.

Genotipo	Sin estrés	Estrés salino
Col	151±15 (100%)	250±20 (100%)
<i>sre2-1/aao3-2</i>	52±9 (34%)	83±10 (33%)
<i>sre2-2/aao3-3</i>	57±10 (37%)	91±12 (36%)

Medidas de ácido abscísico en hojas de roseta.

El análisis del ABA presente en los mutantes *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3* se complementó analizando el contenido de ABA presente en las hojas de roseta, tanto en condiciones normales como en condiciones de sequía y estrés salino. Las medidas obtenidas confirmaron que los mutantes también poseían menores niveles de ABA en las hojas, siendo el contenido de ABA 3 veces mayor en el ecotipo silvestre que en los mutantes (Tabla 5.11). Estos resultados son similares a los obtenidos por Seo, M. et al., 2000b) para el mutante *aao3-1*, de modo que todos los mutantes *aao3* poseen aproximadamente el 30 % del contenido de ABA del ecotipo silvestre en hojas de roseta.

Las medidas realizadas en condiciones de estrés mostraron un aumento de entre 3-4 veces en los niveles de ABA en los mutantes *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3* como respuesta al tratamiento de estrés, tal y como ocurre para el mutante *aao3-1* (Seo, M. et al., 2000b). Sin embargo, en estas mismas condiciones se produce un aumento de aproximadamente de 8 veces en los niveles de ABA del ecotipo silvestre. Estos datos muestran que aún siendo capaces de sintetizar ABA en respuesta al tratamiento de estrés, los mutantes *aao3* muestran 7 veces menos ABA que sus ecotipos silvestres (Tabla 5.11.).

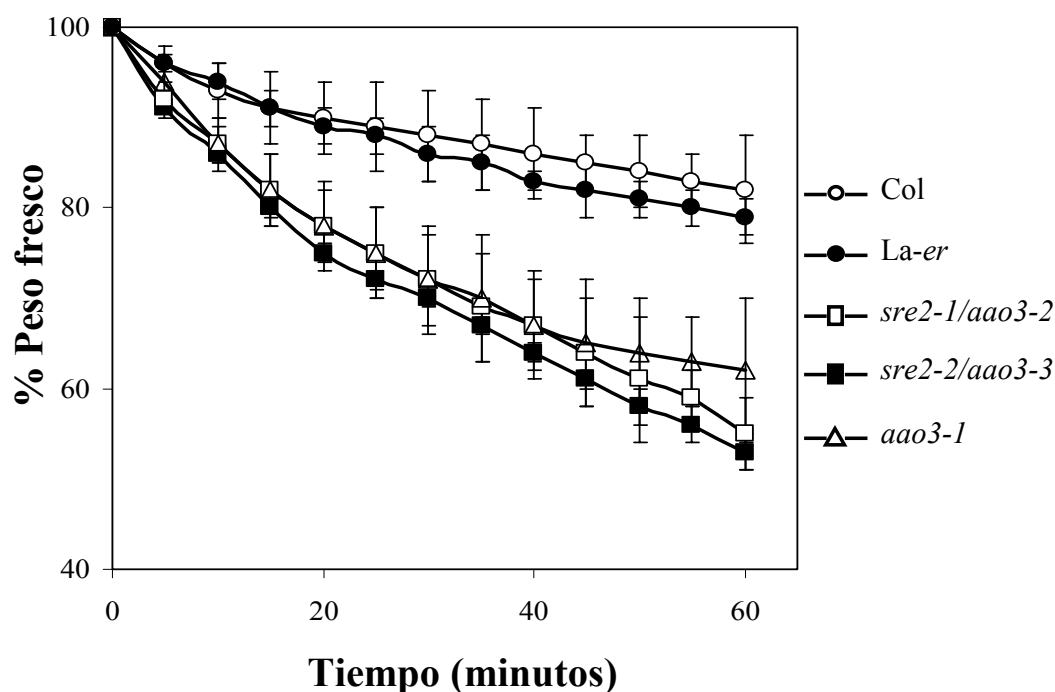
Tabla 5.11.- Contenido de ABA (ng ABA/g peso seco) en hojas de roseta.

Se emplearon hojas de roseta de plantas del ecotipo silvestre y de los mutantes *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3* sin tratar, tratadas con 200 mM NaCl durante 5 días (estrés salino) y mantenidas 7 días sin regar (estrés por sequía). La desviación estándar fue obtenida de tres experimentos diferentes.

Genotipo	Sin estrés	Estrés salino	Estrés por sequía
Col	103±13	828±70	811±76
<i>sre2-1/aao3-2</i>	30± 3	122±13	112±15
<i>sre2-2/aao3-2</i>	35± 5	191±19	162±16

Ensayo de transpiración.

Seo, M. et al., 2000b) describe el aislamiento del mutante *aao3-1* en un rastreo de plantas que muestran un fenotipo de marchitamiento en planta debido un menor contenido en ABA. Para estudiar el fenotipo de marchitamiento en los mutantes *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3* se realizó la determinación de las cinéticas de pérdida de agua de las hojas de roseta. Como resultado se obtuvieron unas cinéticas que mostraban que ambos mutantes poseían una pérdida de peso fresco mayor que la de su ecotipo silvestre Col y similar a la mostrada por el mutante *aao3-1* (Figura 5.21.).

**Figura 5.21.** Cinéticas de pérdida agua de los mutantes *aao3*.

El porcentaje de pérdida de peso fresco se determinó empleando hojas de roseta de plantas de los ecotipos Col y La-er y de los mutantes *aao3-1*, *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3*.

Caracterización molecular.

Caracterización del mutante sre2-1/ao3-2.

Anteriormente se había determinado que el mutante *sre2-1/ao3-2* poseía una integración compleja de T-DNA que cosegregaba con el fenotipo mutante, por lo que resultaba probable que el fenotipo estuviera causado por la integración de T-DNA (ver Figura 5.3.) Mediante la técnica del rescate plasmídico se procedió a recuperar DNA genómico de la planta adyacente a la integración del T-DNA, obteniéndose como resultado dos tipos diferentes de plásmidos. El primer tipo correspondía al plásmido formado cuando se corta una repetición de dos T-DNA contiguos. En cambio, el segundo tipo de plásmido si que contenía DNA genómico de la planta adyacente a la integración del T-DNA. La secuenciación de este segundo tipo de plásmido permitió localizar la inserción de T-DNA en el intrón 1 del gen AAO3. Concretamente el T-DNA se encontraba insertado en el nucleótido 282 del gen AAO3 contando a partir del ATG (Figura 5.22.). Esta integración se encuentra localizada al principio del gen, de modo que lo más probable es que no exista expresión del mismo y el alelo mutante *sre2-1/ao3-2* sea un alelo nulo (ver Figura 5.24.)

en la secuencia del gen AAO3 en el mutante provocaba la pérdida de un sitio de corte para la enzima de restricción *Tai*I (Figura 5.22.). Aprovechando esta diferencia entre el mutante y el ecotipo silvestre se desarrolló un marcador polimórfico CAPS basado en esta enzima de restricción. Así, se amplificaron los DNA genómicos de 30 individuos F₂ homocigotos mutantes *sre2-2/aao3-3* empleando los cebadores 5'AAO3-2673 y 3'AAO3-3681. A continuación el producto fue digerido con la enzima de restricción *Tai*I y visualizado en gel de agarosa. Como resultado se obtuvo que todos los individuos F₂ homocigotos *sre2-2/aao3-3* mostraban el alelo mutante del CAPS (Figura 5.23.), determinándose la existencia de ligamiento entre la delección de los nucleótidos en el gen AAO3 y el fenotipo de deficiencia a ABA.



Figura 5.23. Marcador polimórfico CAPS en el *locus* AAO3.

DNA genómico del ecotipo silvestre y individuos F₂ homocigotos *sre2-2/aao3-3* fue amplificado y digerido con la enzima de restricción *Tai*I. Los números corresponden a individuos F₂ homocigotos *sre2-2/aao3-3*.

Análisis de la expresión génica.

Análisis de expresión del gen AAO3.

El análisis de expresión del gen AAO3 fue realizado empleando RNA total extraído de plantas del ecotipo silvestre Col y de los mutantes *sre2/aao3*. Este análisis mostró la ausencia del RNA mensajero del gen en el mutante *sre2-1/aao3-2*, confirmando que la inserción del T-DNA provocaba la eliminación del transcrito del gen en el mutante. Sin embargo, no se observó ningún cambio significativo ni en los niveles ni en el tamaño del RNA mensajero del gen en el mutante *sre2-2/aao3-3* (Figura 5.24.A).

Anteriormente se había determinado que el gen AAO3 no se expresaba en semillas secas y que las semillas del mutante *ao3-1* poseían una latencia similar a las semillas del ecotipo silvestre, por lo que se especuló que la enzima no participaba en la biosíntesis de ABA en semillas (Seo, M. et al., 2000a; Seo, M. et al., 2000b). Sin embargo, en el presente estudio se han aislado dos nuevos alelos mutantes denominados *sre2-1/ao3-2* y *sre2-2/ao3-3*, que han mostrado una menor latencia y unos menores niveles de ABA en sus semillas (Tablas 5.9. y 5.10.). Estos datos implican claramente a la enzima codificada por el gen AAO3 en la biosíntesis de ABA en semillas.

Para apoyar esta afirmación se analizó nuevamente la expresión del gen AAO3 en el estadio de semilla, empleando RNA extraído de silicuas verdes y de semillas del ecotipo Col. El análisis en silicuas verdes confirmó la expresión del gen durante la formación de la semilla, aunque fue necesario utilizar entre 10 y 20 µg de RNA total para detectar la presencia del RNA mensajero (Figura 5.24.B, izquierda). Así mismo, el análisis de la expresión en semillas confirmó que durante la germinación en condiciones sin estrés la expresión del gen AAO3 es indetectable, al igual que en semillas secas (Seo, M. et al., 2000b). No obstante, en condiciones de estrés osmótico la expresión del gen es inducida (Figura 5.24.B, derecha), aunque al igual que en silicuas fue necesario utilizar una gran cantidad de RNA, hasta 20 µg de RNA total para poder detectar el RNA mensajero.

De este modo se confirmó la expresión del gen AAO3 tanto en el estadio de semilla como en hojas de roseta.

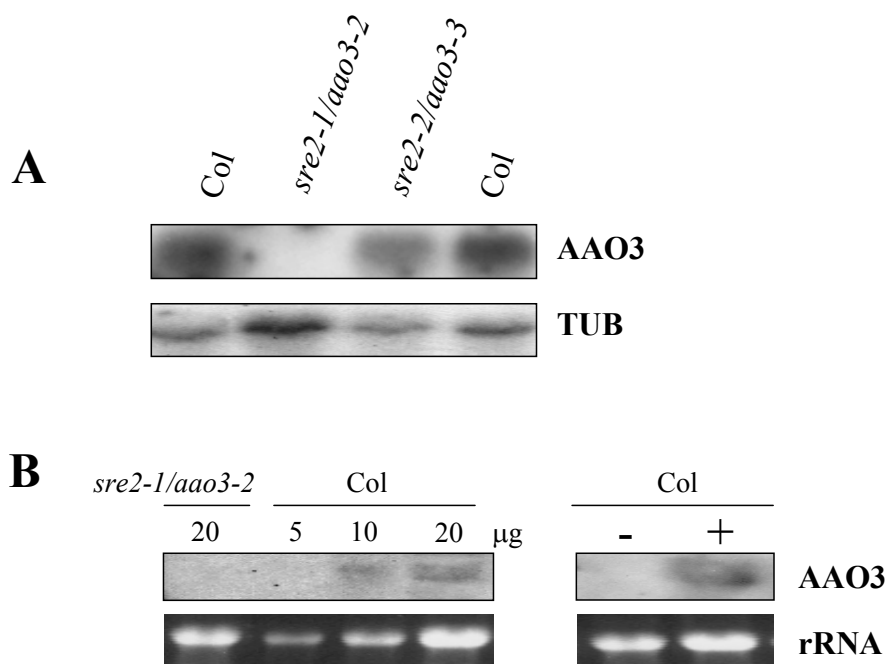


Figura 5.24. Análisis de la expresión del gen AAO3.

(A) Análisis de la expresión del gen AAO3 en el ecotipo silvestre Col y en los mutantes *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3*. Cada carrera contiene aproximadamente 10 µg de RNA total extraído de hojas de roseta. La carga del gel fue visualizada mediante hibridación con la sonda TUB.

(B) Análisis de la expresión del gen AAO3 en silicuas verdes (izquierda) y semillas (derecha). Para el análisis en silicuas se cargaron cantidades crecientes (5, 10 y 20 µg) de RNA total del ecotipo silvestre y 20 µg de RNA total del mutante *sre2-1/aao3-2*. El RNA total de semillas fue extraído de semillas embebidas en MS durante 60 horas (-) o en MS manitol 400 mM durante 24 horas (+). La carga del gel fue visualizada mediante la tinción con bromuro de etidio.

Análisis de la expresión de genes de biosíntesis de ABA.

Para determinar como afectaban las mutaciones *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3* a la expresión de otros genes de biosíntesis se realizó el análisis de la expresión los genes de biosíntesis ABA1, ABA2 y NCED3 en los mutantes empleando RNA total extraído de hojas de roseta de plantas mutantes. El análisis mostró que el nivel de expresión del gen ABA1 en los mutantes era mayor que en el ecotipo silvestre Col (Figura 5.25.). De forma opuesta, los niveles de expresión de los genes NCED3 y ABA2 resultaron ser menores en los mutantes que en el ecotipo silvestre Col. Así mismo, los datos indicaban que no habían diferencias notables de expresión entre los dos mutantes.

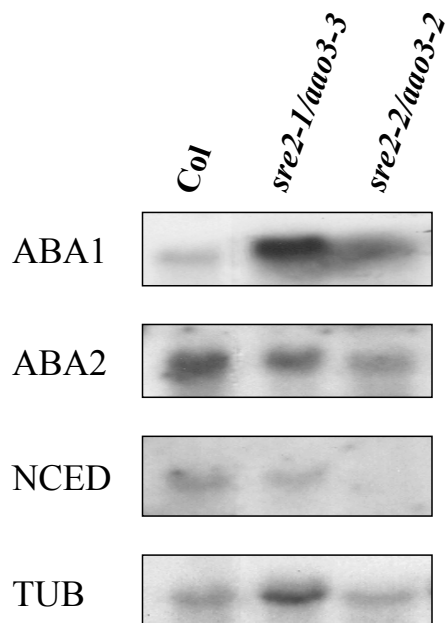


Figura 5.25. Análisis de expresión de los genes ABA1, ABA2 y NCED3 en los mutantes *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3*.

Se emplearon 10 μ g de RNA total extraído de hojas de roseta del ecotipo silvestre y de los mutantes. Como control de carga del gel se empleó la hibridación con la sonda tubulina.

Análisis de la expresión de genes inducibles por estrés.

La caracterización de los mutantes *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3* se completó analizando la expresión de algunos genes de respuesta a estrés. Se decidió analizar la expresión de genes de respuesta a estrés osmótico como DREB2A, P5CS1 y RD29A, un gen de respuesta a frío como KIN1 y un gen de respuesta a estrés oxidativo como GST6. Como resultado se obtuvo que los genes de respuesta a estrés osmótico y frío mostraban una menor expresión en el mutante y está era además más lenta en el tiempo. En cambio la expresión del gen GST6 resultó mayor en el mutante que en el ecotipo silvestre a tiempo 0 y la expresión se mantuvo más en el tiempo (Figura 5.26.).

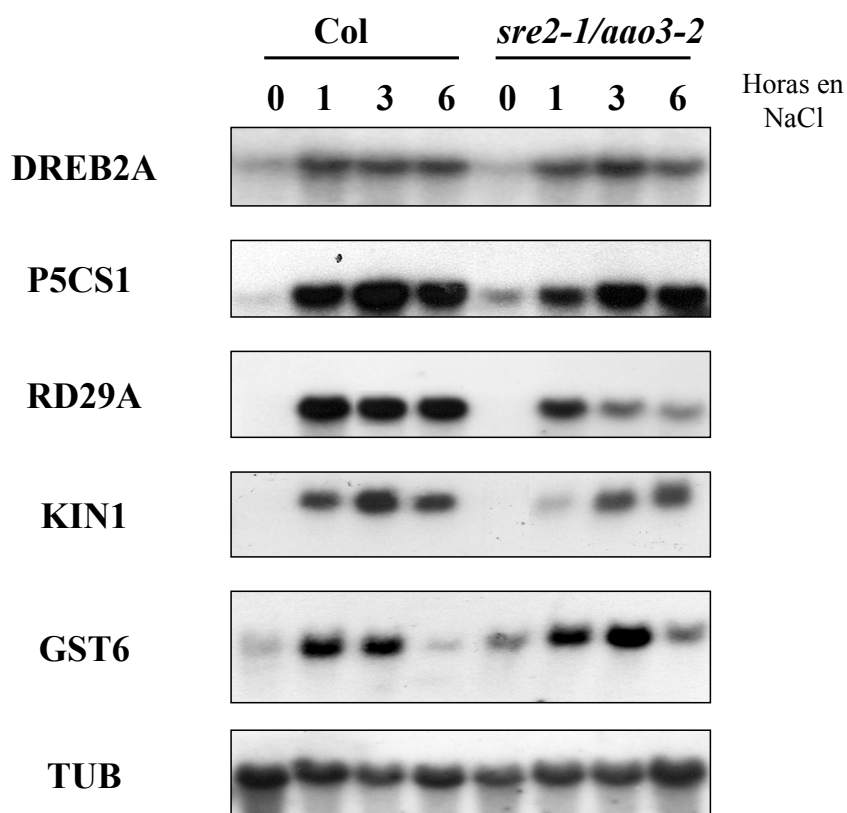


Figura 5.26. Expresión de algunos genes inducibles por estrés en el ecotipo silvestre y en el mutante *sre2-1/aao3-2*.

Se empleó RNA total de plantas del ecotipo silvestre y del mutante *sre2-1/aao3-2* tratadas con NaCl 200 mM durante 0, 1, 3 y 6 horas. Como control de carga se empleó la hibridación con la tubulina.

Complementación de los fenotipos mutantes.

La confirmación definitiva de que el fenotipo observado en los mutantes era debido a las mutaciones *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3* encontradas en el gen AAO3 requería la complementación de los fenotipos mutantes mediante la introducción del alelo silvestre del gen AAO3 en las plantas mutantes. Para la complementación se empleó la construcción pPZP211-AAO3 suministrada por el Dr. Mitsunori Seo (Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Metropolitana de Tokyo, Japón) en la cual el gen AAO3 se encuentra bajo el control de su propio promotor. Esta construcción contiene el inserto de 7,8 kb denominado ProAAO3-AAO3 que incluye la ORF y el promotor del gen AAO3 (Seo, M. et al., 2000b). El transgen fue introducido en los mutantes mediante transformación mediada por *Agrobacterium*

tumefasciens, seleccionándose posteriormente diferentes plantas T₁ resistentes al antibiótico kanamicina presente en el T-DNA. A continuación se seleccionaron distintas poblaciones T₂ con una segregación 3:1 (resistentes:sensibles) en medio MS con kanamicina y se obtuvo su correspondiente línea T₃ homocigota para el transgen AAO3. Las líneas T₂ y T₃ fueron analizadas en diferentes ensayos para determinar la existencia de complementación.

En primer lugar se determinó la latencia de las semillas y los porcentajes de germinación de las líneas T₃ homocigotas para el transgen en medios suplementados con NaCl 200 mM y manitol 400 mM (Figura 5.27.). Los resultados muestran claramente que todas las líneas transgénicas T₃ poseen una germinación en NaCl y manitol similares a la del ecotipo silvestre y totalmente diferente a la mostrada por los mutantes *sre2-1/ao3-2* y *sre2-2/ao3-3* (Figura 5.27.A y B). En cuanto a la latencia de las semillas, se obtuvo que las semillas T₃ homocigotas para el transgen mostraban unos porcentajes similares a los del ecotipo silvestre (Figura 5.27.B). Así se puede concluir que la introducción del transgen complementa los fenotipos mutantes de germinación en medios con NaCl y manitol así como que recupera la latencia de las semillas mutantes.

Además del análisis de los fenotipos de germinación y establecimiento de plántula, se analizó también las cinéticas de pérdida de agua de las líneas transgénicas T₂ heterocigotas (3:1). Tal como se observa en la Figura 5.27.C, ninguna de las líneas T₂ transformadas con el alelo silvestre del gen AAO3 posee una pérdida de peso fresco superior al 60 %, pérdida que es similar a la del ecotipo silvestre y claramente menor a la que manifiestan los mutantes. Así pues, la introducción del alelo silvestre del gen AAO3 también complementa el fenotipo de marchitamiento de las plantas mutantes.

Estos resultados confirman que al menos en el fondo genético Col, el gen AAO3 está implicado en la biosíntesis de ABA tanto en semillas como en hojas.

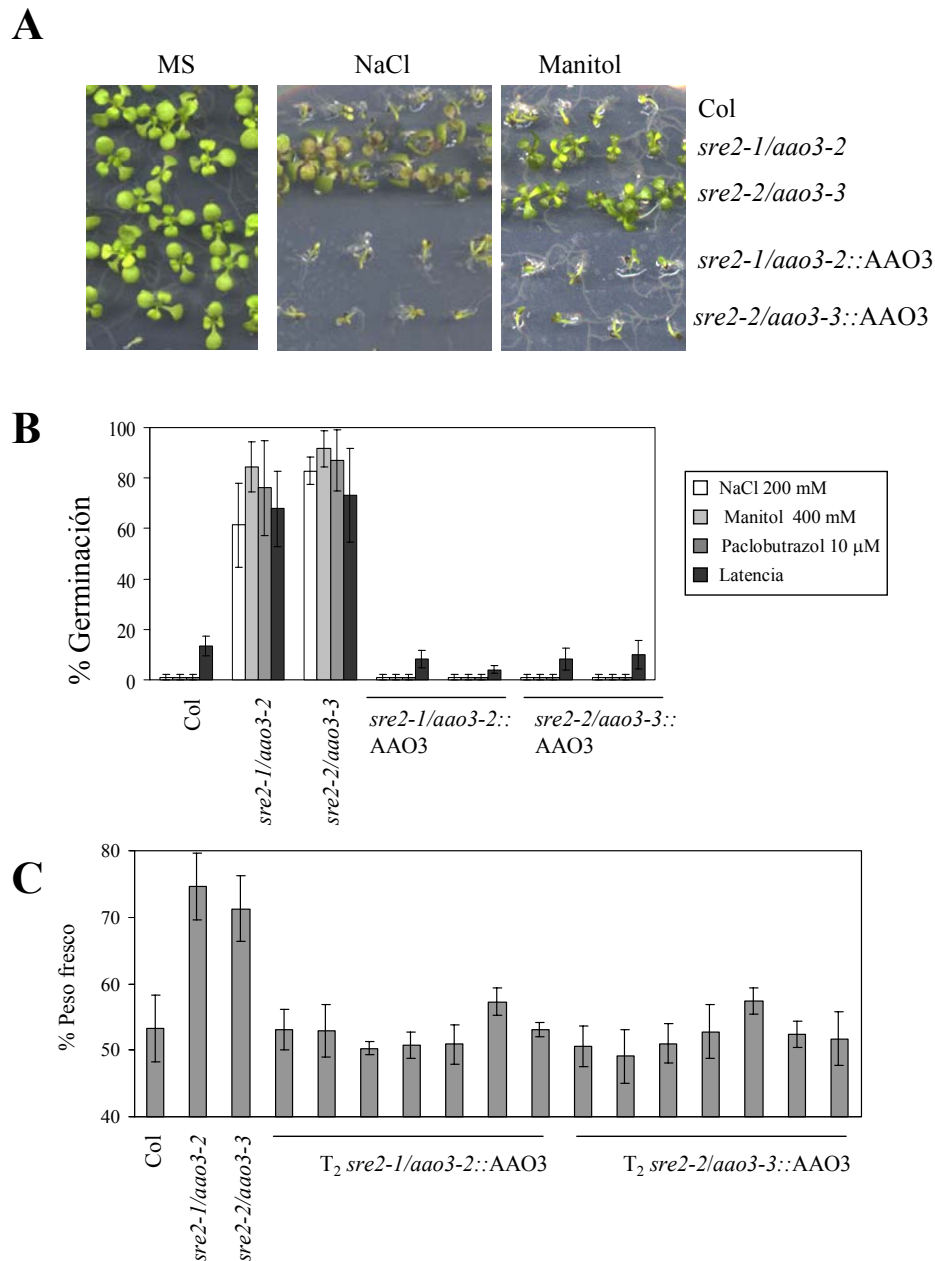


Figura 5.27. Complementación de los mutantes *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3* por el gen AAO3.

(A) Germinación y establecimiento de plántula del ecotipo silvestre Col, de los mutantes *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3* y de las líneas T₃ homocigotas transformadas con el vector binario pPZP211 conteniendo el inserto Pro_{AAO3}-AAO3. Las semillas fueron germinadas en medios MS y MS suplementados con NaCl 200 mM o con manitol 400 mM. La fotografía fue tomada a los 10 días.

(B) Porcentaje de germinación y establecimiento de plantula en condiciones de estrés salino y osmótico del ecotipo silvestre Col, mutantes *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3* y líneas T₃ homocigotas para el transgen. Las semillas germinaron en placas con medio MS suplementado con NaCl 200 mM o manitol 400 mM. El porcentaje de germinación se determinó a los 5 (NaCl) y 8 días (manitol). La desviación estándar fue calculada a partir de tres experimentos independientes con 200 semillas en cada uno de ellos

(C) La mayor pérdida de peso fresco de los mutantes *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3* fue complementada mediante la introducción del alelo silvestre del gen AAO3. El ensayo de transpiración se realizó con hojas de roseta del ecotipo silvestre, de los mutantes *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3* y de varias líneas T₂ transformadas. El ensayo se realizó con 4 hojas por individuo en condiciones de 25°C y 40% de humedad relativa.

5.4. Mutante *sre3/aba1-101*.

El aislamiento del mutante *aba2* de *Nicotiana plumbaginifolia* permitió la clonación del primer gen implicado en la biosíntesis del ABA. Este gen codifica la enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP), que cataliza la conversión de la zeaxantina a trans-violaxantina mediante dos pasos de epoxidación. También se identificó al gen responsable del fenotipo del mutante *aba1* de *Arabidopsis thaliana* como el gen ortólogo al gen *aba2* de *Nicotiana plumbaginifolia* (Marin, E. et al., 1996), aunque no se llegó a clonar.

Gracias al proyecto genoma de *A. thaliana* se identificó un gen con alta similitud al gen NpABA2 y cuyo número de entrada era At5g67030. Este gen posee un tamaño de 3346 nucleótidos, una estructura de 16 exones y 15 intrones (ver Figura 5.30.) y codifica una proteína de 667 aminoácidos que posee una señal de movimiento a cloroplasto en el extremo N-terminal y un dominio monooxigenasa. En los últimos años se han publicado varios artículos en los cuales se ha realizado la caracterización molecular de varios alelos del mutante *aba1* de *Arabidopsis thaliana* que permite identificar de manera inequívoca al gen At5g67030 como el gen que codifica la enzima ZEP en *A. thaliana* (Audran, C. et al., 2001; Xiong, L. et al., 2002a).

Debido a los fenotipos pleiotrópicos que manifiestan los mutantes *aba1* de *A. thaliana*, se han aislado alelos mutantes *aba1* en búsquedas de mutantes con germinación precoz, susceptibilidad al marchitamiento, capacidad para germinar y crecer en medios con alta concentración de sal o sacarosa y en susceptibilidad a un exceso de luz (revisado en Finkelstein, R. R. and Rock, C. D., 2002). En el presente trabajo se ha descrito el aislamiento de un mutante capaz de germinar y desarrollarse a plántula en un medio suplementado con NaCl denominado *sre3* que resultó ser alélico al mutante *aba1-5* (ver Tabla 5.5.). Debido a que existe actualmente una serie alélica no muy precisa que comprende aproximadamente 20 alelos de distinta procedencia, se decidió iniciar una nueva serie alélica para evitar confusiones con los alelos *aba1* previamente aislados, de los cuales hay al menos dos series alélicas (Koorneef, M. et al., 1982; Comunicación personal de A. Marion-Poll a P.L. Rodríguez).

El punto 5.1 de la tesis doctoral se describe el aislamiento y caracterización fenotípica del mutante *sre3/aba1-101*. En presente punto de esta tesis doctoral se

incluye un resumen de la caracterización fenotípica y una detallada caracterización molecular del mutante.

Caracterización fenotípica.

Aparte de los fenotipos observados que son comunes con el resto de mutantes deficientes en ABA, se observó en las plantas mutantes *sre3/aba1-101* una dramática reducción del crecimiento en el invernadero, mostrando una considerable reducción en su tamaño de roseta (Figura 5.32.) y el número de semillas, obteniendo solo 100-200 semillas/planta. Debido a esto, las plantas mutantes *sre3/aba1-101* tuvieron que ser suplementadas en las primeras fases del crecimiento con ABA exógeno.

Ensayos de germinación y establecimiento de plántula.

Los ensayos de germinación realizados con los mutantes *aba1-5* y *sre3/aba1-101* mostraron que ambos poseían unos porcentajes de germinación muy parecidos, prácticamente del 80%. Este porcentaje de germinación resultó ser similar en los diferentes ensayos (estrés salino, estrés osmótico o paclobutrazol), germinando las semillas mutantes a los 5 días de haber sido puestas a germinar mientras que las semillas control apenas desarrollaron la radícula a los 7 días (ver Figura 5.4.).

El ensayo de la latencia de las semillas de ambos mutantes *aba1* determinó que eran capaces de germinar inmediatamente después de ser recogidas, con unos porcentajes de germinación cercanos al 75%.

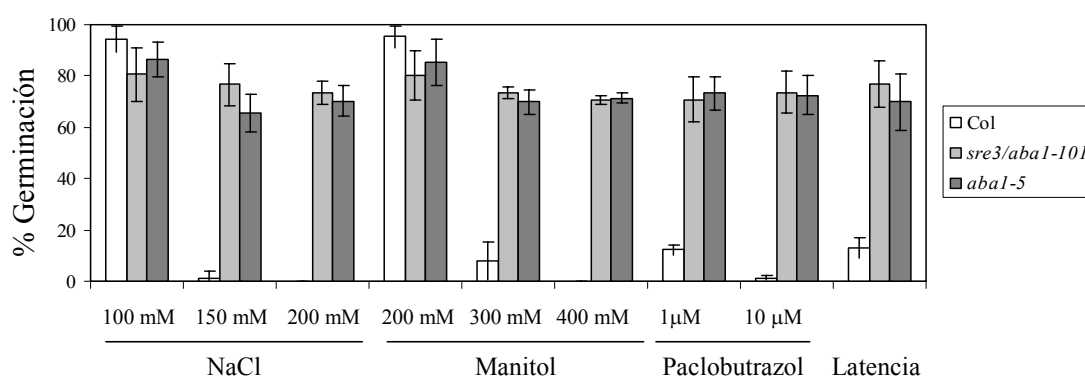


Figura 5.28. Porcentaje de germinación de los alelos mutantes *aba1*.

Semillas del ecotipo silvestre y de los mutantes *aba1-5* y *sre3/aba1-101* fueron sembradas en medios suplementados con NaCl, manitol y paclobutrazol. Los porcentajes de germinación se determinaron a los 5 (NaCl) y 8 días (manitol y paclobutrazol). En el ensayo de latencia se emplearon semillas recién recogidas. Estas semillas fueron sembradas en medio MS y los porcentajes de germinación se determinaron a los 5 días. La desviación estándar fue calculada a partir de tres experimentos independientes con 200 semillas en cada uno de ellos.

Ensayo de transpiración.

Se determinaron las cinéticas de pérdida de peso fresco para ambos alelos *aba1*, obteniendo que la pérdida de peso fresco en ambos alelos resultaba ser de hasta el 60%, mientras que la del ecotipo Col estaba alrededor del 20%.

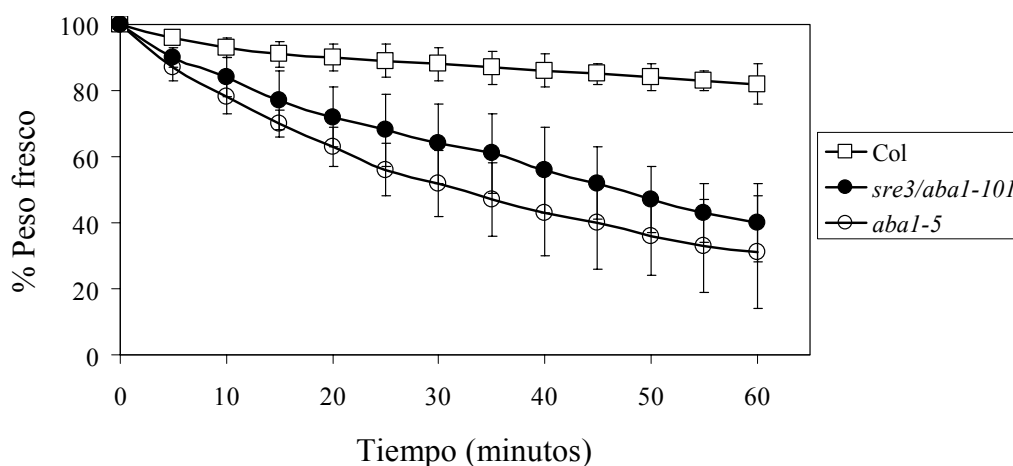


Figura 5.29. Ensayo de transpiración de los alelos mutantes *aba1*.

Se representa el porcentaje de peso fresco respecto del inicial frente al tiempo para el ecotipo silvestre Col y los mutantes *aba1-5* y *sre3/aba1-101*.

Caracterización molecular.

El mutante *sre3/aba1-101* no poseía ninguna inserción de T-DNA en su genoma que cosegregase con el fenotipo mutante (Figura 5.3.), de modo que el gen responsable del fenotipo fue identificado mediante el análisis de complementación con mutantes deficientes en ABA, donde se determinó que el mutante *sre3* era alélico al mutante *aba1-5* (Tabla 5.5.). Así, la caracterización molecular de la mutación *sre3/aba1-101* se realizó mediante la secuenciación del gen ABA1. Para ello, DNA genómico del mutante fue amplificado empleando las parejas de cebadores (5'ABA1, 3'ABA1-1700) y (5'ABA1-1710, 3'ABA1). Los fragmentos amplificados fueron clonados y varios clones independientes de cada pareja de cebadores fueron enviados a secuenciar por ambos extremos. El análisis de las secuencias reveló la delección de la timina en posición 396, respecto del ATG (Figura 5.30.). Esta delección fue confirmada secuenciando varios clones obtenidos de una nueva amplificación del DNA genómico del mutante con los cebadores 5'ABA1-300 y 3'ABA1-1700. La delección de la timina en posición 396 produce un cambio en la

pauta de lectura del gen desde ese punto, que provoca la aparición de un codón de finalización prematuro en posición 133 en lugar de una leucina. De este modo se predice una proteína ABA1 truncada de solo 132 aminoácidos.

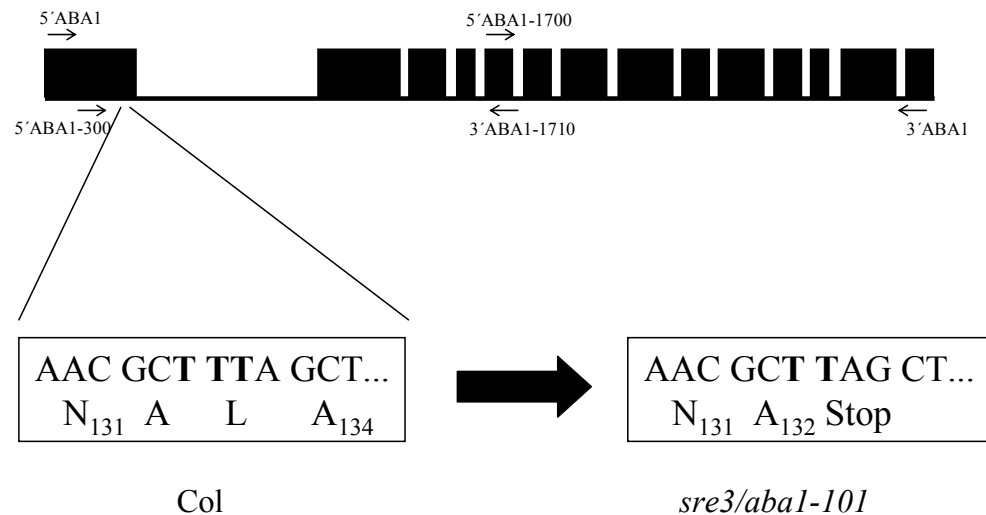


Figura 5.30. Estructura del gen ABA1 y caracterización molecular del mutante *sre3/aba1-101*.

Se indican los cebadores empleados para la secuenciación del gen, así como la delección de un nucleótido encontrada en el mutante *sre3/aba1-101* y el cambio que provoca en la pauta de lectura del gen. La numeración de aminoácidos esta referida a la Met inicial.

Análisis de la expresión de genes de biosíntesis de ABA.

En primer lugar se realizó el análisis de la expresión del gen ABA1 tanto en el ecotipo Col como en los alelos *sre3/aba1-101* y *aba1-5* empleando RNA total de hojas de roseta. Este análisis mostró la ausencia de RNA mensajero en el mutante *aba1-5*, lo cual concuerda con los datos descritos para el alelo mutante (Audran, C. et al., 2001), mientras que en el mutante *aba1-101* se observó una menor cantidad de RNA mensajero que en el ecotipo silvestre (Figura 5.31.A.).

Posteriormente se analizó la posible inducción de la expresión del gen ABA1 tanto en condiciones de estrés salino como en condiciones de aplicación exógena de la hormona ABA (Figura 5.31.B.). Como resultado se obtuvo que en ambas condiciones (NaCl y ABA) se produce una inducción similar de la expresión del gen ABA1 y en ambos tratamientos el máximo de la expresión del gen se produce a la hora de iniciar el tratamiento.

Por último se realizó el análisis de varios genes de la biosíntesis de ABA. Este análisis determinó que ambos mutantes *aba1* poseían una reducción de los niveles de

expresión de los genes de biosíntesis AAO3 y NCED3, mientras que no se observaba una diferencia significativa en la expresión del gen ABA2 (Figura 5.31.C).

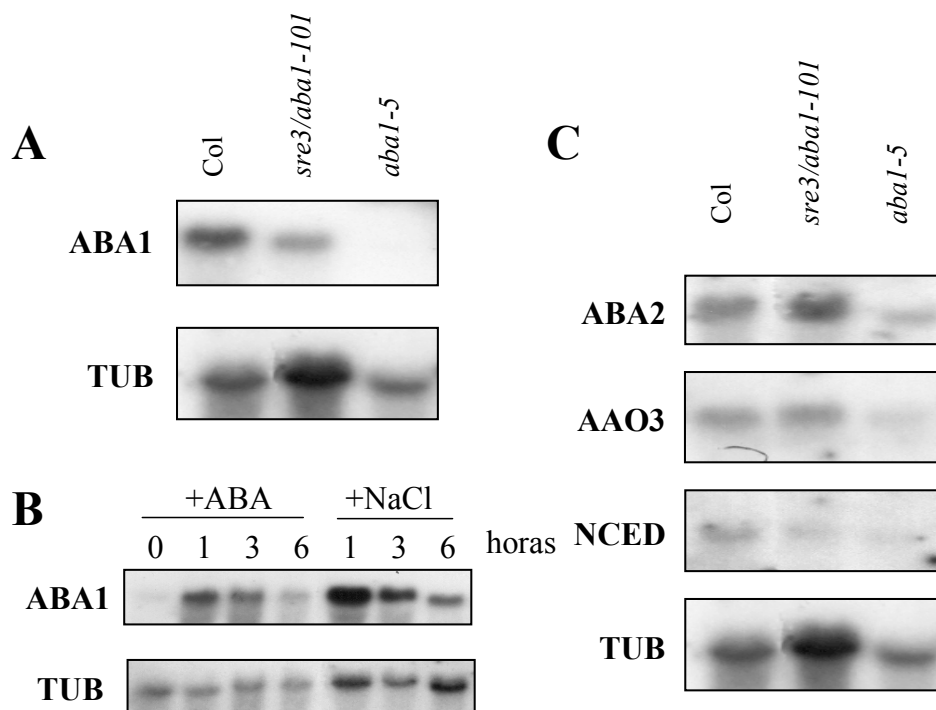


Figura 5.31. Análisis de la expresión del gen ABA1 y otros genes de biosíntesis de ABA.

(A) Expresión del gen ABA1 en el ecotipo silvestre y los mutantes *aba1-5* y *sre3/aba1-101*.

(B) Expresión del gen ABA1 en plantas del ecotipo silvestre tratadas con estrés salino y ABA. Como control de carga se emplea la hibridación con TUB

(C) Análisis de expresión de genes de biosíntesis de ABA en el ecotipo silvestre, y en los mutantes *sre3/aba1-101* y *aba1-5*.

Complementación del fenotipo mutante.

Para confirmar que el fenotipo observado en el mutante *sre3/aba1-101* era debido a la mutación identificada en el gen ABA1 se realizó el ensayo de complementación del mutante introduciendo el alelo silvestre del gen ABA1 en el mutante *sre3/aba1-101*.

Para ello se digirió el TAC K8A10 que contenía el gen ABA1 con la enzima de restricción *Bam*HI. De los fragmentos se identificó uno de 8,5 kb que contenía la secuencia genómica completa del gen ABA1 y 710 nucleótidos del promotor. Este fragmento se clonó, secuenció y finalmente se introdujo en el vector de transformación PBIN19, obteniendo la construcción PBIN19-ABA1. Esta

construcción se introdujo por electroporación en *Agrobacterium tumefaciens* y se transformaron con ella varias macetas del mutante *sre3/aba1-101*. Las plantas transgénicas T₁ fueron seleccionadas mediante el antibiótico de selección kanamicina. La complementación del fenotipo mutante fue analizada mediante la determinación del porcentaje de germinación y establecimiento de plántula en medios suplementados con NaCl y paclobutrazol, analizándose diferentes líneas transgénicas T₂ con diferente número de inserciones de T-DNA (Figura 5.32.A).

Los ensayos de germinación de la progenie de 8 líneas T₂ *sre3/aba1-101::ABA1* confirmaron la complementación del fenotipo en las plantas mutantes, obteniendo unos porcentajes inferiores al 30%, mientras que el mutante *sre3/aba1-101* mostraba unos porcentajes superiores al 80%. Las líneas T₂ con más de una inserción del transgen mostraron unos porcentajes de germinación prácticamente nulos, mientras que aquellas líneas con una segregación 3:1 (resistentes:sensibles) de resistencia a kanamicina, por tanto con una inserción del transgen, mostraban una germinación cercana al 25% (Figura 5.32.A.). Algunas plántulas T₃ homocigotas para el transgen fueron crecidas en maceta, donde mostraban un desarrollo de roseta que era comparable al del ecotipo silvestre (Figura 5.32.B).

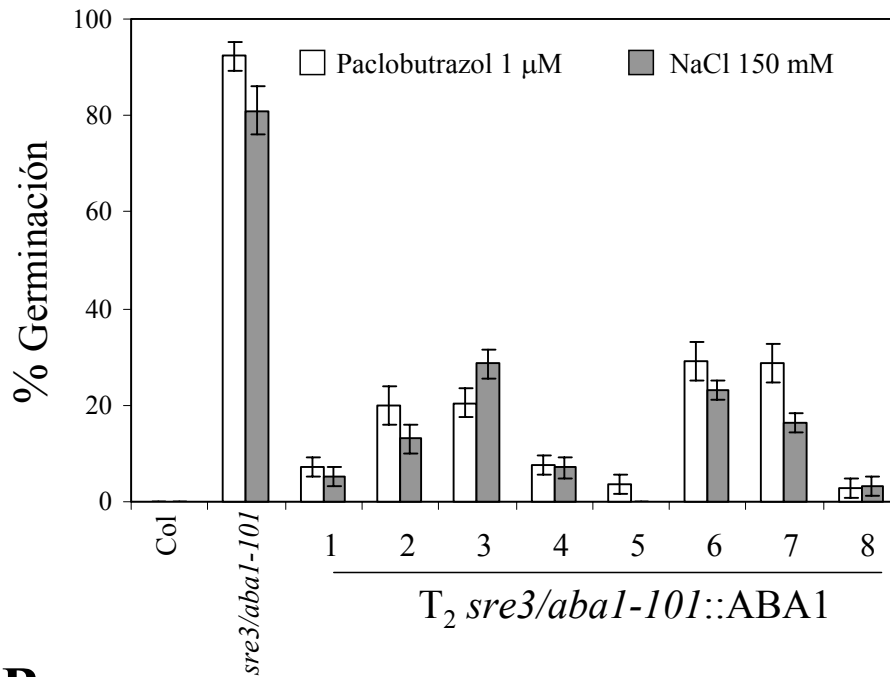
A**B**

Figura 5.32. Complementación del mutante *sre3/aba1-101*.

(A) Germinación y establecimiento de plántula en medios con NaCl o paclobutrazol. Aproximadamente 200 semillas del ecotipo silvestre, del mutante *sre3/aba1-101* y la progenie T₂ de 8 líneas transgénicas *sre3/aba1-101* transformadas con la construcción pBIN19-ABA1 se sembraron en medio MS suplementado con NaCl 150 mM o paclobutrazol 1 µM. Los porcentajes de germinación se determinaron a los 5 días (NaCl) y 7 días (paclobutrazol).

(B) Desarrollo de roseta del ecotipo silvestre, del mutante *sre3/aba1-101* y de una línea T₃ *sre3/aba1-101::ABA1* homocigota. La fotografía esta tomada 21 días después de sembrarlas en tierra.

6. Discusión.

6.1. Búsqueda y aislamiento de los mutantes *sre*.

La hormona ABA controla el desarrollo y crecimiento del embrión, así como el desarrollo de la semilla y algunos procesos que en ella se desarrollan como el acumulo de sustancias de reservas y la latencia (Finkelstein, R. R. and Rock, C. D., 2002). Una vez acabado el desarrollo de la semilla, el ABA se encarga de mantener la latencia de las semillas tanto en condiciones favorables como desfavorables, impidiendo de este modo la germinación. Incluso una vez germinada la semilla, el ABA permite la detención del crecimiento de la plántula en condiciones adversas (Lopez-Molina, L. et al., 2001). Durante el desarrollo vegetativo, el ABA posee un papel crucial en la respuesta de la planta frente a diversos estreses ambientales, como el estrés hídrico generado por frío, sequía y salinidad, induciendo la síntesis de diferentes grupos de genes de respuesta a estrés y el cierre de los estomas. Actualmente las condiciones de estrés ambiental abiótico, y especialmente la sequía y la salinidad, son los principales factores que en la actualidad reducen las cosechas de cultivos en todo el mundo (Boyer, J. S., 1982). De este modo, el conocimiento de la ruta de biosíntesis, del circuito regulador de la expresión génica de los enzimas biosintéticos y los mecanismos implicados en la señalización por ABA constituyen una herramienta potencial muy importante para generar variedades transgénicas vegetales con mayor tolerancia a la sequía y salinidad.

Dadas las diferentes respuestas fisiológicas reguladas por el ABA durante el ciclo vital de una planta se han aislado multitud de mutantes de biosíntesis y de señalización de ABA en una gran variedad de análisis genéticos. Estos análisis genéticos han sido realizados en diferentes estadios de las plantas tanto en *Arabidopsis* como en otras especies como maíz y tabaco (revisado en Finkelstein, R. R. and Rock, C. D., 2002; Cheng, W. H. et al., 2002; Schwartz, S. H. et al., 2003a). Específicamente en el estadio de semillas, se han realizado análisis genéticos basados en la alteración del desarrollo embrionario (Meinke, D. W. et al., 1994), en la germinación precoz o producción de semillas sin latencia (Koornneef, M. et al., 1982; Tan, B. C. et al., 1997), en la capacidad para germinar y crecer en medios con alta concentración de sal o sacarosa (Laby, R. J. et al., 2000; Quesada, V. et al., 2000; Rook, F. et al., 2001) o en medios con placlobutrazol (Leon-Kloosterziel, K. M. et al., 1996) y en la pérdida o ganancia de sensibilidad al ABA en germinación

(Koornneef, M. et al., 1984; Finkelstein, R. R., 1994; Cutler, S. et al., 1996). Además se han aislado mutantes con defectos en la respuesta a múltiples señales en análisis genéticos basados en la germinación con alto azúcar (Arenas-Huertero, F. et al., 2000), o resistencia a otras fitohormonas como auxinas, brasinoesteroides o etileno (Wilson, A. K. et al., 1990; Alonso, J. M. et al., 1999; Li, J. et al., 2001). Esta gran variedad de ensayos genéticos realizados ha puesto de manifiesto los fenotipos pleiotrópicos mostrados por los mutantes, permitiendo aislar diferentes series alélicas de los genes implicados en la biosíntesis y señalización de ABA (Rock, C. D., 2000; Finkelstein, R. R. and Rock, C. D., 2002).

El presente trabajo de tesis doctoral se inicio con el objetivo de analizar y buscar determinantes genéticos de la tolerancia a sal en la planta *Arabidopsis thaliana*. Para ello se realizó el análisis genético de la germinación de una población de semillas de *Arabidopsis* mutagenizadas con T-DNA en medio MS suplementado con sal (NaCl 200 mM) (ver Figura 5.1.), obteniendo como resultado el aislamiento de una serie de mutantes denominados *sre* (“salt resistant”). Estos mutantes eran capaces de germinar y desarrollarse a plántula en medios suplementados con varias concentraciones de NaCl, manitol y paclobutrazol (Figura 5.2., Tabla 5.2.), apenas poseían latencia en sus semillas (Figura 5.5.) y mostraban una pérdida de agua mayor que el ecotipo silvestre en los ensayos de transpiración (Figura 5.6.). Además, los mutantes *sre* poseían unos niveles de ABA en hojas de roseta menores que el ecotipo silvestre y estos niveles no aumentaban en plantas en condiciones de estrés salino o sequía (Tabla 5.3.). El análisis de algunos genes de respuesta a estrés dependientes de ABA mostró que estos no eran inducidos de la misma forma que en el ecotipo silvestre (Figuras 5.17.; 5.26. y 5.31.). Todos estos datos indicaban que los mutantes *sre* podían ser mutantes afectados en la biosíntesis de ABA. Así, se realizó el análisis genético entre los mutantes *sre* y mutantes de biosíntesis de ABA, determinándose que los mutantes *sre* eran alélicos a los mutantes de biosíntesis de ABA *aba2-1*, *aa03-1* y *aba1-5*. De esta forma quedó establecido que los mutantes *sre1*, *sre2* y *sre3* eran nuevos alelos mutantes de los *loci* de biosíntesis de ácido abscísico ABA2, AAO3 y ABA1 respectivamente (Tabla 5.5.).

El papel del ABA en la iniciación y mantenimiento de la latencia de la semilla esta bien documentado (Koornneef, M. et al., 1984, Bentsink, L. and Koornneef, M., 2003). El ABA además permite la detención del crecimiento de la semilla en condiciones adversas una vez ha germinado (Lopez-Molina, L. et al., 2001). La

germinación comienza con la imbibición de la semilla seca, y finaliza cuando la radícula se extiende para penetrar en el medio circundante (Bewley, J. D., 1997; Koornneef, M. et al., 1982). A primera vista, los mutantes obtenidos en el presente análisis genético eran mutantes “resistentes” al estrés salino. Sin embargo, el estudio en posteriores estadios de desarrollo confirmó que estos mutantes eran más sensibles al estrés salino (Figura 5.8.). La identificación de los *loci* SRE como *loci* de biosíntesis de ABA indicaba que el análisis genético llevado a cabo en el presente trabajo resultó ser un análisis de “insensibilidad” en lugar de resistencia a estrés. Así los mutantes *sre* eran incapaces de percibir el estrés y por tanto no bloqueaban su capacidad para germinar. Se ha estudiado mucho sobre la señalización de estrés y todos los estudios indican que la percepción de la señal de estrés hídrico tiene como elemento principal al ABA (revisado en Xiong, Liming and Zhu, Jian Kang, 2002). De este modo los mutantes de biosíntesis o de señalización de ABA son los mejores candidatos para ser identificados en los análisis genéticos de germinación realizados en medios con alta sal o azúcares (estrés hídrico) (Laby, R. J. et al., 2000; Quesada, V. et al., 2000; Rook, F. et al., 2001; Ruggiero, B. et al., 2004; presente trabajo). Estos resultados muestran el papel crucial desempeñado por el ABA en la inhibición de la germinación y el desarrollo temprano de la semilla en condiciones desfavorables, por ejemplo en condiciones de estrés hídrico o salino, confirmado por el aumento de los niveles de ABA en semillas tratadas con NaCl 200mM (Figura 5.22.).

En cambio, el análisis de hipersensibilidad al estrés salino ha permitido aislar los mutantes *sos* (*s*alt *o*verly *s*ensitive) que no son mutantes de biosíntesis o señalización de ABA (Xiong, Liming and Zhu, Jian Kang, 2002). No obstante, el haber obtenido solamente éxitos parciales en la tolerancia a la salinidad cuando se sobreexpresaba un gen en concreto ha hecho que se inicien una serie de estudios para analizar la variabilidad natural tanto en una especie glicófita como *Arabidopsis* como en otras halófitas con el objetivo de identificar una serie de *loci* que contribuirían conjuntamente a la tolerancia al estrés hídrico (Quesada, V. et al., 2002; Xiong, Liming and Zhu, Jian Kang, 2002).

Las líneas transgénicas empleadas en el análisis genético corresponden a dos lotes de líneas transgénicas de *A.thaliana* mutagenizadas con un T-DNA que posee 4 secuencias intensificadoras de la transcripción 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Figura 3.1.). Esta colección de líneas transgénicas ha sido ya

empleada para el aislamiento de mutantes dominantes producidos por la sobreexpresión génica inducida por las secuencias 35S (Weigel, D. et al., 2000). Sin embargo ninguno de los mutantes aislados en el presente trabajo poseen fenotipos dominantes (Tabla 5.1.), lo que sugiere la posibilidad que estas líneas transgénicas no permitan aislar mutantes con fenotipos dominantes en medios suplementados con NaCl. Esto podría ser debido a que las líneas transgénicas suministradas correspondan a la generación T₄. Esto habría permitido a la planta silenciar o disminuir la expresión de los genes sobreexpresados tal como ocurre cuando se realiza la sobreexpresión constitutiva del factor de transcripción DREB2A. Este factor fue sobreexpresado en una serie de líneas transgénicas que eran capaces de sobrevivir en condiciones de estrés hídrico. Sin embargo, en condiciones normales las plantas transgénicas mostraban menor porte y una menor viabilidad, tendiendo a silenciar la expresión del transgen. Sin embargo cuando el factor DREB2A se ponía bajo el control del promotor del gen RDD29A inducible por estrés, las plantas eran similares al ecotipo silvestre en condiciones normales pero mostraban una mayor tolerancia en condiciones de estrés (Kasuga, M. et al., 1999). Del mismo modo, las líneas transgénicas con mejor tolerancia al estrés hídrico por sobreexpresión se habrían perdido o bien la sobreexpresión habría sido atenuada o silenciada a favor de una mayor viabilidad.

El análisis genético en los distintos mutantes *sre* concluyó que para todos, excepto para el mutante *sre2-1*, los datos se ajustaban de forma significativa ($p > 0,5$) a una segregación monogénica recesiva del carácter (Tabla 5.1.). La posterior identificación de la mutación en el *loci* SRE2/AAO3 y la posterior complementación del fenotipo mutante concluyeron sin ninguna duda que la mutación *sre2-1* se trataba de una mutación monogénica recesiva. El análisis de cosegregación realizado entre el T-DNA y el fenotipo en los mutantes *sre* mostró que el mutante *sre2-1* era el único mutante con una integración de T-DNA que cosegregaba con el fenotipo mutante (Figura 5.3.). Así una posible explicación a la anomalía del análisis genético en el mutante *sre2-1* sería que la inserción compleja de T-DNA este afectando a la segregación del carácter en la población F₂. Apoyaría esta afirmación que la segregación del otro alelo *sre2* si se ajusta a la segregación esperada para un carácter monogénico recesivo y que los porcentajes de germinación son similares cuando se realizan los cruces entre los mutante *sre2-1*, *sre2-2* y *aao3-1* (Tablas 5.1 y 5.5.).

6.2. El gen SRE1/ABA2 codifica una alcohol deshidrogenasa de cadena corta.

La caracterización bioquímica de los mutantes deficientes en ABA ha revelado la mayor parte de los defectos biosintéticos en muchos de los *loci* deficientes conocidos (revisado en Cheng, W. H. et al., 2002). Concretamente, el trabajo realizado por Schwartz, S. H. et al., 1997a) con extractos libres de células reveló que el mutante *aba2-1* mostraba una sustancial reducción en la capacidad de convertir xantoxina en ABA, pero en cambio mostraban inalterada su capacidad para transformar el aldehído abscísico en ABA, indicando que el mutante *aba2-1* estaba bloqueado en el paso de conversión de xantoxina a aldehído abscísico. La conversión de la xantoxina en ABA implica tanto modificaciones en el anillo (la desaturación del enlace 2'3' y la apertura del anillo epóxido) como las oxidaciones del grupo hidroxilo en el carbono C4' a grupo cetona y del aldehído en posición C1 a ácido carboxílico (Figura 1.4). De hecho, dado que se requieren tres reacciones químicas para convertir xantoxina en aldehído abscísico, la oxidación del grupo hidroxilo en el carbono C4', la apertura del anillo epóxido y la desaturación del enlace 2'3' (Figura 5.13.), no estaba claro si era necesaria la actuación de otros enzimas además de ABA2 para llevar a cabo la reacción de conversión.

En el presente trabajo se presenta el aislamiento y caracterización de dos nuevos alelos mutantes del *loci* ABA2, denominados *sre1-1/aba2-11* y *sre1-2/aba2-12*. La identificación del *locus* SRE1/ABA2 se realizó combinando las aproximaciones de mapeo posicional y gen candidato. En un primer momento mediante la técnica de mapeo posicional se identificó un “contig” de BACs en el que se incluiría el *locus* SRE1/ABA2, siguiendo a continuación la hipótesis del gen candidato para identificar el *locus* ABA2 (ver resultados 5.2.). La confirmación definitiva de la identidad del *locus* ABA2 se obtuvo mediante la identificación de las mutaciones presentes en una nueva serie alélica (Tabla 5.8.). Así mismo, los análisis realizados de la reacción catalizada por la enzima ABA2 en el presente trabajo establecen inequívocamente que la enzima ABA2 es por sí misma capaz de convertir eficientemente xantoxina en aldehído abscísico (Figuras 5.13. y 5.14.). Muchos ejemplos de péptidos con varias actividades enzimáticas son conocidos, como por ejemplo la actividad ent-kaureno oxidasa que es capaz de catalizar tres pasos en la biosíntesis de GAs (Helliwell, C. A. et al., 1999). Así, la futura determinación de la

estructura cristalina de ABA2 ayudará a resolver el mecanismo de reacción de la conversión de xantoxina en aldehído abscísico.

Paralelamente al presente trabajo de tesis doctoral, el grupo de la Dra. Jen Sheen realizó un trabajo similar. Ellos realizaron también la identificación y caracterización de varios nuevos alelos *aba2*, dándose la circunstancia que su mutante *gin1-1* es el mutante *srel-1*, y además llevaron a cabo la caracterización bioquímica, localización celular y subcelular de la proteína ABA2 (Cheng, W. H. et al., 2002). Los datos obtenidos de este trabajo coinciden con los datos obtenidos en la presente tesis doctoral.

El análisis bioquímico de la actividad alcohol deshidrogenasa de la proteína ABA2 muestra que la enzima es capaz de convertir la xantoxina en aldehído abscísico (Figura 5.13.), pero no puede catalizar la conversión del ácido xantóxico en ABA (Cheng, W. H. et al., 2002). Estos datos junto con el análisis bioquímico realizado con la enzima codificada por el gen AAO3 (Seo, M. et al., 2000a; Seo, M. et al., 2000b), la caracterización genética y bioquímica del mutante *aba2-1* de *A.thaliana* (Schwartz, S. H. et al., 1997a) y el aislamiento de los mutantes afectados en la oxidación del aldehído abscísico a ABA (*aba3* y *ao3* de *A.thaliana*, *aba1* de tabaco y los mutantes *flc* y *sit* de tomate; revisados en (Cutler, A. J. and Krochko, J. E., 1999; Finkelstein, R. R. and Rock, C. D., 2002) apoyan inequívocamente la ruta xantoxina → aldehído abscísico → ABA como los pasos finales de la ruta predominante de biosíntesis de ABA (Sindhu, R. K. and Walton, D. C., 1987; Sindhu, R. K. and Walton, D. C., 1988; Rock, C. D. and Zeevaart, J. A., 1990; Sindhu, R. K. et al., 1990) en contra de la opinión de algunos autores que consideran que la conversión de xantoxina a ABA tendría lugar vía el ácido xantóxico (Milborrow, B. V., 2001). En un primer momento se indicó que la conversión de xantoxina a ABA por extractos libres de células de hojas de guisantes se localizaba en el citosol (Sindhu, R. K. and Walton, D. C., 1987), aunque posteriores experimentos con cloroplastos intactos de hojas de espinacas indicaban que la ruta completa de biosíntesis de ABA ocurría en los cloroplastos (Milborrow, B. V. and Lee, S. H., 1998). Sin embargo la realización de varios experimentos de localización subcelular de la proteína recombinante ABA2-GFP han permitido clarificar esta cuestión, mostrando que la proteína ABA2 se localizaría en el citosol de la célula (Cheng, W. H. et al., 2002).

Varios trabajos previos con extractos libres de células indicaban que el gen ABA2 debía expresarse constitutivamente y además mostraron que la conversión de xantoxina a ABA no aumentaba significativamente bajo condiciones de estrés osmótico (Sindhu, R. K. and Walton, D. C., 1987; Schwartz, S. H. et al., 1997a). El análisis de expresión realizado del gen ABA2 en el presente trabajo con y sin tratamiento de estrés osmótico, confirman a nivel de RNA mensajero los datos previos obtenidos nivel de proteínas (Figura 5.15.). Otros genes implicados en la ruta de biosíntesis de ABA, como ABA1, NCED, ABA3 y AAO3, son inducidos por estrés hídrico (Tan, B. C. et al., 1997; Audran, C. et al., 1998; Seo, M. et al., 2000b; Xiong, L. et al., 2001b), no obstante solo en el caso de NCED se ha confirmado la inducción a nivel de proteína (Qin, X. and Zeevaart, J. A., 1999), mientras que para el gen AAO3 el cambio en la expresión del gen inducido por estrés no produce un cambio significativo en la cantidad de proteína (Seo, M. et al., 2000a). El tratamiento con ABA no produjo la inducción de la expresión del RNA mensajero del gen ABA2 (Figura 5.15.), aunque sí está descrito que se produce inducción de la expresión del gen cuando las plantas se tratan con glucosa (Cheng, W. H. et al., 2002). Estos datos diferencian claramente la regulación de la expresión del gen ABA2 del resto de genes de biosíntesis, los cuales si son regulados por estrés y ABA (revisado en Xiong, L. and Zhu, J. K., 2003). Estos datos conectan la biosíntesis de ABA y los cambios en los niveles de glucosa en las células, papel que puede resultar muy importante en la correcta formación y desarrollo de las semilla (Cheng, W. H. et al., 2002).

Si bien parece que la enzima ABA2 no cataliza un paso limitante en la biosíntesis de ABA, si es claro que resulta crucial para mantener el nivel basal de ABA considerando tanto la severa reducción en los niveles de ABA medidos para los mutantes *aba2-1* y *srel-1/aba2-11* (Tabla 5.6.) como la reducida actividad de las proteínas recombinantes (Figura 5.13.). No obstante, el hecho de poder medir en ambos mutantes unos niveles residuales de ABA sugiere que alguna otra vía de biosíntesis de ABA debe existir (Cheng, W. H. et al., 2002), o bien que otras proteínas codificadas por genes de la familia SDR son capaces de catalizar inespecíficamente la reacción en ausencia de ABA2. El gen que codifica la proteína ABA2 es único en el genoma y pertenece a la familia génica SDR (Figura 5.18.; Cheng, W. H. et al., 2002). El estudio de la familia de genes SDR han permitido identificar a los genes At3g29250 y At2g47130 como aquellos genes que codifican

productos génicos con mayor similitud con la proteína ABA2 (62 y 60 % de similitud respectivamente) (Figura 5.18.). El análisis de las secuencias de los productos génicos mostró la conservación existente en los residuos que forman los dominios de unión al coenzima NAD⁺ así como en el hipotético sitio catalítico (Figura 5.19.). El ensayo de actividad alcohol deshidrogenasa determinó que únicamente la proteína codificada por el gen At2g47130 era capaz de catalizar la conversión de xantoxina a aldehído abscísico *in vitro* con una K_m 10 veces superior que la de la proteína ABA2. Estos datos apoyan la hipótesis de la existencia de una actividad enzimática, seguramente no específica, diferente de ABA2 capaz de convertir xantoxina en aldehído abscísico en ausencia de ABA2 (Figura 5.20.).

6.3. Nuevos alelos mutantes *sre2/aao3* implican al gen AAO3 en la biosíntesis de ABA en semilla.

El último paso de la ruta de biosíntesis de ABA consiste en la oxidación del aldehído abscísico a ABA, el cual requiere la actividad de los enzimas codificados por los genes AAO3 y ABA3. El gen ABA3 ha sido recientemente clonado y codifica para la actividad sulfurasa del cofactor MoCo (MCSU) (Bittner, F. et al., 2001; Xiong, L. et al., 2001b). La forma sulfurada del cofactor MoCo es la forma empleada por la enzima codificada por el gen AAO3, la cual cataliza la oxidación del grupo 1-aldehído del aldehído abscísico a ácido carboxílico, obteniéndose ABA como producto (Seo, M. et al., 2000a). La familia de genes que codifican para aldehído oxidasas de *A.thaliana* esta compuesta por 4 miembros, denominados AAO1-4 (Seo, M. et al., 2000a). Los ensayos de actividad oxidasa de aldehído indican que las actividades codificadas por los genes AAO1, AAO2 y AAO4 no son capaces de emplear aldehído abscísico como sustrato (Sekimoto, H. et al., 1998; Seo, M. et al., 2000a). En cambio, la actividad codificada por el gen AAO3 (AO δ) es capaz de oxidar eficientemente el aldehído abscísico a ABA (Seo, M. et al., 2000a). Adicionalmente, el aislamiento y caracterización de un alelo mutante deficiente en ABA para el *locus* AAO3 proporcionó la confirmación definitiva de la implicación del gen en el ultimo paso de la biosíntesis de ABA. El mutante *aao3-1*, aislado en el fondo genético *La-er*, mostró unos niveles de ABA en hojas de roseta de solo el 30% del nivel de ABA en el ecotipo silvestre y una mayor pérdida de agua que el ecotipo silvestre. No obstante, el mutante *aao3-1* poseía una latencia en sus semillas

comparable a la del ecotipo silvestre y los niveles de ABA en semillas secas estaban reducidos solo en un 40% respecto al ecotipo silvestre (Seo, M. et al., 2000b). Así pues, la función principal de la actividad codificada por el gen AAO3 consistiría en la catalización del último paso de la biosíntesis de ABA en hojas de roseta, pero no en semillas. En semillas se supone que actuaría otra aldehído oxidasa, que según los estudios de expresión génica podría ser el producto codificado por el gen AAO1 (Seo, M. et al., 2000b; Seo, M. et al., 2000a; Seo, M. and Koshiba, T., 2002).

En el presente trabajo se ha realizado el aislamiento y caracterización de dos nuevos alelos mutantes de *locus* AAO3, denominados *sre2-1/aao3-2* y *se2-2/aao3-3*. Estos nuevos mutantes *aao3*, en contraste con el mutante previamente descrito *aao3-1*, muestran una reducción significativa de la latencia y de los niveles de ABA en semillas comparado con el ecotipo silvestre. Semillas de los mutantes *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3* muestran una reducción de los niveles de ABA del 65% respecto de su ecotipo silvestre frente al 40% que muestran las semillas del mutante *aao3-1* y una latencia similar a la que poseen otros mutantes de la biosíntesis de ABA, frente a la latencia comparable a la del ecotipo silvestre que poseen las semillas mutantes *aao3-1* (Tablas 5.9. y 5.10.). En cambio, las plantas mutantes *sre2-1/aao3-2* y *se2-2/aao3-3* muestran un fenotipo de marchitamiento y unos niveles reducidos de ABA en hojas de roseta como el mutante *aao3-1* (Figura 5.21. y Tabla 5.11.)

La caracterización molecular del gen AAO3 en el mutante *sre2-1/aao3-2* reveló la existencia de una inserción de T-DNA en el primer intrón que eliminaba la expresión del gen y producía un alelo nulo de AAO3 (Figuras 5.22. y 5.24.). En el caso del mutante *sre2-2/aao3-3*, la secuenciación del gen AAO3 permitió encontrar una mutación compleja en el sexto exón compuesta por la pérdida de 3 nucleótidos y el cambio de varios nucleótidos más. Esta mutación producía presumiblemente la pérdida de un residuo aminoacídico y el cambio de 5 más respecto del ecotipo silvestre (Figura 5.22.). Este cambio de aminoácidos tendría lugar en el primer sitio de unión del cofactor MoCo (residuos 797-803) y afectaría también al presumible sitio de unión de sustrato (residuos 878-886; Sekimoto, H. et al., 1998). Además, el programa informático PROSITE predice un sitio de unión a nucleótido que estaría localizado entre los residuos 796 y 826, el cual también resultaría afectado por la mutación. Todos estos datos junto con que la expresión del gen en el mutante es similar a la del ecotipo silvestre (Figura 5.10.) indican que la mutación en el alelo *sre2-2/aao3-3* tendría un gran efecto sobre la actividad enzimática de AAO3.

Apoyaría esta suposición el hecho que el fenotipo del alelo *sre2-2/aao3-3* es bastante similar al del alelo nulo *sre2-1/aao3-2*, y que en ambos el contenido de ABA esta reducido a unos niveles similares tanto en semilla como en hojas de roseta (Tabla 5.10. y 5.11.).

Según Seo et al., (2000b), el gen AAO3 se expresaría en raíces, hojas de roseta, tallos, flores y plántulas de 8 días. Sin embargo, no se detectó RNA mensajero del gen AAO3 en semillas secas y silicuas, lugares donde se supone estaría actuando la enzima codificada por el gen. Así, los fenotipos de los nuevos alelos mutantes *aao3* plantearon que se debía reanalizar la expresión del gen AAO3 tanto en silicuas como en semillas. Como resultado, el transcrito del gen AAO3 fue detectado en silicuas y semillas embebidas sometidas a estrés osmótico (Figura 5.24.). No obstante fue necesario emplear entre 15 y 20 µg de RNA total para poder detectar una débil expresión del gen AAO3 en silicuas en lugar de los 5 µg de RNA total empleados en Seo, et al., (2000b). En cambio, de acuerdo con los datos de Seo et al, (2000b) fue imposible detectar expresión del gen AAO3 en semillas secas (Figura 5.24.). Sin embargo, después de la imbibición de las semillas y bajo condiciones de estrés osmótico se produce la inducción de la expresión del gen AAO3 (Figura 5.24.). Estos resultados junto con el aumento de los niveles de ABA medidos en semillas tratadas con 200 mM NaCl sugieren que tiene lugar síntesis de novo de ABA en las semillas sometidas a estrés osmótico. De acuerdo con esta idea, los mutantes deficientes en ABA se comportaran como mutantes resistentes a sal en ensayos de germinación (Leon-Kloosterziel, K. M. et al., 1996; Quesada, V. et al., 2000; presente trabajo).

La caracterización fisiológica de ambos alelos *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3* revela notables diferencias respecto del mutante *aao3-1*. A pesar que las semillas de los tres alelos *aao3* poseen resistencia al estrés salino y osmótico, solo las semillas de los mutantes *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3* muestran una reducida latencia y germinación en medios con paclobutrazol (Tabla 5.9.). Estos datos junto con los reducidos niveles de ABA en las semillas (Tabla 5.10.) apoyan un papel para el producto codificado por el gen AAO3 en la biosíntesis de ABA en semillas. Las diferentes características de los mutantes *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3* con respecto al mutante *aao3-1* pueden ser atribuidas por lo menos a dos razones. La primera, es que la mutación *aao3-1* no es probablemente nula. Esta mutación es una sustitución única de un par de bases al final del noveno intrón del gen AAO3, la cual provoca un procesado incorrecto del transcrito primario de AAO3 (Seo, M. et al., 2000b). De

cualquier manera, se producen transcritos más cortos con una deleción de 6 pb (Seo, M. et al., 2000b). Por lo tanto, no se puede excluir que exista una actividad residual por debajo del límite de detección del ensayo de actividad empleado. Segundo, la mutación *aa03-1* se encuentra en el fondo genético *La-er*, mientras que las mutaciones *sre2-1/aa03-2* y *sre2-2/aa03-3* están en el fondo Col. El mutante *erecta* tiene una lesión en un repetición rica en leucinas de un receptor quinasa que afecta al desarrollo de los órganos de la parte aérea de la planta (Godiard, L. et al., 2003). De hecho, semillas del ecotipo silvestre *La-er* son más sensibles a la inhibición de la germinación por bajas concentraciones de ABA que el ecotipo Col. Por lo tanto, el umbral de concentración de ABA necesario para mostrar una reducción en la latencia de las semillas puede ser diferente en ambos genotipos silvestres (Col y *La-er*). En cualquier caso, la identificación de las lesiones genéticas en el *locus* AAO3 que provocan el fenotipo deficiente de ABA en semillas del ecotipo silvestre Col sugieren con rotundidad que este gen está implicado en la biosíntesis de ABA en semillas.

6.4. Caracterización del nuevo alelo mutante *sre3/aba1-101*.

El aislamiento del mutante insercional *aba2* de *Nicotiana plumbaginifolia* permitió la identificación molecular del gen que codifica la actividad zeaxantina epoxidasa encargada de catalizar la conversión de la zeaxantina a violaxantina vía anteraxantina mediante dos pasos consecutivos de epoxidación. Así mismo, la complementación del mutante *aba1* de *A.thaliana* por el gen ABA2 de *Nicotiana* permitió identificar al gen ABA1 de *A.thaliana* como el ortólogo del gen ABA2 de *Nicotiana* (Marin, E. et al., 1996), corroborando los estudios bioquímicos que indicaban que el mutante *aba1* de *A.thaliana* poseía bloqueado la conversión de zeaxantina a violaxantina (Rock, C. D. and Zeevaart, J. A., 1991). Posteriormente, el proyecto genoma de *A.thaliana* permitió identificar un gen con alta homología al gen ABA2 de *Nicotiana*, anotándose como el gen que codifica la enzima ZEP de *A.thaliana*, aunque no fue hasta hace unos pocos años que se identificó el cDNA del gen ABA1 y se caracterizaron molecularmente un gran número de alelos mutantes *aba1* que identificaban inequívocamente al gen ABA1 (Audran, C. et al., 2001; Xiong, L. et al., 2002a).

En el presente trabajo se presenta la identificación de un nuevo alelo mutante *aba1* denominado *sre3/aba1-101* aislado en un análisis genético de germinación en un medio suplementado con NaCl (Figura 5.1.). Además del fenotipo de germinación en medios suplementados con NaCl, manitol y paclobutrazol (Figura 5.28.) presenta una mayor transpiración que el ecotipo silvestre (Figura 5.29.) y una dramática reducción del crecimiento vegetativo y del número de semillas (Figura 5.32.). El análisis de complementación llevado a cabo con el mutante *sre3/aba1-101* empleando DNA genómico del ecotipo silvestre que contenía la ORF del gen ABA1 y parte del promotor, confirmo que la mutación *sre3/aba1-101* era la causante del fenotipo en el mutante (Figura 5.32.).

El análisis de la expresión del gen ABA1 en el ecotipo silvestre mostró claramente la inducción transitoria de la expresión del gen en plantas tratadas con ABA o NaCl (Figura 5.31.), confirmando los datos previos obtenidos (Bittner, F. et al., 2001; Xiong, L. et al., 2002a). Así mismo, la expresión de los genes de biosíntesis ABA2, AAO3 y NCED3 en los mutantes *aba1* confirmo también los datos previos (Xiong, L. et al., 2002a).

6.5. Ruta de biosíntesis de ABA en plantas.

La disponibilidad de mutantes deficientes en ABA ha permitido mostrar en primer lugar la intervención del ABA en diferentes procesos fisiológicos, y posteriormente la identificación de la ruta de biosíntesis de ABA y los genes que codifican para las enzimas que en ella intervienen. La gran mayoría de estos genes están clonados y sus productos génicos han sido caracterizados (revisado en Seo, M. and Koshiba, T., 2002; Schwartz, S. H. et al., 2003a). No obstante, hasta hace unos pocos años no se pudo identificar claramente la ruta que proporcionaba los precursores para la ruta de biosíntesis de ABA y tampoco se conocían todas las identidades moleculares de los genes implicados en la biosíntesis de ABA. Los precursores carotenoides de la ruta de biosíntesis son sintetizados a partir de los pentaterpenos IPP y DMAPP obtenidos mediante la ruta de biosíntesis de isoprenoides en los plástidos (ruta MEP) (revisado en Seo, M. and Koshiba, T., 2002). Seguidamente tiene lugar el primer paso específico de la ruta de biosíntesis de ABA, la epoxidación del carotenoide zeaxantina a trans-violaxantina catalizada por la enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP) codificada por el gen ABA1 de *A.thaliana*

(Marin, E. et al., 1996; Audran, C. et al., 2001; Xiong, L. et al., 2002a). A continuación la trans-violaxantina es isomerizada mediante varias actividades todavía no identificadas, obteniéndose los compuestos 9-cis-violaxantina y 9-cis-neoxantina, que son sustratos de la enzima 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED). Esta enzima cataliza la rotura oxidativa del 9-cis-epoxicarotenoide para formar xantoxina, la cual sale de forma desconocida del plástido al citosol de la célula donde tendrán lugar los últimos pasos de la ruta de biosíntesis.

En los últimos años han existido dos rutas alternativas para la transformación de la xantoxina a ABA. La primera tendría lugar vía el metabolito aldehído abscísico, y la segunda vía el metabolito ácido xantóxico. La caracterización bioquímica de las enzimas codificadas por los genes ABA2 (Gonzalez-Guzman, M. et al., 2002; Cheng, W. H. et al., 2002) y AAO3 (Seo, M. et al., 2000b; Gonzalez-Guzman, M. et al., 2004) confirman definitivamente a la ruta de transformación de xantoxina a ABA vía el aldehído abscísico como los últimos pasos de la ruta mayoritaria de biosíntesis de ABA en todos los estadios de la planta. Así pues el presente trabajo de tesis doctoral ha permitido concluir definitivamente que la ruta mayoritaria de biosíntesis de ABA es aquella que transforma la xantoxina en ABA vía aldehído abscísico.

Los mutantes de biosíntesis de ABA poseen entre 20 y 30 veces menos ABA que el ecotipo silvestre en condiciones de estrés hídrico (Tabla 5.3.). No obstante el hecho que mutantes de los genes ABA1, ABA2 y AAO3 de *A.thaliana* posean unos niveles residuales de ABA en condiciones normales indica la existencia de otras posibles vías alternativas para la síntesis de ABA (Marin, E. et al., 1996; Seo, M. and Koshiba, T., 2002). Una de estas vías podría ser la ruta del ácido xantóxico. Existen diferentes evidencias apoyan su existencia, como el aislamiento de ácido xantóxico en estudios de intermediarios en cloroplastos de espinacas (Milborrow, B. V., 2001) y que la enzima codificada por AAO3 sea capaz de catalizar *in vitro* la conversión de xantoxina a ácido xantóxico (Seo, M. and Koshiba, T., 2002). Sin embargo, el hecho que la enzima ABA2 no sea capaz de emplear ácido xantóxico como sustrato (Cheng, W. H. et al., 2002) implica la existencia de otra actividad alcohol deshidrogenasa todavía no identificada. De este modo, la identificación de esta actividad supondrá la clarificación de la existencia de esta vía. Otra vía alternativa que funcionaría en tomate es aquella en la cual el aldehído abscísico es transformado en alcohol abscísico y este se transforma finalmente en ABA (Seo, M. and Koshiba, T., 2002). Los datos obtenidos en el presente trabajo indican que esta misma ruta se

daría en *A.thaliana* y que seguramente estaría inducida por estrés dados los niveles de ABA en las hojas de roseta de los mutantes *aa03* (Tabla 5.11.).

Sin embargo, puede ser que en lugar de vías minoritarias de biosíntesis de ABA existan otros enzimas capaces de realizar los distintos pasos de la ruta. Por ejemplo, el gen NCED pertenece a una familia génica en la cual varios de sus miembros son capaces de catalizar la rotura oxidativa de los 9-cis-epoxycarotenoides y además son regulados de forma diferente por estrés (revisado en Xiong, L. and Zhu, J. K., 2003). Así, en el presente trabajo se ha presentado la caracterización bioquímica de una enzima de la familia SDR, a la que pertenece ABA2, que es capaz de catalizar *in vitro* la conversión de xantoxina en aldehído abscísico (Figura 5.20.), indicando que esta enzima podría actuar en ausencia de la enzima ABA2 y de este modo los mutantes *aba2* poseerían unos niveles basales de ABA (Tabla 5.3.).

Además existen varios puntos de la ruta de biosíntesis de ABA sobre los que hay que seguir investigando. Por ejemplo, todavía hay determinadas actividades implicadas en la ruta sin identificar, como las isomerasas implicadas en la conversión de trans-violaxantina a 9-cis-neoxantina o 9-cis-violaxantina, así como aspectos de la biosíntesis de ABA relativos a las vías minoritarias. Pero sin duda, lo más interesante es conocer como se regula la ruta de biosíntesis de ABA, y en consecuencia, como podemos aplicar estos conocimientos para mejorar la producción vegetal.

Las mediciones de los niveles de ABA presente en los mutantes de biosíntesis de ABA y en el ecotipo silvestre en condiciones normales muestran la existencia de unos niveles basales de ABA necesarios para el desarrollo y crecimiento de las plantas (Tabla 5.3.; Seo, M. and Koshiba, T., 2002). Sin embargo, otros procesos como la maduración de las semillas y la respuesta a estreses ambientales requieren un aumento de estos niveles de ABA. Así, el ABA promueve en estos procesos la síntesis de diferentes proteínas, la maduración del embrión, el inicio y mantenimiento de la latencia de las semillas y el cierre de los estomas, apreciándose notables diferencias entre los mutantes y el ecotipo silvestre (Figuras 5.5., 5.6. y 5.8.). La diferencia entre estos procesos indica una compleja regulación de la biosíntesis de ABA.

Primeramente parece existir una regulación de la biosíntesis según el estadio de desarrollo. El gen ABA1 de *A.thaliana* es expresado justo antes de la aparición del pico de ABA durante la formación del embrión (Audran, C. et al., 2001). Diversos estudios indican que este pico de ABA es producido por la madre (Karssen, C. M. et

al., 1983). Sin embargo, recientemente ha surgido la hipótesis que el ABA sintetizado por la madre puede ser la señal para la biosíntesis *de novo* de ABA en los embriones en desarrollo, indicando que el ABA es un regulador positivo de su propia biosíntesis (Xiong, L. and Zhu, J. K., 2003). Asimismo, parecen que el azúcar es otra señal reguladora. La expresión de los genes ABA1, ABA2, AAO3 y ABA3 es inducida por azúcar en semillas (Cheng, W. H. et al., 2002), siendo especialmente importante esta inducción para el gen ABA2 puesto que no es inducible por estrés (osmótico y salino) ni ABA (Figura 5.15.). Esta inducción indicaría que los niveles de azúcar pueden regular la biosíntesis de ABA en el embrión y que el gen ABA2 puede ser la pieza principal de esta regulación (Cheng, W. H. et al., 2002). La sobreexpresión de los genes ABA2 de *Nicotiana* y NCED1 de tomate producen semillas que poseen más ABA y muestran más latencia (Frey, A. et al., 1999; Thompson, A. J. et al., 2000b), indicando que pueden haber múltiples pasos de regulación de la biosíntesis de ABA en las semillas en desarrollo y que el enzima codificado por ABA1 puede ser un paso realmente importante en la biosíntesis de ABA en tejidos no fotosintéticos (Xiong, L. et al., 2002a; Xiong, L. and Zhu, J. K., 2003).

La luz actúa también como una señal reguladora. Los genes encargados de codificar las enzimas ZEP y NCED en tomate y tabaco poseen su expresión regulada por el ritmo circadiano en los tejidos fotosintéticos (Audran, C. et al., 1998; Thompson, A. J. et al., 2000a). Esta regulación parece estar relacionada con el papel desempeñado por los productos de las enzimas en el sistema de fotoprotección de los fotosistemas.

La inducción de la biosíntesis de ABA por los estreses abióticos, principalmente salinidad y sequía, se produce principalmente mediante la regulación transcripcional de los genes biosintéticos. Esta regulación es posiblemente la clave de la regulación de la ruta de biosíntesis de ABA, aunque no se puede olvidar la regulación específica que puede tener cada paso de la ruta. En general, los genes de la biosíntesis de ABA, salvo el gen ABA2, son sobreexpresados en las plantas cuando se someten a tratamientos de estrés salino y osmótico (revisado en Xiong, L. and Zhu, J. K., 2003). El paso catalizado por la enzima NCED es considerado como el paso clave de la regulación de la ruta. El gen es inducido por estrés en diferentes especies como maíz (Tan, B. C. et al., 1997), tomate (Burbidge, A. et al., 1999), guisante (Qin, X. and Zeevaart, J. A., 1999) y *A.thaliana* (Iuchi, S. et al., 2001), con

una inducción de la expresión muy elevada a los 15-30 minutos posteriores al tratamiento (Qin, X. and Zeevaart, J. A., 1999) y además semillas de plantas de tomate que sobreexpresan el gen poseen más ABA y muestran una mayor latencia (Thompson, A. J. et al., 2000b). El gen que codifica la actividad ZEP no está regulado por estrés en hojas de tabaco y tomate pero sí lo está en raíces (Audran, C. et al., 1998; Thompson, A. J. et al., 2000a). En cambio en *A.thaliana* este sí es claramente inducido con tratamientos de sequía, salinidad, polietilenglicol (Xiong, L. et al., 2002a) y ABA (Figura 5.31.A.) tanto en hojas como en raíces, demostrando que la regulación de los enzimas puede ser diferente en distintas especies.

Un caso especialmente interesante es el anteriormente nombrado de la regulación del gen ABA2 de *A.thaliana*. El gen es expresado constitutivamente con unos niveles muy bajos en raíz, tallo, hojas de roseta y silicuas (Figura 5.15.A.) y no es inducido por estrés salino ni ABA (Figura 5.15.C.) aunque sí por azúcar (Cheng, W. H. et al., 2002). Estos datos indican que los cambios en los niveles de azúcar en las semillas en maduración podrían regular la biosíntesis de ABA y por tanto el desarrollo de la semilla.

No obstante, no se ha determinado a nivel de proteína el efecto de la inducción de la transcripción de los genes. Es esperado que los niveles de proteína aumenten con los niveles de RNA mensajero como ocurre en el caso de la enzima NCED (Qin, X. and Zeevaart, J. A., 1999), aunque el estudio realizado con el gen AAO3 mostró que los niveles de proteína no variaban pese al aumento de la transcripción del gen (Seo, M. et al., 2000a), indicando la existencia de un control postranscripcional en algunos genes de la ruta. Así el conocimiento de las enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis permitirá realizar en un futuro estudios sobre la regulación postranscripcional de las enzimas de la ruta.

La superproducción de ABA causada por la sobreexpresión del gen NCED en tabaco correlaciona con un aumento del catabolito ácido fáséico (Shi, H. et al., 2002), apoyando la idea del ABA como regulador negativo de la acumulación del ABA mediante la activación de los genes encargados de su degradación (Cutler, A. J. and Krochko, J. E., 1999). Sin embargo, los genes ABA1, AAO3 y ABA3 de *A.thaliana* son inducidos por ABA exógeno (Figura 5.31.; Xiong, L. et al., 2001a; Xiong, L. et al., 2001b; Xiong, L. et al., 2002a). El gen NCED no es inducido por ABA exógeno en tomate (Thompson, A. J. et al., 2000b) ni en judía (Iuchi, S. et al., 2000), aunque se ha encontrado que el ABA es necesario para la completa inducción

transcripcional del gen NCED3 de *A.thaliana* por estrés osmótico (Xiong, L. et al., 2002a). Además, este gen es inducido por ABA exógeno en el fondo genético *La-er* (Cheng, W. H. et al., 2002), y en los mutantes *sre1/aba2*, *sre2/ao3* y *sre1/aba1* el gen se encuentra menos expresado que en el ecotipo silvestre (Figuras 5.16., 5.25., 5.31.). Todas estas observaciones sugieren que el ABA actúa como un regulador positivo de su propia biosíntesis, seguramente como un mecanismo de adaptación al estrés por el cual una inducción inicial de la biosíntesis de ABA puede rápidamente estimular una mayor producción. Diversas observaciones indican que la ribonucleoproteína SAD1, y alguna proteína fosfatasa podrían ser elementos de este circuito de autorregulación (Xiong, L. and Zhu, J. K., 2003). Asimismo, la interconexión existente entre las hormonas ABA y etileno y la sacarosa en diferentes aspectos fisiológicos, y el hecho que no se haya obtenido ningún componente que regule directamente la biosíntesis de ABA puede significar que exista algún componente de señalización de otras rutas de respuesta que este implicada en la regulación de la biosíntesis de ABA.

Recientes estudios histológicos muestran la expresión localizada de los genes ABA2 y AAO3, últimos pasos de la ruta de biosíntesis; (Cheng, W. H. et al., 2002; Koiwai, H. et al., 2004). El gen ABA2 se expresaba específicamente en tejido vascular del hipocotilo, en las venas de las hojas, en el tallo, en las flores abiertas, en el septum y funículo de silicuas en desarrollo y en silicuas jóvenes en desarrollo (Cheng, W. H. et al., 2002). El gen AAO3 también se expresaba abundantemente en el tejido vascular de raíces, hipocotilos, tallos de inflorescencia y en las venas de las hojas. Concretamente, la proteína AAO3 fue específicamente localizada en las células acompañantes de floema y en las células parenquimáticas del xilema. Las células acompañantes forma parte del complejo denominado tubos cribosos-células acompañantes (SE-CC), el cual posee un papel principal en el movimiento de solutos y macromoléculas de las células del mesófilo al resto de la planta y en el control de las sustancias que entran y salen del floema (Ayre, B. G. et al., 2003). Asimismo, se ha encontrado una expresión elevada del antiportador Na^+/H^+ SOS1 en las células parenquimáticas del xilema (Shi, H. et al., 2002) y algunas proteínas/genos inducibles por estrés son expresados abundantemente en las zonas vasculares. Estos datos hacen que (Koiwai, H. et al., 2004) propongan que la localización de los enzimas AAO3 y ABA2 en el tejido vascular responde a que la existencia de los estreses osmóticos y salinos es controlada en los tejidos vasculares y que la relación

entre la biosíntesis de ABA y la cantidad de ABA cargado es regulada en las células acompañantes y/ o las células parenquimáticas del xilema. Entonces, el ABA secretado es transportado a diferentes órganos o tejidos diana a través de los tubos cribosos del floema o de las traqueas del xilema.

Así mismo, se ha localizado expresión del gen AAO3 en las células oclusivas y se ha observado que esta expresión es fuertemente inducida en respuesta a estrés por sequía, lo que indica la existencia de síntesis de novo de ABA. Así, se han obtenido pruebas de la implicación de la síntesis de novo de ABA en el cierre estomático.

7. Conclusiones.

1. El análisis genético de la tolerancia a sal en *Arabidopsis thaliana* realizado en el presente trabajo ha permitido aislar tres mutantes *sre* (“salt resistant”) denominados *sre1*, *sre2* y *sre3*. Estos mutantes mostraban gran capacidad para germinar y establecer plántula en condiciones de estrés osmótico y paclobutrazol, latencia muy reducida, mayor transpiración y niveles de ABA en hojas de roseta significativamente menores que plantas silvestres. El análisis de complementación con mutantes de biosíntesis de ABA determino que los mutantes *sre* eran nuevos alelos mutantes de los *loci* de biosíntesis ABA1, ABA2 y AAO3. El aislamiento de estos nuevos alelos mutantes junto con el aumento de la biosíntesis de ABA determinado en las semillas de *Arabidopsis* en condiciones de estrés salino demuestran el papel crucial desempeñado por el ABA en la inhibición de la germinación en condiciones desfavorables de estrés osmótico.
2. La combinación de las técnicas de mapeo posicional e hipótesis del gen candidato junto con la identificación de una nueva serie alélica *aba2* mutante ha permitido identificar al gen At1g52340 como el gen ABA2. El análisis de la secuencia determinó que el gen ABA2 codifica un miembro de la familia de alcohol deshidrogenasas de cadena corta (SDR). Mediante un análisis HPLC-MS se ha demostrado que la proteína recombinante ABA2 cataliza la conversión de xantoxina en aldehído abscísico en una reacción dependiente de NAD^+ con una K_m de 19,2 μM . Los resultados obtenidos en el presente trabajo establecen inequívocamente que la conversión de xantoxina en aldehído abscísico representa el penúltimo paso de la ruta de biosíntesis de ABA y que este es catalizado por el producto génico del gen ABA2 (At1g52340).

3. El análisis de las secuencias de diversos miembros de la familia de proteínas alcohol deshidrogenasas de cadena corta permitió identificar dos genes (At2g47130 y At3g29250) que codifican proteínas con la mayor similitud a ABA 2 (60%). El análisis HPLC-MS ha permitido demostrar que la proteína recombinante codificada por el gen At2g47130 es capaz de catalizar la conversión de xantoxina en aldehído abscísico en una reacción *in vitro* dependiente de NAD⁺ con una K_m de 300 μM. Este resultado sugiere la posibilidad que los niveles de ABA basales en condiciones normales de los mutantes *aba2* sean debidos a la actuación de este u otros enzimas similares capaces de llevar a cabo la conversión de xantoxina a aldehído abscísico en ausencia de la proteína ABA2.

4. Los mutantes *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3*, igual que el mutante *aao3-1*, muestran una reducción en los niveles de ABA en hojas de roseta y una mayor transpiración que las plantas silvestres. En cambio, contrariamente el mutante *aao3-1*, muestran un fenotipo de osmotolerancia en germinación y establecimiento de plántula, germinación resistente a paclobutrazol, latencia reducida y poseen una reducción del 65% en los niveles de ABA en semillas. Las caracterizaciones moleculares de las mutaciones *sre2-1/aao3-2* y *sre2-2/aao3-3* junto con la complementación de fenotipo mutante indican que lesiones en el gen AAO3 conducen a niveles reducidos de ABA y fenotipos característicos en semillas. Por consiguiente, queda demostrado que el gen AAO3 desempeña un papel crucial en la biosíntesis de ABA en semillas.

Apéndice: Marcadores moleculares

Marcador	Secuencia cebador (5'-3')	Polimorfismo pb (Col:La-er)
F11M15	GTA GAG GAC GTG GTG TGG GAT AAC GAG CCT CTT AGC	130:190
F5F19	CCA GAA GAT CTA CCT CTG GGT TCA ATG TCT GGG AC	154:127
F6D8	TCT TCC AGA GTT TGA CTC TG CTA CGT ATT ATC ATG TAA TGG	260:166
F12M16	GGC GAA TTA TGA ATC CAA CTA GAG CAA CCG ACT TCG GCA	169:130
F15I1	ATG ATG GTC ACA ACG GTG GTT CTA TTA CTA CTT TCA CC	227:187
F16N3	TGG GTT TAG GAG AAG ACG TAC CAT TGA CCG ACG TGC	141:166
F2F22	GCC TCA AAT ACA CGG GTG TTA GAC CAA CAA TAA TTG GG	205:180
F19C24	GAG AAA ACT GAA CAT CGT GG AAT CAT AGC CTA GTG GGG	340:277
T5A14	TAT ATA TCG TGA ATT CCG CA GAG GAG ATT TTA CCG TTG	312:210
F8L180	TGA ACT AAC AAC ACT ACC TAT ACG GAC TTA CTA TAT G	415:350
ciw1	ACA TTT TCT CAA TCC TTA CTC GAG AGC TTC TTT ATT TGT GAT	160:135
nga280	GGC TCC ATA AAA AGT GCA CC CTG ATC TCA CGG ACA ATA GTG C	105:85

Bibliografía

- Abe,H., Yamaguchi-Shinozaki,K., Urao,T., Iwasaki,T., Hosokawa,D., and Shinozaki,K.** (1997) Role of arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* **9**:1859-1868.
- Addicott,F.T., Cars,H.R., Cornforth,J.W., Lyon,J.L., Milborrow,B.V., Ohkuma,K., Ryback,G., Smith,O.E., Thiessen,W.E., and Wareing,P.F.** (1968) Abscisic acid: a proposal for the redesignation of abscisic acid II (dormin). In *Biochemistry and physiology of plant growth substances*, F.Wightman and G.Setterfield, eds (Ottawa, Canada: Runge Press), pp. 1527-1529.
- Akaba,S., Leydecker,M.T., Moureaux,T., Oritani,T., and Koshiba,T.** (1998) Aldehyde oxidase in wild type and *aba1* mutant leaves of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Cell Physiol* **39**:1281-1286.
- Akaba,S., Seo,M., Dohmae,N., Takio,K., Sekimoto,H., Kamiya,Y., Furuya,N., Komano,T., and Koshiba,T.** (1999) Production of homo- and hetero-dimeric isozymes from two aldehyde oxidase genes of *Arabidopsis thaliana*. *J.Biochem.(Tokyo)* **126**:395-401.
- Allan,A.C., Fricker,M.D., Ward,J.L., Beale,M.H., and Trewavas,A.J.** (1994) Two Transduction Pathways Mediate Rapid Effects of Abscisic Acid in Commelina Guard Cells. *Plant Cell* **6**:1319-1328.
- Allen,G.J., Chu,S.P., Harrington,C.L., Schumacher,K., Hoffmann,T., Tang,Y.Y., Grill,E., and Schroeder,J.I.** (2001) A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* **411**:1053-1057.
- Allen,G.J., Chu,S.P., Schumacher,K., Shimazaki,C.T., Vafeados,D., Kemper,A., Hawke,S.D., Tallman,G., Tsien,R.Y., Harper,J.F., Chory,J., and Schroeder,J.I.** (2000) Alteration of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in *Arabidopsis det3* mutant. *Science* **289**:2338-2342.
- 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.
- Arenas-Huertero,F., Arroyo,A., Zhou,L., Sheen,J., and Leon,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 Dev.* **14**:2085-2096.
- Assmann,S.M. and Shimazaki,K.** (1999) The multisensory guard cell. Stomatal responses to blue light and abscisic acid. *Plant Physiol* **119**:809-816.
- Audran,C., Borel,C., Frey,A., Sotta,B., Meyer,C., Simonneau,T., and Marion-Poll,A.** (1998) Expression studies of the zeaxanthin epoxidase gene in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiol* **118**:1021-1028.
- Audran,C., Liotenberg,S., Gonneau,M., North,H., Frey,A., Tap-Waksman,K., Vartanian,N., and Marion-Poll,A.** (2001) Localisation and expression of zeaxanthin epoxidase mRNA in *Arabidopsis* in response to drought stress and during seed development. *Australian Journal of Plant Physiology* **28**:1161-1173.
- Ayre,B.G., Keller,F., and Turgeon,R.** (2003) Symplastic continuity between companion cells and the translocation stream: long-distance transport is controlled by retention and retrieval mechanisms in the phloem. *Plant Physiol* **131**:1518-1528.
- Bates,L.S., Waldren,R.P., and Teare,I.D.** (1973) *Plant Soil* **39**:205-207.
- Beaudoin,N., Serizet,C., Gosti,F., and Giraudat,J.** (2000) Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell* **12**:1103-1115.
- Bentsink,L. and Koornneef,M.** (2003) 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 Physiol* **111**:525-531.
- Bewley,J.D.** (1997) Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell* **9**:1055-1066.

- Bezerra,I.C., Michaels,S.D., Schomburg,F.M., and Amasino,R.M.** (2004) Lesions in the mRNA cap-binding gene ABA HYPERSENSITIVE 1 suppress FRIGIDA-mediated delayed flowering in Arabidopsis. *Plant J.* **40**:112-119.
- Bittner,F., Oreb,M., and Mendel,R.R.** (2001) ABA3 is a molybdenum cofactor sulfurase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in Arabidopsis thaliana. *J.Biol.Chem.* **276**:40381-40384.
- Blake,M.S., Johnston,K.H., Russell-Jones,G.J., and Gotschlich,E.C.** (1984) A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal.Biochem.* **136**:175-179.
- Bouvier,F., d'Harlingue,A., Backhaus,R.A., Kumagai,M.H., and Camara,B.** (2000) Identification of neoxanthin synthase as a carotenoid cyclase paralog. *Eur.J.Biochem.* **267**:6346-6352.
- Bouvier,F., d'Harlingue,A., Hugueney,P., Marin,E., Marion-Poll,A., and Camara,B.** (1996) Xanthophyll biosynthesis. Cloning, expression, functional reconstitution, and regulation of beta-cyclohexenyl carotenoid epoxidase from pepper (*Capsicum annuum*). *J.Biol.Chem.* **271**:28861-28867.
- Boyer,J.S.** (1982) Plant productivity and environment. *Science* **218**:443-448.
- Bradford,M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**:248-254.
- Brocard,I.M., Lynch,T.J., and Finkelstein,R.R.** (2002) Regulation and role of the Arabidopsis abscisic acid-insensitive 5 gene in abscisic acid, sugar, and stress response. *Plant Physiol* **129**:1533-1543.
- Burbidge,A., Grieve,T.M., Jackson,A., Thompson,A., McCarty,D.R., and Taylor,I.B.** (1999) Characterization of the ABA-deficient tomato mutant notabilis and its relationship with maize Vp14. *Plant J.* **17**:427-431.
- Burbidge,A., Grieve,T.M., Terry,C., Corlett,J., Thompson,A., and Taylor,I.B.** (1997) Gene note. Structure and expression of a cDNA encoding zeaxanthin epoxidase, isolated from a wilt-related tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) library. *Journal of Experimental Botany* **48**:2111-2112.
- Burden,R.S. and Taylor,H.F.** (1970) The structure and chemical transformations of xanthoxin. *Tetrahedron Lett.* **47**:4071-4074.
- Burnette,W.N.** (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal.Biochem.* **112**:195-203.
- Cheng,W.H., Endo,A., Zhou,L., Penney,J., Chen,H.C., Arroyo,A., Leon,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. *Plant Cell* **14**:2723-2743.
- Chernys,J.T. and Zeevaart,J.A.** (2000) Characterization of the 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado. *Plant Physiol* **124**:343-353.
- Choi,H., Hong,J., Ha,J., Kang,J., and Kim,S.Y.** (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J.Biol.Chem.* **275**:1723-1730.
- Clouse,S.D., Langford,M., and McMorris,T.C.** (1996) A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiol* **111**:671-678.
- Colucci,G., Apone,F., Alyeshmerni,N., Chalmers,D., and Chrispeels,M.J.** (2002) GCR1, the putative Arabidopsis G protein-coupled receptor gene is cell cycle-regulated, and its overexpression abolishes seed dormancy and shortens time to flowering. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**:4736-4741.
- Coursol,S., Fan,L.M., Le Stunff,H., Spiegel,S., Gilroy,S., and Assmann,S.M.** (2003) Sphingolipid signalling in Arabidopsis guard cells involves heterotrimeric G proteins. *Nature* **423**:651-654.
- Creelman,R.A., Mason,H.S., Bensen,R.J., Boyer,J.S., and Mullet,J.E.** (1990) Water deficit and abscisic acid cause differential inhibition of shoot versus root growth in soybean seedlings. Analysis of growth, sugar accumulation and gene expression. *Plant Physiology* **92**:205-214.

- Cutler,A.J. and Krochko,J.E.** (1999) Formation and breakdown of ABA. *Trends Plant Sci.* **4**:472-478.
- Cutler,S., Ghassemian,M., Bonetta,D., Cooney,S., and McCourt,P.** (1996) A protein farnesyl transferase involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Science* **273**:1239-1241.
- Deblaere,R., Bytebier,B., De Greve,H., Deboeck,F., Schell,J., Van Montagu,M., and Leemans,J.** (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.* **13**:4777-4788.
- Delauney,A.J., Hu,C.A., Kishor,P.B., and Verma,D.P.** (1993) Cloning of ornithine delta-aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by trans-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. *J.Biol.Chem.* **268**:18673-18678.
- Desikan,R., Hagenbeek,D., Neill,S.J., and Rock,C.D.** (1999) Flow cytometry and surface plasmon resonance analyses demonstrate that the monoclonal antibody JIM19 interacts with a rice cell surface component involved in abscisic acid signalling in protoplasts. *FEBS Lett.* **456**:257-262.
- Dunn,S.D.** (1986) Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western blots by monoclonal antibodies. *Anal.Biochem.* **157**:144-153.
- Eastmond,P.J., Germain,V., Lange,P.R., Bryce,J.H., Smith,S.M., and Graham,I.A.** (2000) Postgerminative growth and lipid catabolism in oilseeds lacking the glyoxylate cycle. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**:5669-5674.
- Ephritikhine,G., Fellner,M., Vannini,C., Lapous,D., and Barbier-Brygoo,H.** (1999) The *sax1* dwarf mutant of *Arabidopsis thaliana* shows altered sensitivity of growth responses to abscisic acid, auxin, gibberellins and ethylene and is partially rescued by exogenous brassinosteroid. *Plant J.* **18**:303-314.
- Estevez,J.M., Cantero,A., Reindl,A., Reichler,S., and Leon,P.** (2001) 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *J.Biol.Chem.* **276**:22901-22909.
- Fan,L., Zheng,S., Cui,D., and Wang,X.** (1999) Subcellular distribution and tissue expression of phospholipase D α , D β , and D γ in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **119**:1371-1378.
- Fan,L., Zheng,S., and Wang,X.** (1997) Antisense suppression of phospholipase D α retards abscisic acid- and ethylene-promoted senescence of postharvest *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell* **9**:2183-2196.
- Finkelstein,R.R.** (1994) Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *Plant Journal* **5**:765-771.
- Finkelstein,R.R. and Lynch,T.J.** (2000) Abscisic acid inhibition of radicle emergence but not seedling growth is suppressed by sugars. *Plant Physiol* **122**:1179-1186.
- Finkelstein,R.R. and Rock,C.D.** (2002) Abscisic Acid Biosynthesis and Response. In *The Arabidopsis Book*, C.R.Somerville and E.M.Meyerowitz, eds (Rockville: MD: American Society of Plants Biologists).
- Foster,R. and Chua,N.H.** (1999) An *Arabidopsis* mutant with deregulated ABA gene expression: implications for negative regulator function. *Plant J.* **17**:363-372.
- Frey,A., Audran,C., Marin,E., Sotta,B., and Marion-Poll,A.** (1999) Engineering seed dormancy by the modification of zeaxanthin epoxidase gene expression. *Plant Mol.Biol.* **39**:1267-1274.
- Gampala,S.S., Hagenbeek,D., and Rock,C.D.** (2001) Functional interactions of lanthanum and phospholipase D with the abscisic acid signaling effectors VP1 and ABI1-1 in rice protoplasts. *J.Biol.Chem.* **276**:9855-9860.
- Garcia-Mata,C. and Lamattina,L.** (2002) Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. *Plant Physiol* **128**:790-792.
- Garcarrubio,A., Legaria,J.P., and Covarrubias,A.A.** (1997) Abscisic acid inhibits germination of mature *Arabidopsis* seeds by limiting the availability of energy and nutrients. *Planta* **203**:182-187.

- 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. *Plant Cell* **12**:1117-1126.
- Ghosh,D., Weeks,C.M., Grochulski,P., Duax,W.L., Erman,M., Rimsay,R.L., and Orr,J.C.** (1991) Three-dimensional structure of holo 3 alpha,20 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a member of a short-chain dehydrogenase family. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**:10064-10068.
- Gilroy,S., Read,N.D., and Trewavas,A.J.** (1990) Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol triphosphate initiates stomatal closure. *Nature* **346**:769-771.
- Godiard,L., Sauviac,L., Torii,K.U., Grenon,O., Mangin,B., Grimsley,N.H., and Marco,Y.** (2003) ERECTA, an LRR receptor-like kinase protein controlling development pleiotropically affects resistance to bacterial wilt. *Plant J.* **36**:353-365.
- Gomez-Cadenas,A., Zentella,R., Walker-Simmons,M.K., and Ho,T.H.** (2001) Gibberellin/abscisic acid antagonism in barley aleurone cells: site of action of the protein kinase PKABA1 in relation to gibberellin signaling molecules. *Plant Cell* **13**:667-679.
- Gonzalez-Guzman,M., Abia,D., Salinas,J., Serrano,R., and Rodriguez,P.L.** (2004) Two new alleles of the abscisic aldehyde oxidase 3 gene reveal its role in abscisic acid biosynthesis in seeds. *Plant Physiol* **135**:325-333.
- Gonzalez-Guzman,M., Apostolova,N., Belles,J.M., Barrero,J.M., Piqueras,P., Ponce,M.R., Micol,J.L., Serrano,R., and Rodriguez,P.L.** (2002) The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. *Plant Cell* **14**:1833-1846.
- Guo,Y., Xiong,L., Song,C.P., Gong,D., Halfter,U., and Zhu,J.K.** (2002) A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signaling in Arabidopsis. *Dev.Cell* **3**:233-244.
- Hable,W.E., Oishi,K.K., and Schumaker,K.S.** (1998) Viviparous-5 encodes phytoene desaturase, an enzyme essential for abscisic acid (ABA) accumulation and seed development in maize. *Mol.Gen.Genet.* **257**:167-176.
- Hamilton,D.W., Hills,A., Kohler,B., and Blatt,M.R.** (2000) Ca²⁺ channels at the plasma membrane of stomatal guard cells are activated by hyperpolarization and abscisic acid. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**:4967-4972.
- Hartung,W., Sauter,A., and Hose,E.** (2002) Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? *J.Exp.Bot.* **53**:27-32.
- Helliwell,C.A., Poole,A., Peacock,W.J., and Dennis,E.S.** (1999) Arabidopsis ent-kaurene oxidase catalyzes three steps of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiol* **119**:507-510.
- 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. *EMBO J.* **21**:3029-3038.
- Himmelbach,A., Iten,M., and Grill,E.** (1998) Signalling of abscisic acid to regulate plant growth. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **353**:1439-1444.
- Himmelbach,A., Yang,Y., and Grill,E.** (2003) Relay and control of abscisic acid signaling. *Curr.Opin.Plant Biol.* **6**:470-479.
- Hirayama,T., Ohto,C., Mizoguchi,T., and Shinozaki,K.** (1995) A gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stress in Arabidopsis thaliana. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**:3903-3907.
- Hirschberg,J.** (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr.Opin.Plant Biol.* **4**:210-218.
- Hoecker,U., Vasil,I.K., and McCarty,D.R.** (1995) Integrated control of seed maturation and germination programs by activator and repressor functions of Viviparous-1 of maize. *Genes Dev.* **9**:2459-2469.
- Hornberg,C. and Weiler,E.** (1984) High affinity binding sites for ABA on the plasmalemma of *Vicia* guard cells. *Nature* **310**:321-324.

- Hoth,S., Morgante,M., Sanchez,J.P., Hanafey,M.K., Tingey,S.V., and Chua,N.H.** (2002) Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abi1-1* mutant. *J.Cell Sci.* **115**:4891-4900.
- Hrabak,E.M., Chan,C.W., Gribskov,M., Harper,J.F., Choi,J.H., Halford,N., Kudla,J., Luan,S., Nimmo,H.G., Sussman,M.R., Thomas,M., Walker-Simmons,K., Zhu,J.K., and Harmon,A.C.** (2003) The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol* **132**:666-680.
- 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.
- Hugouvieux,V., Murata,Y., Young,J.J., Kwak,J.M., Mackesy,D.Z., and Schroeder,J.I.** (2002) Localization, ion channel regulation, and genetic interactions during abscisic acid signaling of the nuclear mRNA cap-binding protein, ABH1. *Plant Physiol* **130**:1276-1287.
- 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.
- Hunt,L., Mills,L.N., Pical,C., Leckie,C.P., Aitken,F.L., Kopka,J., Mueller-Roeber,B., McAinsh,M.R., Hetherington,A.M., and Gray,J.E.** (2003) Phospholipase C is required for the control of stomatal aperture by ABA. *Plant J.* **34**:47-55.
- 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. *Plant Cell* **9**:1935-1949.
- Iuchi,S., Kobayashi,M., Taji,T., Naramoto,M., Seki,M., Kato,T., Tabata,S., Kakubari,Y., Yamaguchi-Shinozaki,K., and Shinozaki,K.** (2001) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* **27**:325-333.
- Iuchi,S., Kobayashi,M., Yamaguchi-Shinozaki,K., and Shinozaki,K.** (2000) A stress-inducible gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerant cowpea. *Plant Physiol* **123**:553-562.
- Jacob,T., Ritchie,S., Assmann,S.M., and Gilroy,S.** (1999) Abscisic acid signal transduction in guard cells is mediated by phospholipase D activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**:12192-12197.
- Jacobsen,J.V.** (1995) Gibberellin action in germinated cereal grains. In *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, P.J.Davies, ed Kluwer Academic Publishers), pp. 246-271.
- Jakoby,M., Weisshaar,B., Droge-Laser,W., Vicente-Carbajosa,J., Tiedemann,J., Kroj,T., and Parcy,F.** (2002) bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* **7**:106-111.
- Jeannette,E., Rona,J.P., Bardat,F., Cornel,D., Sotta,B., and Miginiac,E.** (1999) Induction of RAB18 gene expression and activation of K⁺ outward rectifying channels depend on an extracellular perception of ABA in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Plant J.* **18**:13-22.
- Johnson,R.R., Wagner,R.L., Verhey,S.D., and Walker-Simmons,M.K.** (2002) The abscisic acid-responsive kinase PKABA1 interacts with a seed-specific abscisic acid response element-binding factor, TaABF, and phosphorylates TaABF peptide sequences. *Plant Physiol* **130**:837-846.
- Jornvall,H., Persson,B., Krook,M., Atrian,S., Gonzalez-Duarte,R., Jeffery,J., and Ghosh,D.** (1995) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* **34**:6003-6013.
- Kagaya,Y., Hobo,T., Murata,M., Ban,A., and Hattori,T.** (2002) Abscisic acid-induced transcription is mediated by phosphorylation of an abscisic acid response element binding factor, TRAB1. *Plant Cell* **14**:3177-3189.
- Kang,J.Y., Choi,H.I., Im,M.Y., and Kim,S.Y.** (2002) *Arabidopsis* basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell* **14**:343-357.
- Karszen,C.M., Brinkhorst-van der Swan,D.L.C., Breckland,A.E., and Koornneef,M.** (1983) Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: Studies on abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* **157**:158-165.

- Karssen,C. and Laka,E.** (1986) A revision of the hormone balance theory of seed dormancy: studies on gibberellin and/or abscisic acid-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana*. In Plant Growth Substances, M.Bopp, ed (Berlin: Springer-Verlag), pp. 315-323.
- Kasuga,M., Liu,Q., Miura,S., Yamaguchi-Shinozaki,K., and Shinozaki,K.** (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat.Biotechnol.* **17**:287-291.
- Kim,B.T., Min,Y.K., Asami,T., Park,N.K., Kwon,O.Y., Cho,K.Y., and Yoshida,S.** (1999) 2-fluoroabscisic acid analogues: their synthesis and biological activities. *J.Agric.Food Chem.* **47**:313-317.
- Kim,S.Y., Ma,J., Perret,P., Li,Z., and Thomas,T.L.** (2002) Arabidopsis ABI5 subfamily members have distinct DNA-binding and transcriptional activities. *Plant Physiol* **130**:688-697.
- Kizis,D. and Pages,M.** (2002) Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in rab17 regulation through the drought-responsive element in an ABA-dependent pathway. *Plant J.* **30**:679-689.
- Klusener,B., Young,J.J., Murata,Y., Allen,G.J., Mori,I.C., Hugouvieux,V., and Schroeder,J.I.** (2002) Convergence of calcium signaling pathways of pathogenic elicitors and abscisic acid in Arabidopsis guard cells. *Plant Physiol* **130**:2152-2163.
- Knetsch,M., Wang,M., Snaar-Jagalska,B.E., and Heimovaara-Dijkstra,S.** (1996) Abscisic Acid Induces Mitogen-Activated Protein Kinase Activation in Barley Aleurone Protoplasts. *Plant Cell* **8**:1061-1067.
- Koiwa,H., Barb,A.W., Xiong,L., Li,F., McCully,M.G., Lee,B.H., Sokolchik,I., Zhu,J., Gong,Z., Reddy,M., Sharkhuu,A., Manabe,Y., Yokoi,S., Zhu,J.K., Bressan,R.A., and Hasegawa,P.M.** (2002) C-terminal domain phosphatase-like family members (AtCPLs) differentially regulate Arabidopsis thaliana abiotic stress signaling, growth, and development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**:10893-10898.
- Koiwai,H., Nakaminami,K., Seo,M., Mitsuhashi,W., Toyomasu,T., and Koshiba,T.** (2004) Tissue-specific localization of an abscisic acid biosynthetic enzyme, AAO3, in Arabidopsis. *Plant Physiol* **134**:1697-1707.
- Koornneef,M., Bentsink,L., and Hilhorst,H.** (2002) Seed dormancy and germination. *Curr.Opin.Plant Biol.* **5**:33-36.
- Koornneef,M., Jorna,M.L., Brinkhorst-van der Swan,D.L.C., and Karssen,C.M.** (1982) The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theoretical and Applied Genetics* **61**:83-89.
- Koornneef,M., Reuling,G., and Karssen,C.M.** (1984) The isolation and characterization of abscisic acid insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **61**:377-383.
- Koornneef,M. and van der Veen,J.H.** (1980) Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theoretical and Applied Genetics* **58**:257-263.
- 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 Physiol* **118**:849-860.
- Kruger,N.J.** (1994) The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol.Biol.* **32**:9-15.
- 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. *EMBO J.* **23**:1647-1656.
- Kwak,J.M., Moon,J.H., Murata,Y., Kuchitsu,K., Leonhardt,N., DeLong,A., and Schroeder,J.I.** (2002) Disruption of a guard cell-expressed protein phosphatase 2A regulatory subunit, RCN1, confers abscisic acid insensitivity in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**:2849-2861.
- Laby,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.
- Laemmli,U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.

- Lapik, Y.R. and Kaufman, L.S.** (2003) The Arabidopsis cupin domain protein AtPirin1 interacts with the G protein alpha-subunit GPA1 and regulates seed germination and early seedling development. *Plant Cell* **15**:1578-1590.
- Lease, K.A., Wen, J., Li, J., Doke, J.T., Liscum, E., and Walker, J.C.** (2001) A mutant Arabidopsis heterotrimeric G-protein beta subunit affects leaf, flower, and fruit development. *Plant Cell* **13**:2631-2641.
- Leckie, C.P., McAinsh, M.R., Allen, G.J., Sanders, D., and Hetherington, A.M.** (1998) Abscisic acid-induced stomatal closure mediated by cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **95**:15837-15842.
- Lee, H., Xiong, L., Gong, Z., Ishitani, M., Stevenson, B., and Zhu, J.K.** (2001) The Arabidopsis HOS1 gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a RING finger protein that displays cold-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning. *Genes Dev.* **15**:912-924.
- Lee, S., Choi, H., Suh, S., Doo, I.S., Oh, K.Y., Choi, E.J., Schroeder Taylor, A.T., Low, P.S., and Lee, Y.** (1999) Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. *Plant Physiol* **121**:147-152.
- Lee, Y.H. and Chun, J.Y.** (1998) A new homeodomain-leucine zipper gene from Arabidopsis thaliana induced by water stress and abscisic acid treatment. *Plant Mol. Biol.* **37**:377-384.
- Lekstrom-Himes, J. and Xanthopoulos, K.G.** (1998) Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J. Biol. Chem.* **273**:28545-28548.
- Lemichez, E., Wu, Y., Sanchez, J.P., Mettouchi, A., Mathur, J., and Chua, N.H.** (2001) Inactivation of AtRac1 by abscisic acid is essential for stomatal closure. *Genes Dev.* **15**:1808-1816.
- LeNoble, M.E., Spollen, W.G., and Sharp, R.E.** (2004) Maintenance of shoot growth by endogenous ABA: genetic assessment of the involvement of ethylene suppression. *J. Exp. Bot.* **55**:237-245.
- Leon, P. and Sheen, J.** (2003) Sugar and hormone connections. *Trends Plant Sci.* **8**:110-116.
- Leon-Kloosterziel, K.M., Gil, M.A., Ruijs, G.J., Jacobsen, S.E., Olszewski, N.E., Schwartz, S.H., Zeevaert, J.A., and Koornneef, M.** (1996) Isolation and characterization of abscisic acid-deficient Arabidopsis mutants at two new loci. *Plant J.* **10**:655-661.
- Leonhardt, N., Kwak, J.M., Robert, N., Waner, D., Leonhardt, G., and Schroeder, J.I.** (2004) Microarray expression analyses of Arabidopsis guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. *Plant Cell* **16**:596-615.
- Leung, J., Bouvier-Durand, M., Morris, P.C., Guerrier, D., Chedford, F., and Giraudat, J.** (1994) Arabidopsis ABA response gene ABI1: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* **264**:1448-1452.
- Leung, J. and Giraudat, J.** (1998) Abscisic Acid Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* **49**:199-222.
- Leung, J., Merlot, S., and Giraudat, J.** (1997) The Arabidopsis ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (ABI2) and ABI1 genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell* **9**:759-771.
- Li, J., Kinoshita, T., Pandey, S., Ng, C.K., Gygi, S.P., Shimazaki, K., and Assmann, S.M.** (2002) Modulation of an RNA-binding protein by abscisic-acid-activated protein kinase. *Nature* **418**:793-797.
- Li, J., Nam, K.H., Vafeados, D., and Chory, J.** (2001) BIN2, a new brassinosteroid-insensitive locus in Arabidopsis. *Plant Physiol* **127**:14-22.
- Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C.S., and Zhu, J.K.** (2000) The Arabidopsis thaliana SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **97**:3730-3734.
- Llorente, F., Oliveros, J.C., Martinez-Zapater, J.M., and Salinas, J.** (2000) A freezing-sensitive mutant of Arabidopsis, frs1, is a new aba3 allele. *Planta* **211**:648-655.
- Lopez-Molina, L. and Chua, N.H.** (2000) A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **41**:541-547.

- Lopez-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.U.S.A* **98**:4782-4787.
- Lopez-Molina,L., Mongrand,S., Kinoshita,N., and Chua,N.H.** (2003) AFP is a novel negative regulator of ABA signaling that promotes ABI5 protein degradation. *Genes Dev.* **17**:410-418.
- Lotan,T., Ohto,M., Yee,K.M., West,M.A., Lo,R., Kwong,R.W., Yamagishi,K., Fischer,R.L., Goldberg,R.B., and Harada,J.J.** (1998) Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* **93**:1195-1205.
- Lovegrove,A. and Hooley,R.** (2000) Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. *Trends Plant Sci.* **5**:102-110.
- Lu,C. and Fedoroff,N.** (2000) A mutation in the Arabidopsis HYL1 gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin, and cytokinin. *Plant Cell* **12**:2351-2366.
- Lu,C., Han,M.H., Guevara-Garcia,A., and Fedoroff,N.V.** (2002) Mitogen-activated protein kinase signaling in postgermination arrest of development by abscisic acid. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**:15812-15817.
- Luerssen,H., Kirik,V., Herrmann,P., and Misera,S.** (1998) FUSCA3 encodes a protein with a conserved VP1/ABI3-like B3 domain which is of functional importance for the regulation of seed maturation in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **15**:755-764.
- MacRobbie,E.A.** (2000) ABA activates multiple Ca²⁺ fluxes in stomatal guard cells, triggering vacuolar K⁽⁺⁾(Rb⁽⁺⁾) release. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**:12361-12368.
- Marin,E., Nussaume,L., Quesada,A., Gonneau,M., Sotta,B., Hugueney,P., Frey,A., and Marion-Poll,A.** (1996) Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of Arabidopsis thaliana. *EMBO J.* **15**:2331-2342.
- Martinez-Zapater,J.M.** (1994) The transition to flowering in Arabidopsis. In Arabidopsis, E.M.Meyerowitz and C.R.Somerville, eds (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 403-433.
- Maser,P., Leonhardt,N., and Schroeder,J.I.** (2003) The Clickable Guard Cell: Electronically Linked Model of Guard Cell Signal Transduction Pathways. *The Arabidopsis Book*:1-4.
- McKinney,E.C., Ali,N., Traut,A., Feldmann,K.A., Belostotsky,D.A., McDowell,J.M., and Meagher,R.B.** (1995) Sequence-based identification of T-DNA insertion mutations in Arabidopsis: actin mutants act2-1 and act4-1. *Plant J.* **8**:613-622.
- Meinhard,M., Rodriguez,P.L., and Grill,E.** (2002) The sensitivity of ABI2 to hydrogen peroxide links the abscisic acid-response regulator to redox signalling. *Planta* **214**:775-782.
- Meinke,D.W., Franzmann,L.H., Nickle,T.C., and Yeung,E.C.** (1994) Leafy Cotyledon Mutants of Arabidopsis. *Plant Cell* **6**:1049-1064.
- Mendel,R.R. and Hansch,R.** (2002) Molybdoenzymes and molybdenum cofactor in plants. *J.Exp.Bot.* **53**:1689-1698.
- Merlot,S. and Giraudat,J.** (1997) Genetic analysis of abscisic acid signal transduction. *Plant Physiol* **114**:751-757.
- 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.
- Merlot,S., Mustilli,A.C., Genty,B., North,H., Lefebvre,V., Sotta,B., Vavasseur,A., and Giraudat,J.** (2002) Use of infrared thermal imaging to isolate Arabidopsis mutants defective in stomatal regulation. *Plant J.* **30**:601-609.
- 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.
- Milborrow,B.V.** (2001) The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *J.Exp.Bot.* **52**:1145-1164.

- Milborrow,B.V. and Lee,S.H.** (1998) Endogenous biosynthetic precursors of (+)abscisic acid. VI. Carotenoids and ABA are formed by the non-mevalonate triose-pyruvate pathway in chloroplasts. *Australian Journal of Plant Physiology* **25**:507-512.
- Murray,M.G. and Thompson,W.F.** (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* **8**:4321-4325.
- Mustilli,A.C., Merlot,S., Vavasseur,A., Fenzi,F., and Giraudat,J.** (2002) Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* **14**:3089-3099.
- Nakamura,S., Lynch,T.J., and Finkelstein,R.R.** (2001) Physical interactions between ABA response loci of Arabidopsis. *Plant J.* **26**:627-635.
- 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.
- Narusaka,Y., Nakashima,K., Shinwari,Z.K., Sakuma,Y., Furihata,T., Abe,H., Narusaka,M., Shinozaki,K., and Yamaguchi-Shinozaki,K.** (2003) Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of Arabidopsis rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *Plant J.* **34**:137-148.
- Neill,S.J., Desikan,R., Clarke,A., Hurst,R.D., and Hancock,J.T.** (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J.Exp.Bot.* **53**:1237-1247.
- Ng,C.K., Carr,K., McAinsh,M.R., Powell,B., and Hetherington,A.M.** (2001) Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature* **410**:596-599.
- Niyogi,K.K.** (1999) PHOTOPROTECTION REVISITED: Genetic and Molecular Approaches. *Annu.Rev.Plant Physiol Plant Mol.Biol.* **50**:333-359.
- Niyogi,K.K., Bjorkman,O., and Grossman,A.R.** (1997) The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**:14162-14167.
- 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. *Plant Cell* **10**:1121-1134.
- Ohta,M., Guo,Y., Halfter,U., and Zhu,J.K.** (2003) A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C ABI2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**:11771-11776.
- Okamoto,M., Min,X., Seo,M., Nakabayashi,K., Kamiya,Y., Nambara,E., and Koshiba,T.** (2002) Complementation of a tomato ABA-deficient *sitiens* mutant by an Arabidopsis aldehyde oxidase gene, *AAO3*. *Plant Cell Physiol* **43**:S42.
- Pandey,S. and Assmann,S.M.** (2004) The Arabidopsis putative G protein-coupled receptor GCR1 interacts with the G protein alpha subunit GPA1 and regulates abscisic acid signaling. *Plant Cell* **16**:1616-1632.
- 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. *Plant Cell* **9**:1265-1277.
- Parker,R.E.** (1981) *Estadistica para Biologos*. Barcelona: Omega SA.
- Pedron,J., Brault,M., Nake,C., and Miginiac,E.** (1998) Detection of abscisic-acid-binding proteins in the microsomal protein fraction of Arabidopsis thaliana with abscisic-acid-protein conjugates used as affinity probes. *Eur.J.Biochem.* **252**:385-390.
- 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.
- Persson,B., Krook,M., and Jornvall,H.** (1991) Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes. *Eur.J.Biochem.* **200**:537-543.
- Qin,X. and Zeevaart,J.A.** (1999) The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**:15354-15361.

- Qin,X. and Zeevaart,J.A.** (2002) Overexpression of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana glauca* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance. *Plant Physiol* **128**:544-551.
- Quesada,V., Garcia-Martinez,S., Piqueras,P., Ponce,M.R., and Micol,J.L.** (2002) Genetic architecture of NaCl tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **130**:951-963.
- Quesada,V., Ponce,M.R., and Micol,J.L.** (2000) Genetic analysis of salt-tolerant mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **154**:421-436.
- Quintero,F.J., Garcíadeblas,B., and Rodríguez-Navarro,A.** (1996) The SAL1 gene of *Arabidopsis*, encoding an enzyme with 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase and inositol polyphosphate 1-phosphatase activities, increases salt tolerance in yeast. *Plant Cell* **8**:529-537.
- Raskin,I. and Ladyman,J.A.R.** (1988) Isolation and characterization of a barley mutant with abscisic-acid insensitive stomata. *Planta* **173**:73-78.
- Raz,V., Bergervoet,J.H., and Koornneef,M.** (2001) Sequential steps for developmental arrest in *Arabidopsis* seeds. *Development* **128**:243-252.
- Riechmann,J.L. and Ratcliffe,O.J.** (2000) A genomic perspective on plant transcription factors. *Curr.Opin.Plant Biol.* **3**:423-434.
- Ritchie,S. and Gilroy,S.** (1998) Abscisic acid signal transduction in the barley aleurone is mediated by phospholipase D activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**:2697-2702.
- Ritchie,S. and Gilroy,S.** (2000) Abscisic acid stimulation of phospholipase D in the barley aleurone is G-protein-mediated and localized to the plasma membrane. *Plant Physiol* **124**:693-702.
- Ritchie,S.M., Swanson,S.J., and Gilroy,S.** (2002) From common signalling components to cell specific responses: insights from the cereal aleurone. *Physiol Plant* **115**:342-351.
- Rock, C. D.** Pathways to abscisic acid-regulated gene expression . *New Phytologist* **148**[3], 357-396. 2000.
- Rock,C.D. and Zeevaart,J.A.** (1990) Abscisic (ABA)-aldehyde is a precursor to, and 1_,4_-trans-ABA-diol, a catabolite of ABA in apple. *Plant Physiology* **93**:923.
- Rock,C.D. and Zeevaart,J.A.** (1991) The *aba* mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**:7496-7499.
- Rock,C.D. and Zeevaart,J.A.** (1993) Ácido Abscísico. In *Fisiología y Bioquímica Vegetal*, J.Azcon-Bieto and M.Talon, eds Interamericana McGraw-Hill, pp. 327-342.
- Rodríguez,P.L.** (1998) Protein phosphatase 2C (PP2C) function in higher plants. *Plant Mol.Biol.* **38**:919-927.
- Rodríguez,P.L., Leube,M.P., and Grill,E.** (1998) Molecular cloning in *Arabidopsis thaliana* of a new protein phosphatase 2C (PP2C) with homology to ABI1 and ABI2. *Plant Mol.Biol.* **38**:879-883.
- Rodríguez-Concepcion,M. and Boronat,A.** (2002) Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol* **130**:1079-1089.
- Rohmer,M.** (1999) The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat.Prod.Rep.* **16**:565-574.
- 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.
- Rossmann,M.G. and Argos,P.** (1978) The taxonomy of binding sites in proteins. *Mol.Cell Biochem.* **21**:161-182.
- Ruggiero,B., Koiwa,H., Manabe,Y., Quist,T.M., Inan,G., Saccardo,F., Joly,R.J., Hasegawa,P.M., Bressan,R.A., and Maggio,A.** (2004) Uncoupling the effects of abscisic acid on plant growth and water relations. Analysis of *stol/nced3*, an abscisic acid-deficient but salt stress-tolerant mutant in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **136**:3134-3147.

- Saez,A., Apostolova,N., Gonzalez-Guzman,M., Gonzalez-Garcia,M.P., Nicolas,C., Lorenzo,O., and Rodriguez,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.
- Sagi,M., Scazzocchio,C., and Fluhr,R.** (2002) The absence of molybdenum cofactor sulfuration is the primary cause of the flacca phenotype in tomato plants. *Plant J.* **31**:305-317.
- Saito,S., Hirai,N., Matsumoto,C., Ohigashi,H., Ohta,D., Sakata,K., and Mizutani,M.** (2004) Arabidopsis CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant Physiol* **134**:1439-1449.
- Sambrook,J. and Russell,D.** (2000) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez,J.P. and Chua,N.H.** (2001) Arabidopsis PLC1 is required for secondary responses to abscisic acid signals. *Plant Cell* **13**:1143-1154.
- Sang,Y., Zheng,S., Li,W., Huang,B., and Wang,X.** (2001) Regulation of plant water loss by manipulating the expression of phospholipase Dalpha. *Plant J.* **28**:135-144.
- Schroeder,J.I., Allen,G.J., Hugouvieux,V., Kwak,J.M., and Waner,D.** (2001) Guard Cell Signal Transduction. *Annu.Rev.Plant Physiol Plant Mol.Biol.* **52**:627-658.
- Schwartz,A., Wu,W.H., Tucker,E.B., and Assmann,S.M.** (1994) Inhibition of inward K⁺ channels and stomatal response by abscisic acid: an intracellular locus of phytohormone action. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**:4019-4023.
- Schwartz,S.H., Leon-Kloosterziel,K.M., Koornneef,M., and Zeevaart,J.A.** (1997a) Biochemical characterization of the *aba2* and *aba3* mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **114**:161-166.
- Schwartz,S.H., Qin,X., and Zeevaart,J.A.** (2003a) Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes. *Plant Physiol* **131**:1591-1601.
- Schwartz,S.H., Tan,B.C., Gage,D.A., Zeevaart,J.A., and McCarty,D.R.** (1997b) Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* **276**:1872-1874.
- Schwartz,S.H., Tan,B.C., McCarty,D.R., Welch,W., and Zeevaart,J.A.** (2003b) Substrate specificity and kinetics for VP14, a carotenoid cleavage dioxygenase in the ABA biosynthetic pathway. *Biochim.Biophys.Acta* **1619**:9-14.
- Seki,M., Narusaka,M., Ishida,J., Nanjo,T., Fujita,M., Oono,Y., Kamiya,A., Nakajima,M., Enju,A., Sakurai,T., Satou,M., Akiyama,K., Taji,T., Yamaguchi-Shinozaki,K., Carninci,P., Kawai,J., Hayashizaki,Y., and Shinozaki,K.** (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J.* **31**:279-292.
- Sekimoto,H., Seo,M., Kawakami,N., Komano,T., Desloire,S., Liotenberg,S., Marion-Poll,A., Caboche,M., Kamiya,Y., and Koshiba,T.** (1998) Molecular cloning and characterization of aldehyde oxidases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **39**:433-442.
- Seo,M., Koiwai,H., Akaba,S., Komano,T., Oritani,T., Kamiya,Y., and Koshiba,T.** (2000a) Abscisic aldehyde oxidase in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **23**:481-488.
- Seo,M. and Koshiba,T.** (2002) Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci.* **7**:41-48.
- Seo,M., Peeters,A.J., Koiwai,H., Oritani,T., Marion-Poll,A., Zeevaart,J.A., Koornneef,M., Kamiya,Y., and Koshiba,T.** (2000b) The Arabidopsis aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**:12908-12913.
- Sharp,R.E. and LeNoble,M.E.** (2002) ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *J.Exp.Bot.* **53**:33-37.
- Shi,H., Quintero,F.J., Pardo,J.M., and Zhu,J.K.** (2002) The putative plasma membrane Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ antiporter SOS1 controls long-distance Na⁽⁺⁾ transport in plants. *Plant Cell* **14**:465-477.

- Shinozaki,K. and Yamaguchi-Shinozaki,K.** (1997) Gene Expression and Signal Transduction in Water-Stress Response. *Plant Physiol* **115**:327-334.
- Shinozaki,K. and Yamaguchi-Shinozaki,K.** (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr.Opin.Plant Biol.* **3**:217-223.
- Shinozaki,K., Yamaguchi-Shinozaki,K., and Seki,M.** (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr.Opin.Plant Biol.* **6**:410-417.
- Sindhu,R.K., Griffin,D.H., and Walton,D.C.** (1990) Abscisic aldehyde is an intermediate in the enzymatic conversion of xanthoxin to abscisic acid in *Phaseolus vulgaris* L. leaves. *Plant Physiology* **93**:689-694.
- Sindhu,R.K. and Walton,D.C.** (1987) Conversion of xanthoxin to abscisic acid by cell-free preparations from bean leaves. *Plant Physiol* **85**:916-921.
- Sindhu,R.K. and Walton,D.C.** (1988) Xanthoxin metabolism in cell-free preparations from wild type and wilted mutants of tomato. *Plant Physiology* **88**:178-182.
- Smalle,J., Kurepa,J., Yang,P., Emborg,T.J., Babiychuk,E., Kushnir,S., and Vierstra,R.D.** (2003) The pleiotropic role of the 26S proteasome subunit RPN10 in Arabidopsis growth and development supports a substrate-specific function in abscisic acid signaling. *Plant Cell* **15**:965-980.
- Smeeckens,S.** (2000) Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu.Rev.Plant Physiol Plant Mol.Biol.* **51**:49-81.
- Soderman,E., Hjellstrom,M., Fahleson,J., and Engstrom,P.** (1999) The HD-Zip gene ATHB6 in Arabidopsis is expressed in developing leaves, roots and carpels and up-regulated by water deficit conditions. *Plant Mol.Biol.* **40**:1073-1083.
- Soderman,E., Mattsson,J., and Engstrom,P.** (1996) The Arabidopsis homeobox gene ATHB-7 is induced by water deficit and by abscisic acid. *Plant J.* **10**:375-381.
- 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.U.S.A* **89**:6837-6840.
- 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 Physiol* **125**:763-769.
- Stone,S.L., Kwong,L.W., Yee,K.M., Pelletier,J., Lepiniec,L., Fischer,R.L., Goldberg,R.B., and Harada,J.J.** (2001) LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**:11806-11811.
- Strand,A., Kvernberg,K., Karlsen,M., and Liaen-Jensen,S.** (2000) Geometrical E/Z isomers of (6R)- and (6S)-neoxanthin and biological implications. *Biochem.Syst.Ecol.* **28**:443-455.
- Studier,F.W.** (1991) Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J.Mol.Biol.* **219**:37-44.
- Suzuki,M., Kao,C.Y., Cocciolone,S., and McCarty,D.R.** (2001) Maize VP1 complements Arabidopsis abi3 and confers a novel ABA/auxin interaction in roots. *Plant J.* **28**:409-418.
- Suzuki,M., Kao,C.Y., and McCarty,D.R.** (1997) The conserved B3 domain of VIVIPAROUS1 has a cooperative DNA binding activity. *Plant Cell* **9**:799-807.
- Tan,B.C., Cline,K., and McCarty,D.R.** (2001) Localization and targeting of the VP14 epoxy-carotenoid dioxygenase to chloroplast membranes. *Plant J.* **27**:373-382.
- Tan,B.C., Joseph,L.M., Deng,W.T., Liu,L., Li,Q.B., Cline,K., and McCarty,D.R.** (2003) Molecular characterization of the Arabidopsis 9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase gene family. *Plant J.* **35**:44-56.
- Tan,B.C., Schwartz,S.H., Zeevaert,J.A., and McCarty,D.R.** (1997) Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**:12235-12240.

- Thompson,A.J., Jackson,A.C., Parker,R.A., Morpeth,D.R., Burbidge,A., and Taylor,I.B.** (2000a) Abscisic acid biosynthesis in tomato: regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase mRNAs by light/dark cycles, water stress and abscisic acid. *Plant Mol.Biol.* **42**:833-845.
- Thompson,A.J., Jackson,A.C., Symonds,R.C., Mulholland,B.J., Dadswell,A.R., Blake,P.S., Burbidge,A., and Taylor,I.B.** (2000b) Ectopic expression of a tomato 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene causes over-production of abscisic acid. *Plant J.* **23**:363-374.
- Ullah,H., Chen,J.G., Temple,B., Boyes,D.C., Alonso,J.M., Davis,K.R., Ecker,J.R., and Jones,A.M.** (2003) The beta-subunit of the Arabidopsis G protein negatively regulates auxin-induced cell division and affects multiple developmental processes. *Plant Cell* **15**:393-409.
- Ullah,H., Chen,J.G., Wang,S., and Jones,A.M.** (2002) Role of a heterotrimeric G protein in regulation of Arabidopsis seed germination. *Plant Physiol* **129**:897-907.
- 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.
- 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.U.S.A* **97**:11632-11637.
- Urao,T., Yamaguchi-Shinozaki,K., Urao,S., and Shinozaki,K.** (1993) An Arabidopsis myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell* **5**:1529-1539.
- Vartanian,N., Marcotte,L., and Giraudat,J.** (1994) Drought Rhizogenesis in Arabidopsis thaliana (Differential Responses of Hormonal Mutants). *Plant Physiol* **104**:761-767.
- Vaughan,G.T. and Milborrow,B.V.** (1988) The stability of the 1'-4'-diols of abscisic acid. *Phytochemistry*:339-343.
- Walker-Simmons,M.K., Holappa,L.D., Abrams,G.D., and Abrams,S.R.** (1997) ABA metabolites induce group 3 LEA mRNA and inhibit germination in wheat. *Physiologia Plantarum* **100**:474-480.
- Walker-Simmons,M.K., Rose,P.A., Hogge,L.R., and Abrams,S.R.** (2000) Abscisic acid. ABA immunoassay and gas chromatography/mass spectrometry verification. *Methods Mol.Biol.* **141**:33-47.
- Walton,D.C. and Li,Y.** (1995) Abscisic acid biosynthesis and metabolism. In *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, P.J.Davies, ed Kluwer Academic Publishers, pp. 140-157.
- 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,M., Heimivaara-Dijkstra,S., Van der Meulen,R.M., Knox,J.P., and Neill,S.J.** (1995) The monoclonal antibody JIM19 modulates abscisic acid action in barley aleurone protoplast. *Planta* **196**:271-276.
- Wang,X., Wang,C., Sang,Y., Zheng,L., and Qin,C.** (2000) Determining functions of multiple phospholipase Ds in stress response of Arabidopsis. *Biochem.Soc.Trans.* **28**:813-816.
- 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.
- Weigel,D., Ahn,J.H., Blazquez,M.A., Borevitz,J.O., Christensen,S.K., Fankhauser,C., Ferrandiz,C., Kardailsky,I., Malancharuvil,E.J., Neff,M.M., Nguyen,J.T., Sato,S., Wang,Z.Y., Xia,Y., Dixon,R.A., Harrison,M.J., Lamb,C.J., Yanofsky,M.F., and Chory,J.** (2000) Activation tagging in Arabidopsis. *Plant Physiol* **122**:1003-1013.
- West,M., Yee,K.M., Danao,J., Zimmerman,J.L., Fischer,R.L., Goldberg,R.B., and Harada,J.J.** (1994) LEAFY COTYLEDON1 Is an Essential Regulator of Late Embryogenesis and Cotyledon Identity in Arabidopsis. *Plant Cell* **6**:1731-1745.
- Wilson,A.K., Pickett,F.B., Turner,J.C., and Estelle,M.** (1990) A dominant mutation in Arabidopsis confers resistance to auxin, ethylene and abscisic acid. *Mol.Gen.Genet.* **222**:377-383.

- Xiong,L., Gong,Z., Rock,C.D., Subramanian,S., Guo,Y., Xu,W., Galbraith,D., and Zhu,J.K.** (2001a) Modulation of abscisic acid signal transduction and biosynthesis by an Sm-like protein in Arabidopsis. *Dev.Cell* **1**:771-781.
- Xiong,L., Ishitani,M., Lee,H., and Zhu,J.K.** (2001b) The Arabidopsis LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfuryase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *Plant Cell* **13**:2063-2083.
- Xiong,L., Ishitani,M., and Zhu,J.K.** (1999) Interaction of osmotic stress, temperature, and abscisic acid in the regulation of gene expression in Arabidopsis. *Plant Physiol* **119**:205-212.
- Xiong,L., Lee,B., Ishitani,M., Lee,H., Zhang,C., and Zhu,J.K.** (2001c) FIERY1 encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in Arabidopsis. *Genes Dev.* **15**:1971-1984.
- Xiong,L., Lee,H., Ishitani,M., and Zhu,J.K.** (2002a) Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the LOS6/ABA1 locus in Arabidopsis. *J.Biol.Chem.* **277**:8588-8596.
- Xiong,L., Schumaker,K.S., and Zhu,J.K.** (2002b) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* **14 Suppl**:S165-S183.
- Xiong,L. and Zhu,J.K.** (2001) Abiotic stress signal transduction in plants: Molecular and genetic perspectives. *Physiol Plant* **112**:152-166.
- Xiong,L. and Zhu,J.K.** (2003) Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiol* **133**:29-36.
- Xiong,L. and Zhu,J.K.** (2002) Salt Tolerance. *The Arabidopsis Book*:1-22.
- Yang,Z.** (2002) Small GTPases: versatile signaling switches in plants. *Plant Cell* **14 Suppl**:S375-S388.
- Yoshida,Y., Nanjo,T., Miura,S., Yamaguchi-Shinozaki,K., and Shinozaki,K.** (1999) Stress-responsive and developmental regulation of Delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase 1 (P5CS1) gene expression in Arabidopsis thaliana. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **261**:766-772.
- Zeevaart,J.A. and Creelman,R.A.** (1988) Metabolism and Physiology of Abscisic Acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **39**:439-473.
- Zhang,D.P., Chen,S.W., Peng,Y.B., and Shen,Y.Y.** (2001) Abscisic acid-specific binding sites in the flesh of developing apple fruit. *J.Exp.Bot.* **52**:2097-2103.
- Zhang,D.P., Wu,Z.Y., Li,X.Y., and Zhao,Z.X.** (2002) Purification and identification of a 42-kilodalton abscisic acid-specific-binding protein from epidermis of broad bean leaves. *Plant Physiol* **128**:714-725.
- Zhang,H., Huang,Z., Xie,B., Chen,Q., Tian,X., Zhang,X., Zhang,H., Lu,X., Huang,D., and Huang,R.** (2004) The ethylene-, jasmonate-, abscisic acid- and NaCl-responsive tomato transcription factor JERF1 modulates expression of GCC box-containing genes and salt tolerance in tobacco. *Planta* **220**:262-270.
- Zheng,Z.L., Nafisi,M., Tam,A., Li,H., Crowell,D.N., Chary,S.N., Schroeder,J.I., Shen,J., and Yang,Z.** (2002) Plasma membrane-associated ROP10 small GTPase is a specific negative regulator of abscisic acid responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**:2787-2797.
- 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 Physiol* **134**:361-369.
- Ziegelhoffer,E.C., Medrano,L.J., and Meyerowitz,E.M.** (2000) Cloning of the Arabidopsis WIGGUM gene identifies a role for farnesylation in meristem development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**:7633-7638.

Anejo: Artículos Publicados