



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y Celular de Plantas

La sobreexpresión del receptor de ABA PYL15m refuerza  
la tolerancia a sequía inducida por el agonista iSB09 en  
Nicotiana benthamiana.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de  
Plantas

AUTOR/A: Mora Rodríguez, María Reyes

Tutor/a: Bueso Ródenas, Eduardo

Director/a Experimental: Rodríguez Egea, Pedro Luís

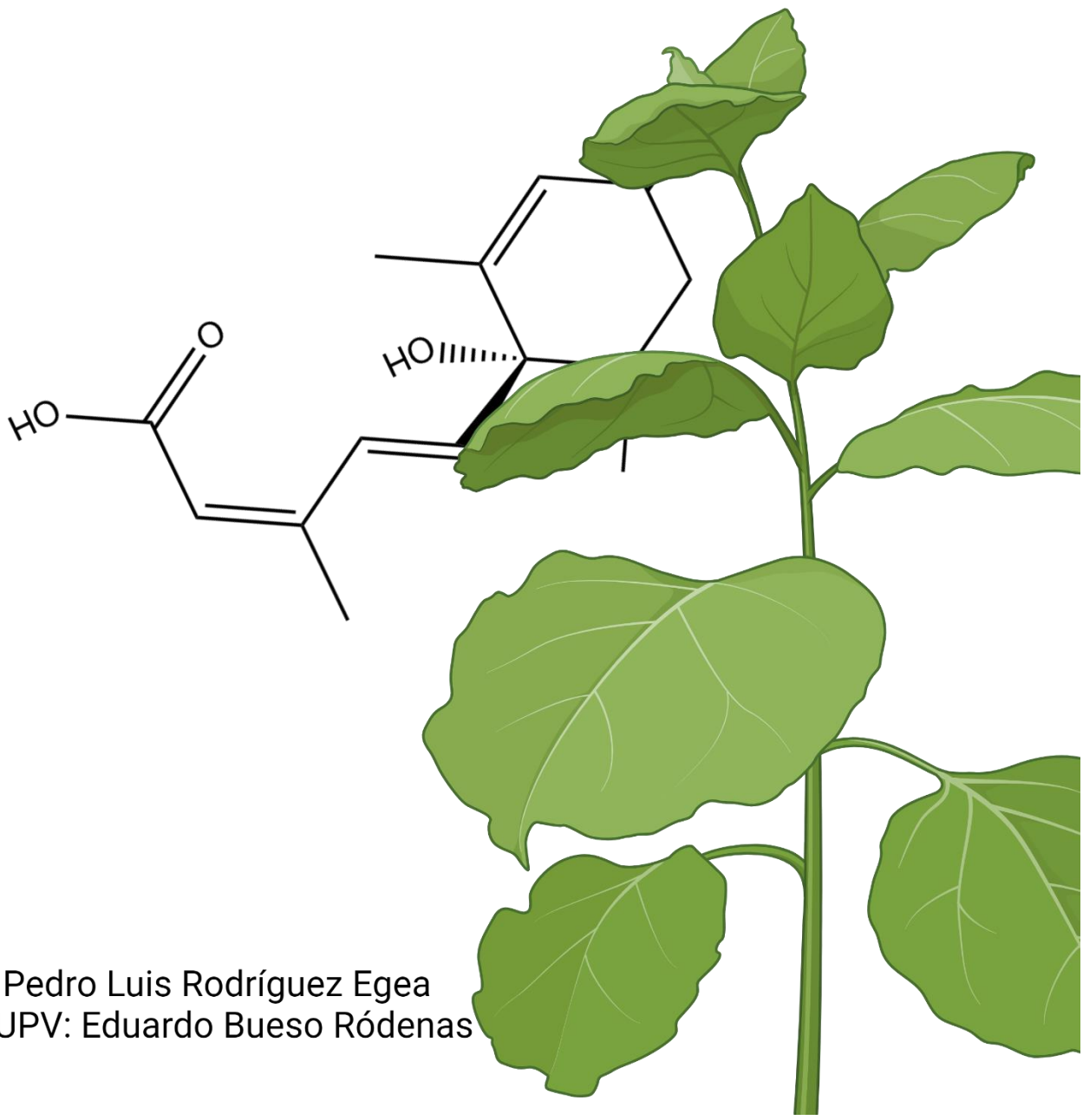
CURSO ACADÉMICO: 2024/2025

# La sobreexpresión del receptor de ABA $PYL1^{5m}$ refuerza la tolerancia a sequía inducida por el agonista iSB09 en *Nicotiana benthamiana*

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

Curso 2024-2025

María Reyes Mora Rodríguez



Tutor: Pedro Luis Rodríguez Egea  
Tutor UPV: Eduardo Bueso Ródenas

## Agradecimientos

Me gustaría agradecer a mi tutor, Pedro Rodríguez, por haberme acogido en el laboratorio y haberme mentorizado en todos los pasos de este TFM. Gracias por introducirme en el mundo del ABA.

Me gustaría agradecer también a mis compañeros del laboratorio 2.04 del IBMCP. Gracias a Alberto, Cony, Cris, Jonatan, Mar y May por los consejos, el apoyo y la ayuda.

Finalmente, gracias a los compañeros del laboratorio 0.07 por haberme ayudado en todo el proceso de transformación y cultivo *in vitro*.

## Resumen

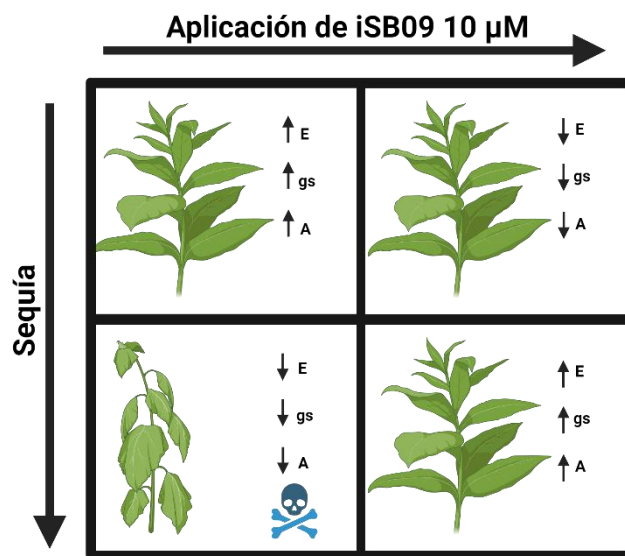
Los efectos del cambio climático y del calentamiento global se están agravando. La subida de las temperaturas y la sequía se han convertido en una gran limitación para la productividad de los cultivos. Para contrarrestar estos efectos, las plantas pueden protegerse contra el estrés abiótico, en particular frente a la sequía, mediante la acción de la hormona ácido abscísico (ABA). Esta coordina las respuestas adaptativas a la sequía para mejorar la supervivencia y la productividad de las plantas en situaciones de estrés hídrico.

La percepción del ABA se lleva a cabo por la familia de receptores PYR/PYL/RCAR y la subfamilia de fosfatasa tipo 2C (PP2C). La modulación de la señalización del ABA mediante agonistas de los receptores es una estrategia prometedora en la biotecnología de plantas para mitigar el impacto de la sequía en los cultivos. Por ello se ha avanzado en el desarrollo de compuestos químicos que imitan la acción del ABA, así como en enfoques genéticos encaminados a reforzar la respuesta de la planta, por ejemplo, mediante la sobreexpresión de los receptores del ABA o la inactivación de las PP2Cs.

Este estudio se centra en la sobreexpresión del receptor PYL1<sup>5m</sup> de ABA en *Nicotiana benthamiana*, y su combinación con moléculas agonistas, como iSB09, con el objetivo final de mejorar la eficiencia del uso del agua en la agricultura. Este receptor, además de aumentar la dosis de proteína receptora de ligando, fue customizado para reforzar el reconocimiento del agonista. Diferentes parámetros fisiológicos fueron medidos para comprender cómo responde la planta cuando se ha reforzado mediante esta técnica.

El análisis de la respuesta en este abordaje genético-químico contribuye al conocimiento fundamental de las respuestas de las plantas al estrés hídrico, y también sirve como prueba de concepto para el traslado de esta estrategia a plantas de cosecha. Como fin último, se busca a través de la biotecnología de plantas contribuir al desarrollo de cultivos más resilientes en un contexto de cambio climático y garantizar la seguridad alimentaria global.

## Resumen gráfico



Palabras clave: PYLI<sup>5m</sup>; *Nicotiana benthamiana*; Receptores; Sequía; PYR/PYL/RCAR; Cambio climático; Estrés abiótico.

## Abstract

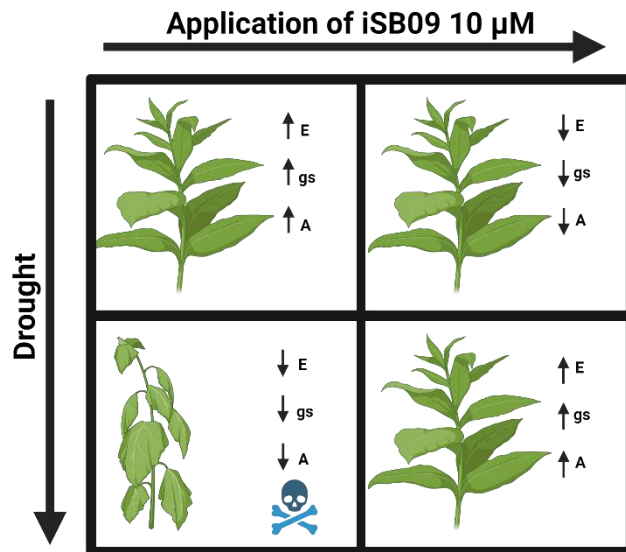
The effects of climate change and global warming are worsening. Rising temperatures and drought have become a major constraint to crop productivity. To counteract these effects, plants can protect themselves against abiotic stress, particularly drought, through the action of the hormone abscisic acid (ABA), which coordinates adaptive responses to drought to improve plant survival and productivity under water stress.

ABA is sensed by the PYR/PYL/RCAR family of receptors and the 2C-type phosphatase subfamily (PP2C). Modulation of ABA signaling by receptor agonists is a promising strategy in plant biotechnology to mitigate the impact of drought on crops. Therefore, progress has been made in developing chemical compounds that mimic the action of ABA, as well as genetic approaches aimed at enhancing the plant response, e.g. by overexpressing ABA receptors or inactivating PP2Cs.

This study focuses on the overexpression of the ABA receptor PYLI<sup>5m</sup> in *Nicotiana benthamiana*, and its combination with agonist molecules, such as iSB09, to improve agricultural water use efficiency. This receptor, in addition to increasing the dose of ligand-receptor protein, was customized to enhance agonist recognition. Different physiological parameters were measured to understand how the plant responds when enhanced by this approach.

The analysis of the response in this chemical-genetic approach contributes to the fundamental understanding of plant responses to water stress and also serves as a proof of concept for transferring this strategy to crop plants. Ultimately, the aim is to use plant biotechnology to contribute to developing more resilient crops in the context of climate change and to ensure global food security.

## Graphical abstract



Keywords: PYLI<sup>5m</sup>; *Nicotiana benthamiana*; Receptors; Drought; PYR/PYL/RCAR; Climate change; Abiotic stress.

Contenido	
Agradecimientos .....	2
Resumen .....	3
Resumen gráfico .....	4
Abstract .....	5
Graphical abstract .....	6
Índice de figuras.....	9
Abreviaturas.....	11
1. Introducción .....	12
Biosíntesis del ácido abscísico .....	13
Señalización del ácido abscísico .....	15
1.    PYR/PYL/RCAR.....	16
2.    Fosfatasa PP2C .....	17
3.    Quinasas SnRK2.....	17
Agonistas de los receptores PYR/PYL.....	18
CsPYLI <sup>5m</sup> .....	20
<i>Nicotiana benthamiana</i> .....	21
Objetivos.....	22
Implicaciones del estudio.....	23
2. Materiales y métodos .....	23
Material Vegetal.....	23
Generación de plantas transgénicas.....	24
Cultivo <i>in vitro</i> .....	24
Verificación de la transformación estable.....	26
Análisis de la ploidía .....	26
Western blot.....	26
Experimentos con agonistas de ABA.....	27
Ensayos de germinación dosis-respuesta.....	27
Experimentos con riego.....	27
Experimentos en sequía .....	28
Búsqueda de nuevos compuestos.....	29
Análisis estadístico .....	30
3. Resultados.....	31



Transformación.....	31
Ensayos de germinación dosis-respuesta .....	32
Experimentos de pulverización con agonistas .....	33
Búsqueda de nuevos compuestos.....	40
4. Discusión.....	40
5. Conclusiones .....	43
Bibliografía .....	45

## Índice de figuras

Fig. 1 **Algunas de las funciones del ABA durante el ciclo de vida de una planta.** Esta hormona regula múltiples aspectos fisiológicos y de desarrollo, permitiendo a las plantas adaptarse a diversas condiciones ambientales y de estrés a lo largo de su ciclo vital. Figura realizada con Biorender. \_\_\_\_\_ 13

Fig. 2 **Resumen de los principales pasos de las rutas de biosíntesis, hidroxilación y conjugación del ABA.** Figura adaptada de Seo y Marion-Poll (2019). \_\_\_\_\_ 14

Fig. 3 **Representación esquemática de la ruta de señalización del ABA.** A) En ausencia de ABA. B) En presencia de ABA. PYR/PYL/RCAR: PYRABACTIN RESISTANCE 1 / PYR1-LIKE/ REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTORS, PP2C: Proteína Fosfatasa tipo 2C (regulador negativo), SnRK2: SNF1-Related Protein Kinase 2 (regulador positivo), ABF/AREB: factor/proteína de unión a elementos sensibles al ABA, B2/B3 RAFs: Subfamilias B2, B3 y B4 de quinazas Raf-like, A: ABA, P: fosforilación. \_\_\_\_\_ 15

Fig. 4 **Cladograma de la familia PYR/PYL/RCAR en *A. thaliana*, arroz y *Brachipodium*.** Figura elaborada por Rodríguez et al., (2019). \_\_\_\_\_ 16

Fig. 5 **Agonistas de los receptores de ABA.** Estructuras de las moléculas pirobactina, quinabactina, opabactina, AMF4, iSB07 e iSB09. \_\_\_\_\_ 19

Fig. 6 **Representación esquemática de las interacciones de iSB09 en el bolsillo del complejo CsPYL<sup>5m</sup>-ligando-AtHABI** (Figura elaborada por Lozano-Juste et al. (2023b)). \_\_\_\_\_ 21

Fig. 7 **Construcción usada para el trabajo pKAN-Alligator2-35S:HACsPYL<sup>5m</sup>.** \_\_\_\_\_ 24

Fig. 8 **Protocolo esquematizado de generación de plantas transgénicas de *N. benthamiana*.** 1. Generación de los explantes de hoja. 2. Co-cultivo de los explantes con el cultivo de *A. tumefaciens*. 3 y 4. Paso de los explantes a medio MB2 y posteriormente IKZ para la generación de callo indiferenciado. 5. Individuación de los ápices y enraizamiento. 6. Aclimatación. Figura realizada con Biorender. \_\_\_\_\_ 25

Fig. 9 **Diseño experimental para el estudio de los efectos de iSB09 y ABA en la fisiología foliar de plantas.** El esquema ilustra la aplicación foliar de tres tratamientos: DMSO (control o mock), iSB09 (10  $\mu$ M) y ABA (100  $\mu$ M) a plantas individuales. Se realizaron mediciones de parámetros fisiológicos foliares a las 0, 3, 24, 48, 72 y 96 horas post-tratamiento utilizando un analizador de intercambio gaseoso y una cámara térmica. \_\_\_\_\_ 28

Fig. 10 **Obtención de la línea de sobreexpresión de *N. benthamiana* 5M.** a) Callos transformados arriba y no transformados abajo crecidos en placas de kanamicina. Incubados con *Agrobacterium tumefaciens* pKAN-Alligator:CsPYL<sup>5m</sup>. b) Brotes resistentes a KAN. c) Análisis Western blot con anticuerpo anti-HA que muestra la expresión de 3HA-CsPYL<sup>5m</sup>. Debajo se muestra la tinción Ponceau, usado como control de carga. d) Elongación de ápices resistentes a KAN. e) Plantas enraizadas preparadas para la aclimatación en suelo. f) Plantas TG1 que expresan la proteína en suelo (a la izquierda, plantas 5M y a la derecha, plantas WT). g) Selección de semillas TG3 resistentes a kanamicina en placa MS+kan. Las semillas pertenecen a dos plantas de dos líneas independiente de la TG2. La escala mide 3 cm. \_\_\_\_\_ 32

Fig. 11 **Inhibición de la germinación de ABA e iSB09.** Germinación a los 7 días. Arriba se observan las semillas tratadas con ABA y abajo con iSB09. \_\_\_\_\_ 33

Fig. 12 **La aplicación foliar de iSB09 y ABA mediante pulverización reduce la pérdida de agua.** Conductancia estomática (Gs) y transpiración (E) tras la aplicación de los tratamientos a 24, 48 y 96 h. Los asteriscos indican significancia estadística (ns p-valor > 0.05; \* p-valor  $\leq$  0.05; \*\* p-valor  $\leq$  0.01; \*\*\* p-valor  $\leq$  0.001; \*\*\*\* p-valor  $\leq$  0.0001) en la prueba post-hoc de Dunnett de comparaciones múltiples en comparación al control WT. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar (Standard Error of the Mean; SEM). \_\_\_\_\_ 34

**Fig. 13 Análisis de Componentes Principales (PCA) de la respuesta de plantas 5M y WT a ABA e iSB09.** Se muestran las dos componentes principales (PC1 y PC2) a las 72 horas post-tratamiento. Los puntos representan muestras individuales, coloreados según el tratamiento (ABA en amarillo, iSB09 en rojo, y control (mock) en verde) y con formas distintas para cada genotipo (5M como triángulos y WT como círculos). Las elipses engloban el 95% de confianza para cada grupo de tratamiento-genotipo. \_\_\_\_\_35

**Fig. 14 Dinámica temporal de la transpiración en genotipos WT y 5M bajo diferentes tratamientos.** Se muestran los valores ajustados de transpiración para las plantas WT y 5M en respuesta a tres tratamientos: control (mock), iSB09 y ABA. Las mediciones se realizaron a intervalos específicos durante 96 horas después del tratamiento. Las líneas representan la tendencia de los valores ajustados de transpiración a lo largo del tiempo para cada combinación de genotipo y tratamiento. \_\_\_\_\_36

**Fig. 15 Temperatura foliar cuantificada con cámara de infrarrojos FLIR.** a) Termografía de plantas de dos semanas tras la aplicación los tratamientos a 0, 3, 24, 48, 72 y 96 h. b) Diferencia de temperatura de plantas 5M y WT control a cada hora (con riego). Los asteriscos indican significancia estadística (ns p-valor > 0.05; \* p-valor ≤ 0.05; \*\* p-valor ≤ 0.01; \*\*\* p-valor ≤ 0.001; \*\*\*\* p-valor ≤ 0.0001) en el test post-hoc de Dunnet en comparación a las plantas 5M control a cada hora. \_\_\_\_\_37

**Fig. 16 Los parámetros fisiológicos se mantienen en sequía en plantas tratadas con iSB09 10 μM y ABA 100 μM.** a) Las tasas fotosintéticas de las plantas 5M tratadas con iSB09 y ABA se mantienen tras 12 días sin riego. b) Porcentaje de humedad en el suelo tras 6 días sin riego. c) Las plantas 5M siguen transpirando a niveles basales tras 12 días sin riego. d) Transpiración después del riego tras 15 días de sequía. Los asteriscos indican significancia estadística (ns p-valor > 0.05; \* p-valor ≤ 0.05; \*\* p-valor ≤ 0.01; \*\*\* p-valor ≤ 0.001; \*\*\*\* p-valor ≤ 0.0001) en el test post-hoc de Dunnet de comparaciones múltiples en comparación al WT (a, c y d) y el test post-hoc de Sidak en comparación al WT (b). Los valores representan la media ± SEM. \_\_\_\_\_38

**Fig. 17 La aplicación foliar de iSB09 mediante pulverización mejora la resistencia a sequía.** Plantas de dos semanas después de 6 (a), 7 (b), 12 (c) y 15 (d) días sin agua. e) Recuperación de las plantas tras el riego después de 15 días de sequía. \_\_\_\_\_39

**Fig. 18 Los compuestos 1 y 2 activan la señalización de ABA.** a) Imagen del ensayo de actividad luciferasa con *A. thaliana* y los compuestos a distintas concentraciones (Imagen elaborada por la Dra Constanza Vasquez y el Dr Alberto Coego). b) Resultados de la RT-qPCR revelan activación transcripcional de genes de respuesta a ABA. Los asteriscos indican significancia estadística (ns p-valor > 0.05; \* p-valor ≤ 0.05; \*\* p-valor ≤ 0.01; \*\*\* p-valor ≤ 0.001; \*\*\*\* p-valor ≤ 0.0001) en el test post-hoc de Dunnet en comparación al control. \_40

## Abreviaturas

5M	Plantas sobreexpresoras de <i>CsPYLI</i> <sup>5M</sup>
A	Tasa fotosintética
ABA	Ácido abscísico
As	Acetosiringona
Col0	Ecotipo Columbia de <i>Arabidopsis thaliana</i>
Cs	<i>Citrus × sinensis</i>
CTX	Cefotaxima
E	Transpiración
GFP	<i>Green Flourescent Protein</i>
Gs	Conductancia estomática
Kan	Kanamicina
MB2	Medio Básico con 20 g/L de sacarosa
MB3	Medio Básico con 30 g/L de sacarosa
MG	Medio de Germinación
Nb	<i>Nicotiana benthamiana</i>
PCA	Análisis de Componentes Principales
PYRI	Pyrabactin Resistance I
PYL	PYRI-like
RCAR	Regulatory Components of ABA Receptors
SB	Sulfobactina
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> (Error estándar de la media)
SnRK2	Kinasas 2 relacionadas con SNF-I
Ti	Timentina
T1	Primera generación de plantas transformadas
T2	Segunda generación de plantas transformadas
T3	Tercera generación de plantas transformadas
WT	Wild-Type (Genotipo silvestre)

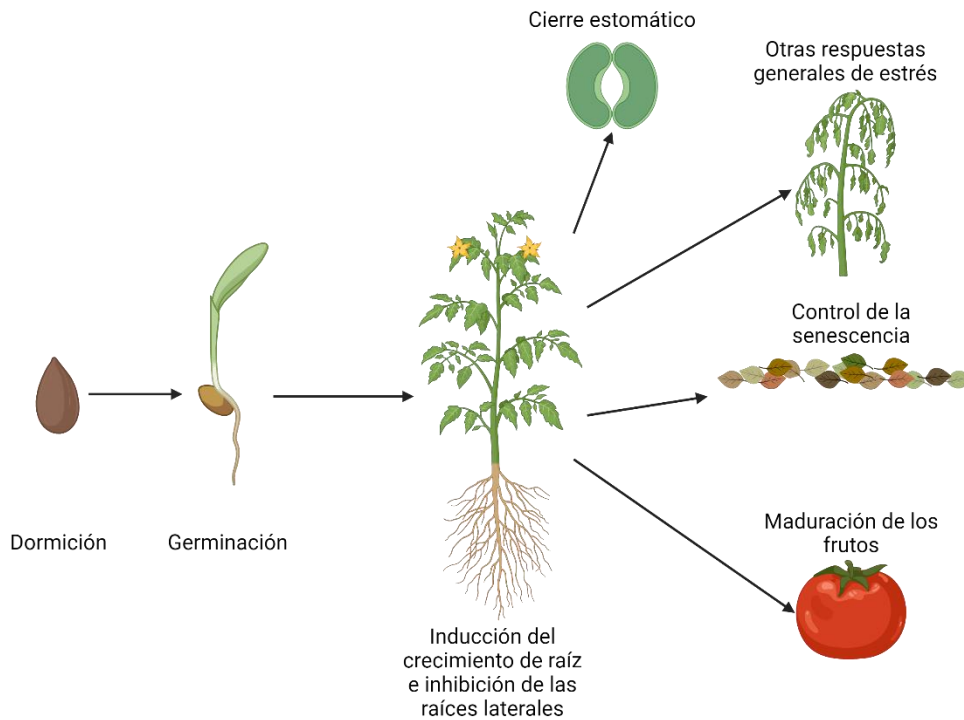
## I. Introducción

Efectos del cambio climático, como el calentamiento global, están exacerbando los desafíos ambientales a los que se enfrentan los cultivos agrícolas. El aumento de las temperaturas y la creciente frecuencia de sequías se han convertido en limitaciones críticas para la productividad agrícola. En España, por ejemplo, se estima que el sector agrícola consume hasta el 80% de los recursos hídricos disponibles (Montoya et al., 2016), lo que señala la urgente necesidad de mejorar la eficiencia en el uso del agua en este sector.

Las plantas vasculares, como organismos sésiles, han desarrollado una notable plasticidad para adaptarse a diversos retos ambientales, incluyendo patógenos y diversos tipos de estreses abióticos como sequía, frío, salinidad, calor, metales pesados, radiación ultravioleta e inundaciones. Entre estos, la sequía causa una grave reducción en la productividad agrícola y activa diferentes rutas de señalización en la planta para favorecer su adaptación al déficit hídrico. Una respuesta central de la planta es el aumento de los niveles de la fitohormona ácido abscísico (ABA), que coordina la respuesta adaptativa mediante la regulación de la transpiración y cambios masivos del transcriptoma (Praveen et al., 2023).

El ABA, descubierto en la década de 1960, desempeña un papel crucial en la regulación de numerosas funciones fisiológicas, incluyendo el crecimiento, la apertura estomática, la conductividad hidráulica y la dormición de semillas (Fig. 1) (Finkelstein et al., 2002). Esta hormona no solo es vital durante situaciones de estrés abiótico, sino que también participa en la defensa contra patógenos, estableciendo una conexión (*crosstalk*) entre las respuestas al estrés biótico y abiótico (Lee & Luan, 2012).

En respuesta al estrés hídrico, el ABA coordina respuestas adaptativas que mejoran la supervivencia y productividad de las plantas en situaciones de déficit de agua (Hirayama & Shinozaki, 2007; Raghavendra et al., 2010). Durante el desarrollo de la semilla, el ABA controla la maduración del embrión, la síntesis de reservas energéticas, la producción de proteínas Late Embryogenesis-Abundant (LEA) y la iniciación de la dormición. En tejidos vegetativos bajo estrés, el ABA promueve el cierre estomático para reducir la transpiración y activa genes de respuesta al estrés, incluyendo aquellos involucrados en la síntesis de osmolitos y proteínas LEA y LEA-like (Xiong & Zhu, 2003).



*Fig. 1 Algunas de las funciones del ABA durante el ciclo de vida de una planta. Esta hormona regula múltiples aspectos fisiológicos y de desarrollo, permitiendo a las plantas adaptarse a diversas condiciones ambientales y de estrés a lo largo de su ciclo vital. Figura realizada con Biorender.*

Comprender y manipular las vías de señalización del ABA ofrece, por tanto, un camino prometedor para desarrollar cultivos más resistentes a la sequía y otros estreses abióticos, contribuyendo así a la seguridad alimentaria frente a los desafíos del cambio climático.

### **Biosíntesis del ácido abscísico**

Los precursores del ABA son carotenoides (Seo & Marion-Poll, 2019; Xiong & Zhu, 2003). Estos compuestos se producen por la condensación del isopentenil-difosfato (IPP) y su isómero, difosfato de dimetilalilo (DMAPP). A su vez, el IPP se forma en los plastidios a partir de la vía del metil eritrol 4-fosfato (MEP), desde el piruvato y el gliceraldehído 3-fosfato, según se observa en la Fig. 2.

Por su parte, el ABA es un sesquiterpenoide sintetizado a partir de la zeaxantina en un proceso biosintético de cinco pasos, catalizado por las proteínas ABA1, ABA4, NCED, ABA2 y ABA3. La zeaxantina y las sucesivas reacciones biosintéticas iniciales se producen

en los plastidios, mientras que las reacciones posteriores a la xantoxina (ABA2, ABA3) se llevan a cabo en el citoplasma.

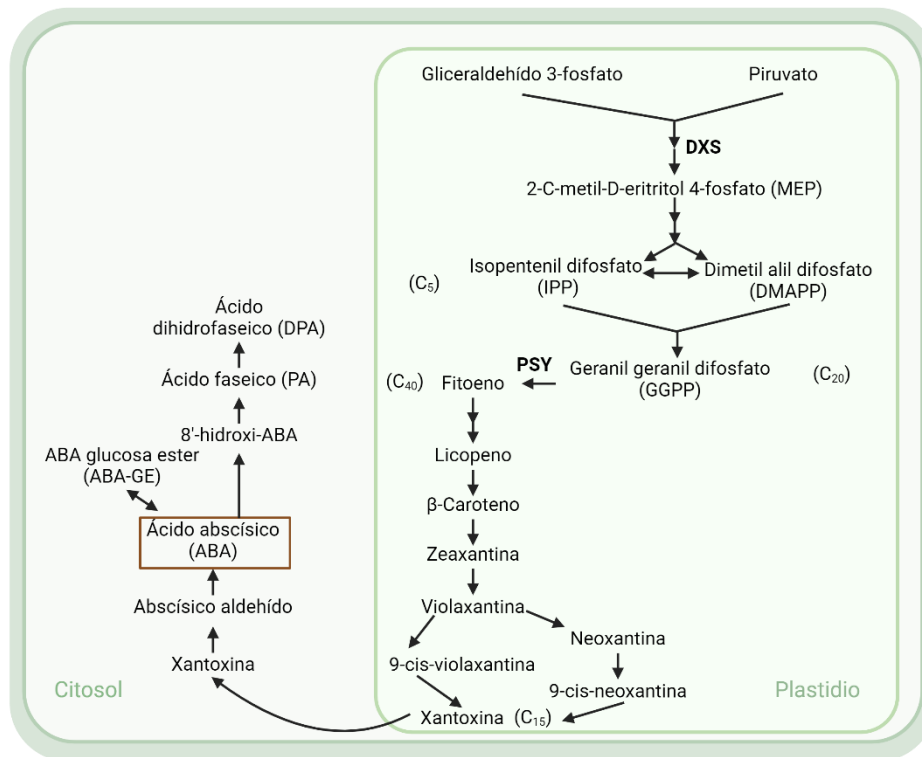


Fig. 2 Resumen de los principales pasos de las rutas de biosíntesis, hidroxilación y conjugación del ABA. Figura adaptada de Seo y Marion-Poll (2019).

Recientemente se ha descrito una ruta alternativa que empieza con la rotura oxidativa de  $\beta$ -caroteno y/o zeaxantina, produciendo  $\beta$ -apo-11- y/o 3-OH- $\beta$ -apo-11-carotenal (Jia et al., 2022).

Al ser una molécula con una elevada importancia en las plantas, existen mecanismos de regulación y degradación del ABA (Cutler & Krochko, 1999). Por un lado, el ABA es sensible a la radiación UV y se isomeriza rápidamente a trans-ABA inactivo (Gao et al., 2016; Tossi et al., 2012). Respecto a su catabolismo, la principal vía es la hidroxilación del ABA por enzimas CYP707A (Okamoto et al., 2011). CYP707A1-4 cataliza la conversión de ABA a ácido faseico (PA) y dihidrofaseico (DPA) (Okamoto et al., 2011). También existe una conjugación reversible con glucosa, realizada por enzimas UGT para formar ABA-GE inactivo. Las  $\beta$ -glucosidasas como AtBG1 y AtBG2 pueden hidrolizar ABA-GE de vuelta a ABA activo (Burla et al., 2013).

En resumen, múltiples mecanismos coordinados regulan adecuadamente los niveles de ABA para mantener la homeostasis hormonal en la planta y permitir respuestas rápidas a condiciones ambientales de estrés.

### Señalización del ácido abscísico

La respuesta al ABA se lleva a cabo por distintos componentes: receptores, fosfatasa, quinasas y elementos de respuesta al ABA (Fig. 3). A partir del aislamiento de PYR1 y la identificación de otras proteínas relacionadas, PYR1-LIKE, se ha descubierto un mecanismo fundamental en la percepción y transducción de la señal de ABA en las plantas. En primer lugar, el ABA es percibido por la familia de receptores PYRABACTIN RESISTANCE I, PYR1-LIKE y REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTORS (PYR/PYL/RCAR) (Ma et al., 2009; Park et al., 2009a). Estas proteínas interactúan directamente con la subfamilia de fosfatasa tipo 2C (PP2C), como ABI1 (Ma et al., 2009), las cuales actúan regulando negativamente la señalización del ABA, inhibiendo la acción de las quinasas SnRK2s, debido a que impiden la fosforilación. Por otra parte, cuando aumentan los niveles de ABA, este compuesto se une al complejo con el receptor PYR/PYL y la fosfatasa PP2C, lo que permite la fosforilación de las quinasas, y, de este modo, la activación de todos los efectores aguas abajo, como los factores de transcripción ABF/AREB (Fidler et al., 2022; Lozano-Juste, Alrefaei, et al., 2020a).

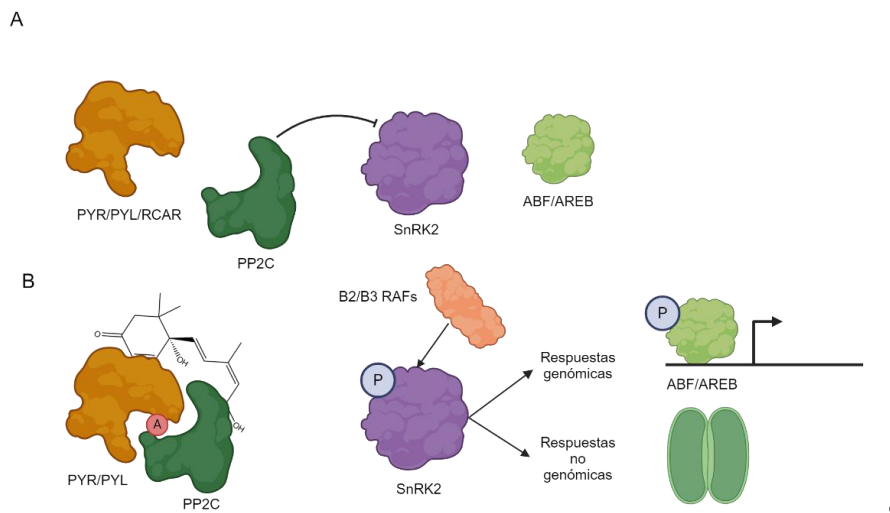


Fig. 3 **Representación esquemática de la ruta de señalización del ABA.** A) En ausencia de ABA. B) En presencia de ABA. PYR/PYL/RCAR: PYRABACTIN RESISTANCE I / PYR1-LIKE/ REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTORS, PP2C: Proteína Fosfatasa tipo 2C (regulador negativo), SnRK2: SNF1-Related Protein Kinase 2 (regulador positivo), ABF/AREB: factor/proteína de unión a elementos sensibles al ABA, B2/B3 RAFs: Subfamilias B2, B3 y B4 de quinasas Raf-like, A: ABA, P: fosforilación.



En resumen, los componentes principales de la ruta de señalización del ABA son los siguientes:

### I. PYR/PYL/RCAR

Estos receptores se descubrieron en el año 2009. Se tratan de proteínas pertenecientes a la superfamilia START (Klingler et al., 2010; Park et al., 2009) que poseen una estructura de  $\alpha/\beta$ -*helix grip* con un bolsillo de unión a un ligando hidrofóbico (Melcher et al., 2009). Además, contienen dos *loops* conservados: el "gate" y el "latch" (Nishimura et al., 2009). Ambos son cruciales para la unión del ABA y la interacción con las fosfatasa PP2C.

Se dividen en tres subfamilias basadas en su secuencia y propiedades. Por ejemplo, para *A. thaliana*, se dividen en el clado III (diméricos): PYR1, PYL1, PYL2 y PYL3; clado II (monoméricos): PYL4, PYL5, PYL6, PYL11, PYL12 y PYL13; y clado I (monoméricos): PYL7, PYL8, PYL9 y PYL10 (Hao et al., 2011). Según se observa en la Fig. 4, el número de receptores varía entre especies.

En ausencia de ABA, los receptores diméricos existen como homodímeros inactivos. Posteriormente, la unión del ABA induce un cambio conformacional que permite la interacción con las fosfatasa PP2C (Nishimura et al., 2009). Los receptores monoméricos generalmente tienen mayor afinidad intrínseca por el ABA que los diméricos. A pesar de esto, la presencia de las PP2C aumenta significativamente la afinidad de todos los receptores por el ABA.

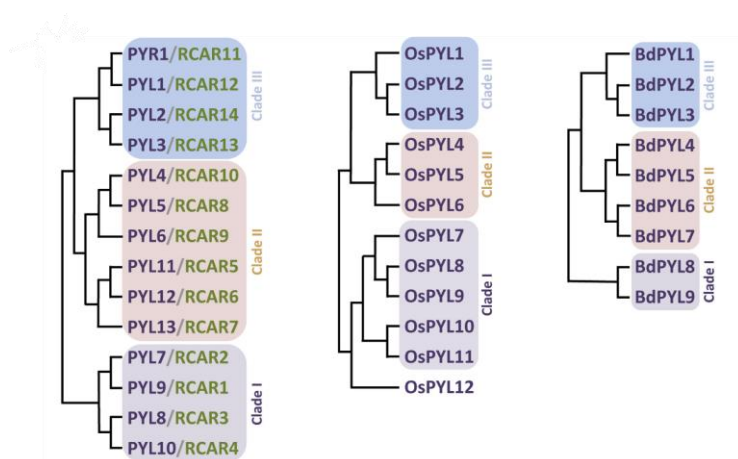


Fig. 4 Cladograma de la familia PYR/PYL/RCAR en *A. thaliana*, arroz y *Brachipodium*. Figura elaborada por Rodríguez et al., (2019).

Los distintos receptores pueden tener distintas funciones dependiendo del tejido o el proceso biológico. Por ejemplo, PYL8 está implicado en la señalización del ABA en raíces y promueve el crecimiento de raíces laterales (Belda-Palazon et al., 2018).

## 2. Fosfatasas PP2C

Por otro lado, las fosfatasas de tipo 2C del clado A, como ABI1, ABI2 o HAB1, actúan como reguladores negativos de la señalización de ABA (Fuchs et al., 2013; Rodrigues et al., 2013). Estas fosfatasas son dependientes de  $Mg^{2+}$  /  $Mn^{2+}$ .

En ausencia de ABA, estas fosfatasas inhiben la actividad de las quinasas SnRK2. Las PP2C tienen un dominio catalítico conservado que se une al *loop* de activación de las SnRK2, bloqueando físicamente el acceso de sustratos al sitio activo de las SnRK2.

## 3. Quinasas SnRK2

Las proteínas quinasas SnRK2 (SNF1-Related Protein Kinase 2) son reguladores positivos de la señalización del ABA (Lozano-Juste, Alrefaei, et al., 2020). Las SnRK2 activas fosforilan diversos sustratos, incluyendo:

- a) Factores de transcripción: como ABF/AREB, que regulan la expresión de genes de respuesta a ABA.
- b) Canales iónicos: como SLAC1, implicado en el cierre estomático.
- c) Enzimas metabólicas: que modulan el metabolismo celular en respuesta al estrés, como la síntesis de solutos compatibles (Pizzio et al., 2024).

Recientemente se ha demostrado un paso más de regulación. En distintos estudios se ha demostrado que las SnRK2, previamente defosforiladas por las PP2Cs, son activadas por fosforilación mediante quinasas RAF situadas aguas arriba (Lozano-Juste, Alrefaei, et al., 2020).

La modulación de la señalización del ABA se trata de una estrategia prometedora en el campo de la biotecnología de plantas para mitigar el impacto de la sequía en los cultivos. Entre ellos, la búsqueda de compuestos químicos que imitan la acción de ABA, así como enfoques genéticos destinados a reforzar la respuesta de la planta mediada por ABA, por ejemplo, mediante la sobreexpresión de los receptores del ABA.

## **Agonistas de los receptores PYR/PYL**

Desde 2009 se han desarrollado diferentes agonistas de los receptores del ABA (Park et al., 2009). El primer agonista sintético descubierto fue la pirabactina (Park et al., 2009). Este hallazgo fue especialmente importante porque dio lugar al descubrimiento de PYRI mediante una estrategia de genética química. A pesar de esto, este compuesto no se utiliza debido a que tiene menor potencia que el ABA en muchas respuestas fisiológicas, y no parece ser activo en cultivos de interés agrícola. Posteriormente, se desarrolló la quinabactina (QB/AMI) (Okamoto et al., 2013; Cao et al., 2013), una sulfonamida con un anillo de quinolina, pero tampoco resultó ser eficiente en plantas de cosecha. Para una mejora a la quinabactina se desarrolló el AMF4 (Cao et al., 2017), que resultó en una mayor actividad que QB/AMI y, por ejemplo, recientemente se ha utilizado en tomate para paliar el déficit hídrico (Jiménez-Arias et al., 2023).

En 2019 se desarrolló la opabactina (Vaidya et al., 2019). Se trata de una amida con un grupo carboxilo adicional. Tiene una eficacia mayor que el ABA a bajas concentraciones y es activa en plantas de interés agrícola, aunque todavía no se han realizado estudios detallados en cultivos. En 2023, se publicaron nuevos agonistas desarrollados en el grupo del Dr. Rodríguez y Dr. Albert, a partir de la sulfobactina (SB) (Lozano-Juste, García-Maquilón, et al., 2020), una sulfonamida con actividad agonista en PYL5 y PYL10 de *A. thaliana*. Estos agonistas mejorados fueron nombrados iSB09 e iSB07, y el análisis cristalográfico de los complejos de tipo CsPYLI-iSB-HABI reveló detalles estructurales que explican su alta afinidad. A destacar, el grupo etilo del iSB09, en comparación con el grupo metilo del iSB07, aumenta los contactos hidrofóbicos en el túnel 3', sin distorsionar la conformación del receptor en sitios críticos para la interacción. De este modo, al comparar la actividad de iSB07 e iSB09, se observó la importancia del túnel 3' para aumentar la afinidad de los ligandos e iSB09 demostró ser especialmente eficiente en receptores diméricos (subfamilia III) y de tipo PYL4 (subfamilia II).

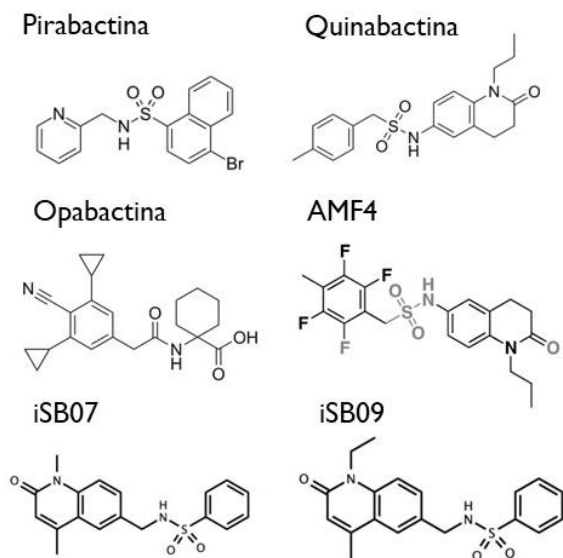


Fig. 5 **Agonistas de los receptores de ABA.** Estructuras de las moléculas pirobactina, quinabactina, opabactina, AMF4, iSB07 e iSB09.

Para el descubrimiento de las distintas moléculas se han seguido distintas estrategias (Hewage et al., 2020). Por ejemplo, mediante el cribado de bibliotecas químicas (quimiotecas). La sulfobactina y sus derivados se descubrieron explorando la base de datos ZINC. También se han realizado a partir del diseño basado en estructura. Esta estrategia se utilizó para mejorar compuestos como iSB07 e iSB09. Otro caso habitual es la mejora de moléculas existentes. Por ejemplo, AMF4 es una versión mejorada de la quinabactina mediante la introducción de 4 átomos de flúor en el anillo aromático que establecen nuevos puentes de hidrógeno con el receptor.

Actualmente, se están usando estrategias bioinformáticas ya empleadas en la industria farmacológica. Por ejemplo, la Inteligencia Artificial (IA), para realizar estudios de anclaje molecular, dinámica molecular y predicciones estructurales de la interacción ligando-receptor mediante herramientas como AlphaFold (Paul et al., 2021). Gracias a este método, se puede predecir estructuras 3D de la proteína diana, las interacciones entre droga-proteína, identificar la actividad o diseñar drogas *de novo*.

Los compuestos candidatos se prueban en ensayos *in vitro* para evaluar su capacidad de unirse a los receptores y activar la vía de señalización del ABA. Un buen agonista debe de ser una molécula pequeña y que contenga grupos funcionales específicos que interactúen con los receptores. Además, debe de tener una potencia igual o superior al ABA y ser más estable que éste.

Estas herramientas, aparte de ser útiles para el descubrimiento de nuevos agonistas, también son útiles para conocer nuevos bioestimulantes. Los bioestimulantes son productos que mejoran la eficiencia en el uso de nutrientes, la tolerancia a estrés abiótico, caracteres de calidad o la disponibilidad de nutrientes limitantes.

El desarrollo continuo de estos agonistas no solo proporciona herramientas para la investigación básica en fisiología vegetal, sino que también ofrece perspectivas prometedoras para mejorar la resistencia de los cultivos al estrés hídrico en la agricultura.

### **CsPYLI<sup>5m</sup>**

Esta variante de PYLI proviene de la especie *Citrus x sinensis* (Cs), y es un receptor modificado que alberga cinco mutaciones que aumentan la afinidad de ligandos tipo SB e iSB (detallado abajo en la Fig. 6) (Lozano-Juste et al., 2023). Se ha demostrado que en las plantas de *A. thaliana* que sobreexpresan el gen y han sido tratadas con las versiones mejoradas de SB, es decir, iSB09 e iSB07, se produce un fuerte efecto antitranspirante y reforzamiento de la expresión génica de respuesta a estrés, lo que redundará en una mejora de la tolerancia a sequía. Es por ello por lo que hay un gran interés en su traslado a plantas de cosecha y realización de pruebas de concepto en otras plantas como *N. benthamiana*.

Para mejorar la unión de SB a CsPYLI, se determinó y comparó la estructura cristalina de los complejos CsPYLI-SB-HABI y CsPYLI-QB-HABI. Conociendo que PYLI0 tiene una mayor sensibilidad a SB que PYLI, se compararon estas estructuras y se introdujeron en PYLI varias mutaciones obtenidas de la secuencia de PYLI0.

Así, se realizó la sustitución de Val<sup>112</sup> en CsPYLI por la equivalente Leu<sup>79</sup> de AtPYLI0. Por otro lado, Phe<sup>137</sup> de CsPYLI es sustituido por Ile<sup>104</sup>. Además, existen interacciones concatenadas a lo largo de la lámina  $\beta$  de AtPYLI0 que fueron introducidas mediante las siguientes sustituciones en CsPYLI, incluyendo Thr<sup>133</sup> por Leu, Thr<sup>153</sup> por Ile y Val<sup>168</sup> por Ala. Todos estos cambios explican el aumento de actividad de SB con PYLI0 comparando con PYLI. En resumen, para mejorar la actividad de PYLI, se diseñó

CsPYLI<sup>5m</sup> a partir de cinco sustituciones: Val<sup>112</sup>Leu, Phe<sup>137</sup>Ile, Thr<sup>135</sup>Leu, Thr<sup>153</sup>Ile, y Val<sup>168</sup>Ala.

En cambio, estudios comparando la actividad de CsPYLI y CsPYLI<sup>5m</sup> con ABA y HABI mostraron que debido a una reducción en los puentes de hidrógeno mediados por agua en CsPYLI<sup>5m</sup>, hay una reducción en la sensibilidad a ABA de CsPYLI<sup>5m</sup> con respecto al *Wild-Type* (WT). Como resultado, la inhibición de HABI y ABII es menor por ABA en presencia de CsPYLI<sup>5m</sup>, al contrario de lo que ocurre con el agonista iSB09.

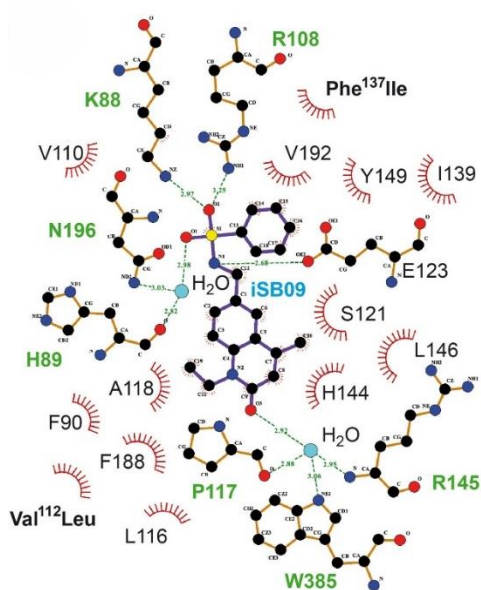


Fig. 6 Representación esquemática de las interacciones de iSB09 en el bolsillo del complejo CsPYLI<sup>5m</sup>-ligando-AtHABI (Figura elaborada por Lozano-Juste et al. (2023b)).

En el estudio de Lozano-Juste et al. (2023) se demostró que las plantas de *A. thaliana* tratadas con iSB09 y que sobreexpresaban CsPYLI<sup>5m</sup> mostraron una mayor resistencia a la sequía en comparación con las WT. Este efecto fue medido por un mayor ahorro de agua en el suelo durante los ensayos de sequía, con un 30% más de retención de agua en las plantas tratadas con iSB09. Además, estas plantas presentaron una mayor tasa de supervivencia después del tratamiento con iSB09 en condiciones de estrés por sequía. Asimismo, se observó que iSB09 no solo es efectivo en plantas que expresan CsPYLI<sup>5m</sup>, sino que también tiene un efecto positivo en plantas WT cuando se utiliza a una mayor concentración.

### ***Nicotiana benthamiana***

*Nicotiana benthamiana* (Nb) es una angiosperma perteneciente a la familia *Solanaceae* y nativa de Australia (Bally et al., 2018; Clemente, 2006). Ha sido ampliamente utilizada

como modelo en investigaciones, especialmente en experimentos con virus y como biofactoría (Bally et al., 2018; Goulet et al., 2019; Molina-Hidalgo et al., 2021; Torti et al., 2021). La complejidad del genoma de *N. benthamiana* es mayor que en *A. thaliana*, siendo *N. benthamiana* una especie alotetraploide  $2n=38$  (Schiavinato et al., 2021) y con una longitud de 3 Gpb, y *A. thaliana*  $2n=10$  y con una longitud de 0,15 Gpb. Además, se han identificado 23 miembros de PYR/PYL/RCAR (Pizzio et al., 2022), frente a los 14 de *A. thaliana*.

Debido a la gran producción actual de empresas biotecnológicas con Nb (Molina-Hidalgo et al., 2021), se han realizado grandes avances a nivel genómico y transcripcional. Esto facilita la transformación estable, siendo una especie interesante para realizar estudios moleculares y fisiológicos.

## Objetivos

Basándose en los estudios previos sobre la eficacia de la sobreexpresión del receptor CsPYLI<sup>5m</sup> de ABA y su combinación con el agonista iSB09 en *A. thaliana*, se pretende traspasar esta estrategia genética-química a *N. benthamiana*. Se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Generar líneas transgénicas estables de *N. benthamiana* que sobreexpresen el receptor CsPYLI<sup>5m</sup>.
2. Evaluar la sensibilidad de las semillas y plántulas transgénicas al ABA y al agonista iSB09 en comparación con las plantas control.
3. Analizar los efectos fisiológicos de la aplicación foliar de iSB09 y ABA en plantas adultas transgénicas y control, centrándose en parámetros como la conductancia estomática, la transpiración y la temperatura foliar.
4. Estudiar la respuesta de las plantas transgénicas tratadas con iSB09 a condiciones de sequía prolongada, evaluando su capacidad para mantener la fotosíntesis y recuperarse tras la rehidratación.
5. Identificar y caracterizar nuevos compuestos naturales con potencial como bioestimulantes para aumentar la señalización del ABA y la tolerancia al estrés en plantas.

El objetivo final es utilizar la biotecnología de plantas para desarrollar cultivos más resilientes ante el cambio climático y asegurar la seguridad alimentaria a nivel global.

### Implicaciones del estudio

Este enfoque no solo contribuye al conocimiento fundamental de las respuestas de las plantas al estrés hídrico, sino que también tiene implicaciones prácticas para el desarrollo de cultivos más resilientes y resistentes. Además, el estudio de la respuesta en este abordaje genético-químico sirve como prueba de concepto para el traslado de esta estrategia a plantas de cosecha.

## 2. Materiales y métodos

### Material Vegetal

Las plantas provienen de semillas de *N. benthamiana* LAB estériles. La esterilización se llevó a cabo mediante una solución de hipoclorito sódico 50% con Tween® 20 (Sigma-Aldrich) 0,02%. Estas fueron germinadas en medio de germinación (MG) con los macronutrientes descritos por Murashige & Skoog (1962) y los micronutrientes descritos por (Shahin, 1985) (Tabla 1). Posteriormente se clonaron en medio básico (MB3). Las plantas se cultivaron en condiciones controladas en cámaras de cultivo, con una intensidad lumínica de  $45 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad a una temperatura de 25°C.

Tabla 1 **Composición y concentración de los distintos medios empleados.** <sup>a</sup> (Murashige & Skoog, 1962) y <sup>b</sup> (Shahin, 1985).

	<b>MG</b>	<b>MB2</b>	<b>MB3</b>	<b><math>\alpha</math></b>	<b>IK</b>	<b>IKZ</b>
<b>Solución mineral</b>	MS/2	MS	MS	MS	MS	MS
<b>Sacarosa (g/L)</b>	10	20	30	20	30	30
<b>Myo-inositol (g/L)</b>	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<b>Tiamina clorhídrica (mg/L)</b>	-	1	1	1	1	1
<b>Agar bacteriológico</b>	8	8	8	-	8	8
<b>Vitaminas</b>	-	-	-	-	SH	SH
<b>Ácido indolacético (mg/L)</b>	-	-	-	0,1	4	4
<b>Kinetina (g/L)</b>	-	-	-	-	4	4
<b>Zeatina (g/L)</b>	-	-	-	-	-	1



## Generación de plantas transgénicas

La construcción *pKAN-Alligator2-35S:HACsPYLI<sup>5m</sup>* (Fig. 7) se realizó previamente en el laboratorio. Para ello, se utilizó el vector *pAlligator* (Bensmihen et al., 2004) en el cual se clonó el gen de resistencia a kanamicina (*NPTII*) dirigido por el promotor NOS. Tras introducir mediante tecnología Gateway el receptor *CsPYLI<sup>5m</sup>*, con el vector resultante se transformó *Agrobacterium tumefaciens* C58Cl (pGV2260) mediante electroporación. El gen de resistencia a kanamicina *NPTII* bajo el control del promotor NOS, permite seleccionar células y plantas transformadas con el transgén. Además, este vector cuenta con el gen de resistencia a espectinomicina que permite seleccionar las células transformadas de *E. coli*. La secuencia codificante de la proteína *CsPYLI<sup>5m</sup>* está regulada por un promotor 35S y además está etiquetada con tres epítopos de hemaglutinina (HA), las cuales permiten la detección de la proteína mediante análisis Western-blot. El vector también tiene el gen *GFP* (*Green Fluorescent Protein*), el cual codifica a la proteína verde fluorescente detectable en semillas y embriones en germinación.

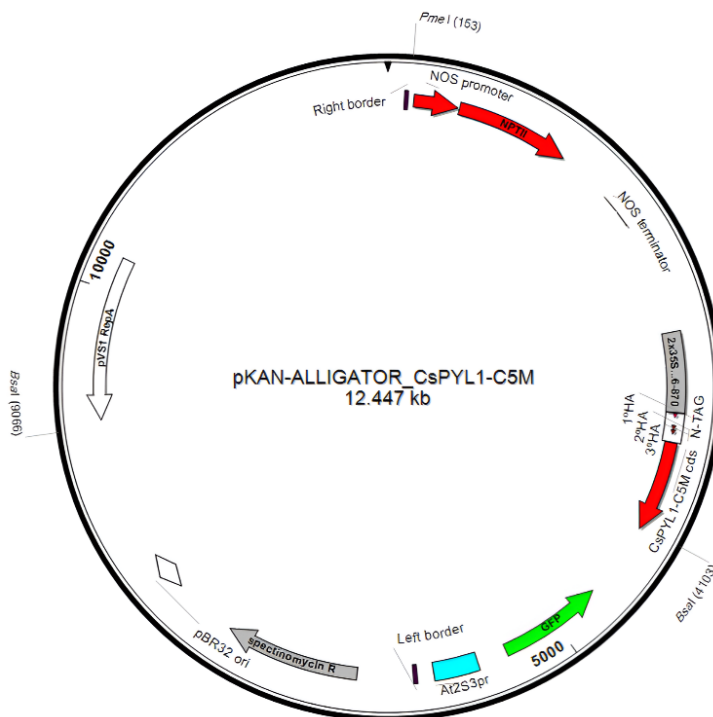


Fig. 7 Construcción usada para el trabajo *pKAN-Alligator2-35S:HACsPYLI<sup>5m</sup>*.

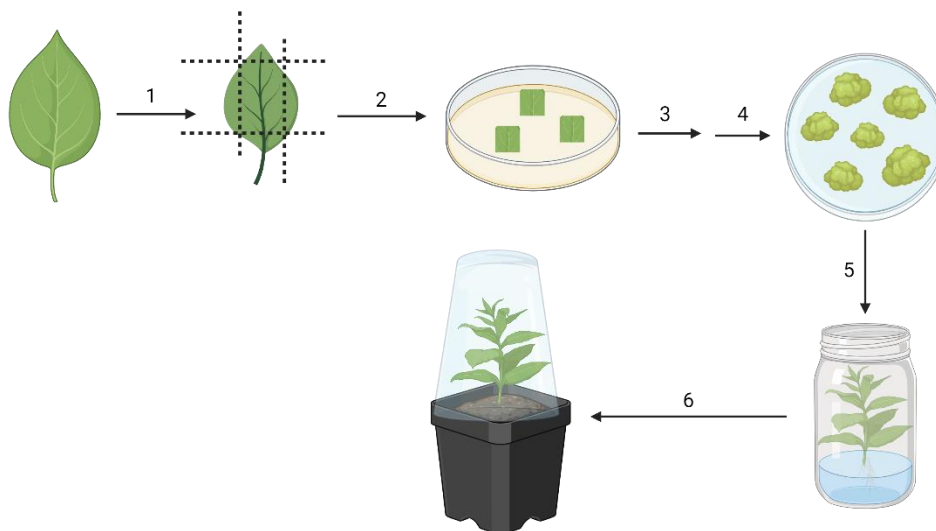
## Cultivo *in vitro*

Todo el proceso de cultivo *in vitro* se llevó a cabo en condiciones axénicas en cabina de flujo laminar. Los explantes a transformar se obtuvieron a partir de hojas del material

vegetal mencionado anteriormente de 6 semanas de edad. Se hizo un control de la transformación sin presión de selección y otro con explantes no transformados con kanamicina (kan) 100 mg/L. Estos explantes se pasaron a placas Petri con medio IK+AS (acetosiringona) y posteriormente al cultivo de *A. tumefaciens* con la construcción *pAlligator2-35S:HACsPYL1<sup>5m</sup>*. Tras 5 minutos en agitación en el cultivo, se devolvieron a las placas Petri mencionadas anteriormente. Posteriormente, se dejaron 48 horas en oscuridad. Tras la incubación en oscuridad, se lavó con medio MB2 + cefotaxima (CTX) 500 mg/L. Finalmente, los explantes se pasaron a medio con presión de selección IKZ + CTX + Ti (timentina) 300 mg/L + kan 100 mg/L. Cada dos semanas se subcultivaron los explantes a medio MB3+kan+Ti.

Una vez se obtuvieron los ápices elongados, en aproximadamente tres meses después de la transformación, se individualizaron en medio  $\alpha$  + CTX + kan.

Aquellas plantas que estuvieran enraizadas, elongadas, fueran alotetraploides (ensayo de citometría de flujo) y expresasen el transgén (Western blot), se clonaron en el mismo medio de enraizamiento  $\alpha$  + CTX. Finalmente, una vez enraizados los clones, se procedió a la aclimatación en cámaras de cultivo de condiciones controladas de 16 horas luz/ 8 horas de oscuridad, con una intensidad luminosa de  $70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  de temperatura. Para prevenir la deshidratación, se cubrieron las plantas con vasos de plástico transparentes durante dos semanas, según se observa en la Fig. 8.



**Fig. 8 Protocolo esquematizado de generación de plantas transgénicas de *N. benthamiana*.** 1. Generación de los explantes de hoja. 2. Co-cultivo de los explantes con el cultivo de *A. tumefaciens*. 3 y 4. Paso de los explantes a medio MB2 y posteriormente IKZ para la generación de callo indiferenciado. 5. Individualización de los ápices y enraizamiento. 6. Aclimatación. Figura realizada con Biorender.

## Verificación de la transformación estable

### Análisis de la ploidía

Las plantas que enraizaron tras el paso anterior se sometieron a estudios de la ploidía, según descrito en Smulders et al. (1993). Para ello, se cortaron fragmentos de hojas de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de plantas resistentes a kan. Después se trocearon con una cuchilla en una placa Petri de 50 mm de diámetro. Posteriormente se les aplicó un tampón de extracción de núcleos (Partec, Münster, Germany) y se les añadió 800 µL de solución con fluorocromo DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (DAPI staining solution, Partec) 1 mg/L. La mezcla se filtró a través de una malla de nylon de 50 µm. La solución de núcleos se estudió en el citómetro de flujo analizador de ploidía Partec PA-II.

### Western blot

Posteriormente, con el fin de detectar las líneas que expresan la proteína PYLI<sup>5m</sup> se realizó un ensayo Western blot. Se usó una planta WT y otra planta de tomate 5M, previamente analizada, como controles. Para ello, se extrajeron las proteínas mediante un tampón de lisis compuesto de Tris-HCl pH 7.5 50 mM, NaCl 100 mM, NP40 0.1%, MG132 50 µM, DTT 1mM, PMSF 1 mM, 1 pastilla/10 mL de inhibidores de proteasas cOmplete Mini sin EDTA (Roche), ubiquitín aldehído 100 nM, NEM 100 mM, EDTA 1 mM. Las muestras se centrifugaron a 12.000×g a 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante se usó para cuantificar las proteínas mediante un ensayo de Bradford (Bio-Rad) en un lector de microplacas LED Rayto RT-6900.

Posteriormente, se mezclaron las muestras con buffer Laemmli y se calentaron a 95°C durante 10 minutos. Se preparó un gel SDS-PAGE. El “*resolving gel*” estaba compuesto de acrilamida al 12% (19:1 acrilamida/Bis-acrilamida, National diagnostics), Tris-HCl pH 8.8 375mM, SDS 0.1%, N,N,N',N'-tetrametil etilenediamina (TEMED) 0.2% y 0.08% de persulfato de amonio (APS). El “*stacking gel*” estaba compuesto de acrilamida 4%, Tris-HCl pH6.8 125mM, SDS 0.1%, TEMED 0.8% y APS 0.1%. El gel se corrió a 25 mA en un sistema MiniProtean® (Bio-Rad).

Las proteínas se transfirieron a una membrana de fluoruro de poliviniliden (PVDF) Immobilon®-P (Millipore™), previamente activada en solución de metanol al 100%, utilizando Mini Trans-Blot® Cell system (Bio-Rad) a 4°C y 110 V durante 1.5h. El tampón de transferencia utilizado fue 1x Towbin Buffer (TrisHCl pH 7.6 25mM, glicina 192 mM, metanol 20% (v/v), SDS 0.1%). La transferencia se realizó posteriormente a un voltaje fijo de 30 V, dejándolo durante la noche.

Al día siguiente, se hizo el bloqueo con leche en polvo desgrasada al 5% en un agitador orbital. Se tiñó la membrana con solución rojo Ponceau (Sigma-Aldrich) 5 g/L, se lavó y, posteriormente, se le añadió a 15 ml de solución de leche al 5%, 7.5  $\mu$ l del anticuerpo policlonal Anti-IgG (ratón)-HRP (Abcam, ab205719). Finalmente, se reveló la membrana en un detector LAS-3000 (Fujifilm).

### **Experimentos con agonistas de ABA**

Ensayos de germinación dosis-respuesta

Se usaron entre 20 y 30 semillas estériles de Nb WT y 5M pertenecientes a una línea homocigota de la TG3, las cuales fueron estratificadas en frío a 4°C durante 48 h después de la siembra. El ensayo se realizó en placas de 6 pocillos y en medio MS. Las concentraciones utilizadas de iSB09 fueron de 0, 1, 2, 5, 10 y 20  $\mu$ M. Las concentraciones de ABA fueron de 0, 0.5, 1, 2.5, 10 y 20  $\mu$ M. Se estudió tanto la germinación *sensu stricto* (emergencia de radícula), como el establecimiento, es decir que cumple estas dos condiciones (Hadas, 2005):

- 1) La radícula penetra el agar y es capaz de adquirir agua y nutrientes.
- 2) Deben de tener cotiledones fotosintéticamente activos.

Se tomaron imágenes con un macroscopio LEICA DMS1000 a los 7 y 14 días.

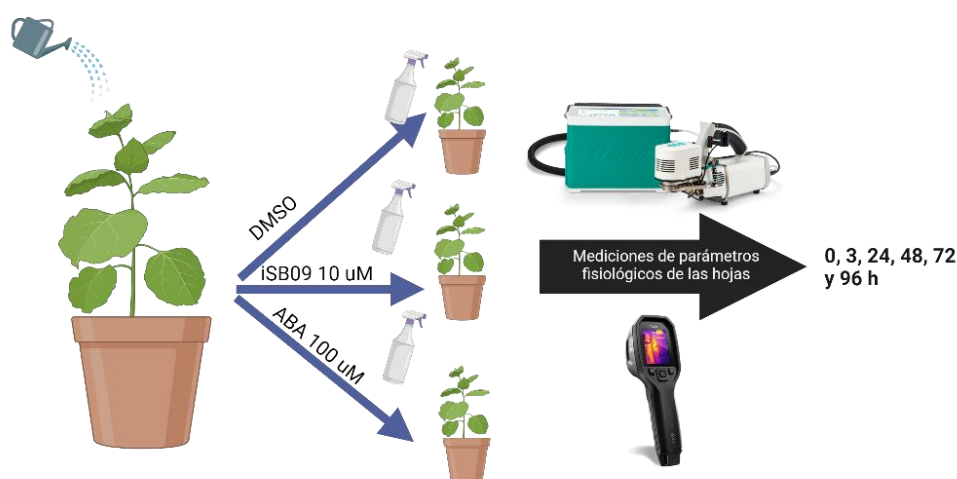
Experimentos con riego

Se seleccionaron 18 plantas de Nb WT (*Wild-Type*) y 18 plantas de Nb 5M (sobrexpresoras de *CsPYL1<sup>5m</sup>*), de dos líneas independientes y pertenecientes a la TG2 seleccionadas por germinación en kanamicina. Estas se plantaron en macetas de 0.5 L (sustrato 4:2 perlita:vermiculita). Las plantas crecieron en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 10h/14h, una temperatura de 23°C/21°C, PPFD de 80  $\mu$ M m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, y 50% de humedad durante el día. Después de dos semanas, se realizaron pulverizaciones foliares con tampón MES 10 mM pH 5.7 + 0.02 % Silwet<sup>®</sup>L77 con cada uno de los agonistas, iSB09 10  $\mu$ M, ABA 100  $\mu$ M o DMSO 0.1% (control o *mock*). Se usó una concentración diez veces mayor de ABA que de iSB09 debido al fuerte poder agonista de éste. El seguimiento tras las pulverizaciones se llevó a cabo en el laboratorio con lámparas de crecimiento de plantas LED con un fotoperiodo de 12h/12h.

Se hicieron análisis de intercambio de gases en hojas desarrolladas (N=30). Mediante un Analizador Infrarrojo de Gases portátil (IRGA) (LCi-T, ADC BioScientific Ltd.,

Hoddesdon, UK) se midió la fotosíntesis ( $P_n$ ), el  $CO_2$  intracelular ( $C_i$ ), la conductancia estomática ( $g_s$ ) y la tasa de transpiración ( $E$ ). Las medidas se tomaron con una concentración de  $CO_2$  ambiental, una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD) de  $1000 \mu M m^{-2} sec^{-1}$  y un flujo de aire de cubeta de  $500 mL min^{-1}$ . Estas medidas se realizaron previamente de realizar los tratamientos, y posteriormente, a las 3 h, 24 h, 48 h, 72 h y 96 h.

Además, se llevó a cabo un análisis mediante termografía infrarroja mediante una cámara FLIR E95. La cuantificación se llevó a cabo con el software *FLIR Thermal Studio* (FLIR Systems, 2024).



**Fig. 9 Diseño experimental para el estudio de los efectos de iSB09 y ABA en la fisiología foliar de plantas.** El esquema ilustra la aplicación foliar de tres tratamientos: DMSO (control o mock), iSB09 ( $10 \mu M$ ) y ABA ( $100 \mu M$ ) a plantas individuales. Se realizaron mediciones de parámetros fisiológicos foliares a las 0, 3, 24, 48, 72 y 96 horas post-tratamiento utilizando un analizador de intercambio gaseoso y una cámara térmica.

### Experimentos en sequía

Posteriormente a los experimentos con riego anteriormente mencionados, se dejaron de regar las plantas a las 96 h de la pulverización con agonistas. Con el fin de comprobar la absorción de agua en las distintas plantas, se analizó el porcentaje de humedad del suelo con un módulo higrómetro VI.2. compatible con Arduino. Además, se midieron los mismos parámetros que en el experimento con riego tras 5, 6, 7, 12 y 15 días después de quitarle el agua. Estas plantas no recibieron un reforzamiento de los agonistas, es decir, se midieron los parámetros 9, 10, 11, 16 y 19 días después de los tratamientos, respectivamente.

## **Búsqueda de nuevos compuestos**

En el laboratorio del Dr. Horacio Pérez se analizaron distintos compuestos de origen natural con herramientas basadas en computación de alto rendimiento (HPC). Los compuestos que se predijeron que podrían ser agonistas se analizaron en el laboratorio por la Dra. Constanza Vásquez y el Dr. Alberto Coego con las líneas reporteras de ABA en plantas de *A. thaliana*, descritas en García-Maquilón et al. (2021).

Las semillas esterilizadas con etanol 70%+triton 0.01% y etanol 96% se sembraron en placas de 14 pocillos con MS. Una vez germinadas, se les añadió MS líquido con los distintos compuestos a tres concentraciones distintas: 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  y 200  $\mu\text{M}$ . También se incluyó un control sin compuesto y un control positivo con 5  $\mu\text{M}$  de ABA. Se pusieron entre 20 y 25 semillas por pocillo. Esta mezcla también incluía D-luciferina 100  $\mu\text{M}$ . Las semillas se incubaron *o/n* con el compuesto y la luciferina y se reveló en analizador LAS-3000 (Fujifilm). Las imágenes adquiridas se analizaron con el software ImageJ (Schneider et al., 2012).

A partir del ensayo de luciferasa se obtuvieron dos posibles candidatos a ser agonistas (compuestos 1 y 2). Posteriormente, se hicieron ensayos de germinación con *A. thaliana*, con semillas Col0 WT y 112458 (Gonzalez-Guzman et al., 2012). Se realizaron en placas de 24 pocillos con MS y se les añadió ABA a 1  $\mu\text{M}$  y ambos compuestos a 100  $\mu\text{M}$ . Las semillas se contaron en un macroscopio Leica SMZ800 y finalmente se midió la longitud de la raíz con ImageJ.

Posteriormente, con el fin de saber si estos compuestos inhiben a las fosfatasa, se hicieron ensayos de inhibición PP2C. Se hicieron ensayos con proteínas, previamente purificadas en el laboratorio por Cristian Mayordomo, y se usaron los receptores PYR1 y PYL5 de *A. thaliana* a 2  $\mu\text{M}$  y  $\Delta\text{NHABI}$  a 1  $\mu\text{M}$ . El tampón de actividad está compuesto de Tris 25 mM y KCl 150 mM a pH 8. Como sustrato se utilizó pNPP (15 mM) y también se le añadió 2 mM de  $\text{MnCl}_2$ . La actividad se monitorizó con un lector ViktorX5 a 405 nm.

Para comprobar si existen efectos en la expresión génica, se hicieron RT-qPCR. Para ello se utilizaron plántulas de *Solanum lycopersicum* "Ailsa Craig". Las semillas se esterilizaron con hipoclorito sódico 50% con Tween 20 0.02% durante 30 minutos, posteriormente se lavaron con agua destilada. Estas semillas se incubaron a 27 °C en oscuridad hasta que emergió la radícula. Posteriormente se pasaron a matraces de 200

ml estériles con 2 ml de MS líquido. Estas plántulas se dejaron crecer hasta que sacaron hojas verdaderas en cámaras de cultivo de condiciones controladas de 16 horas luz/ 8 horas de oscuridad, con una intensidad luminosa de  $70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  de temperatura. Cuando las plántulas ya tenían las hojas verdaderas se le aplicaron los dos compuestos a una concentración de  $100 \mu\text{M}$  y un control con DMSO al 0.1%. Se incubó durante 6 horas y posteriormente se congelaron con nitrógeno líquido. Posteriormente, se extrajo el RNA con E.Z.N.A. Total RNA Kit (Omega).

El RNA extraído se cuantificó con espectrofotómetro ultravioleta-visible Nanodrop® ND-1000 a 260 nm. Además, se midió la calidad de las muestras con los ratios de absorbancia a las longitudes de onda de  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$ . Para la retrotranscripción, se utilizó un volumen final de  $19.4 \mu\text{L}$  con  $1.5 \mu\text{g}$  de RNA. A esto, se le añadió  $6.6 \mu\text{L}$  de dNTPs ( $1.5 \text{ mM}$ ) y  $2 \mu\text{L}$  de oligo dT ( $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Se incubaron las muestras en el termociclador durante 5 minutos a  $65^\circ\text{C}$ . Posteriormente, se le añadió a cada tubo,  $4 \mu\text{L}$  de DTT,  $8 \mu\text{L}$  de Buffer RT 5X RevertAid (Thermo Fisher) y  $0.7 \mu\text{L}$  de transcriptasa inversa RevertAid (Thermo Fisher).

Una vez obtenido el cDNA, se llevó a cabo la reacción de amplificación cuantitativa. Se preparó una máster mix con EvaGreen® (Biotium), dNTPs  $1.5 \text{ mM}$ , Standard Reaction Buffer 10x (Biotools). A este megamix se le añadieron  $0.5 \mu\text{L}$  de los primers y  $0.3 \mu\text{L}$  de la taq polimerasa (Thermo Fisher). Se realizaron tres réplicas biológicas y tres técnicas. Se utilizaron como marcadores los genes *SI02g084850* (*SIRAB18*), *SI06g067980* (*SILEA*), y *SI06g019170* (*SIP5CS1*), según descrito en González-Guzmán et al. (2014). La expresión se normalizó con la expresión del gen *SI06g009970* (*SIEF1a*).

Posteriormente, con el fin de hacer un experimento de RNA-seq, se estudió la calidad de las secuencias con Agilent 2100 Bioanalyzer y se secuenciaron usando la tecnología de DNB-Seq en el Instituto de Genómica de Beijing (BGI).

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se ha llevado a cabo con los programas GraphPad Prism (GraphPad Software, 2018) y R (R Core Team, 2020), usando el entorno de desarrollo RStudio (RStudio Team, 2020). En R, se utilizó el paquete ggplot2 (Wickham, 2016) para realizar los gráficos. Se han llevado a cabo modelos de regresión lineal para conocer los efectos

de las tres variables (el tiempo transcurrido tras los tratamiento, el genotipo y el tratamiento) y el efecto de su interacción en parámetros fisiológicos. Se realizaron Análisis de Componentes Principales (PCA) utilizando las variables cuantitativas de transpiración, conductancia estomática y tasa fotosintética.

Se realizaron pruebas estadísticas para comprobar la igualdad de las medias. Se llevaron a cabo Análisis de la Varianza (ANOVAs) de uno y dos factores. Con esta prueba se pretende conocer si la influencia del genotipo y el tratamiento es significativa o no sobre los parámetros fisiológicos. Previamente se realizaron los supuestos básicos de normalidad, homocedasticidad, la independencia de los errores y la ausencia de colinealidad.

Para considerar el efecto de los distintos tratamientos y de la combinación del genotipo con el agonista se realizaron test post-hoc de Dunnet y Sidak respecto al control WT.

### 3. Resultados

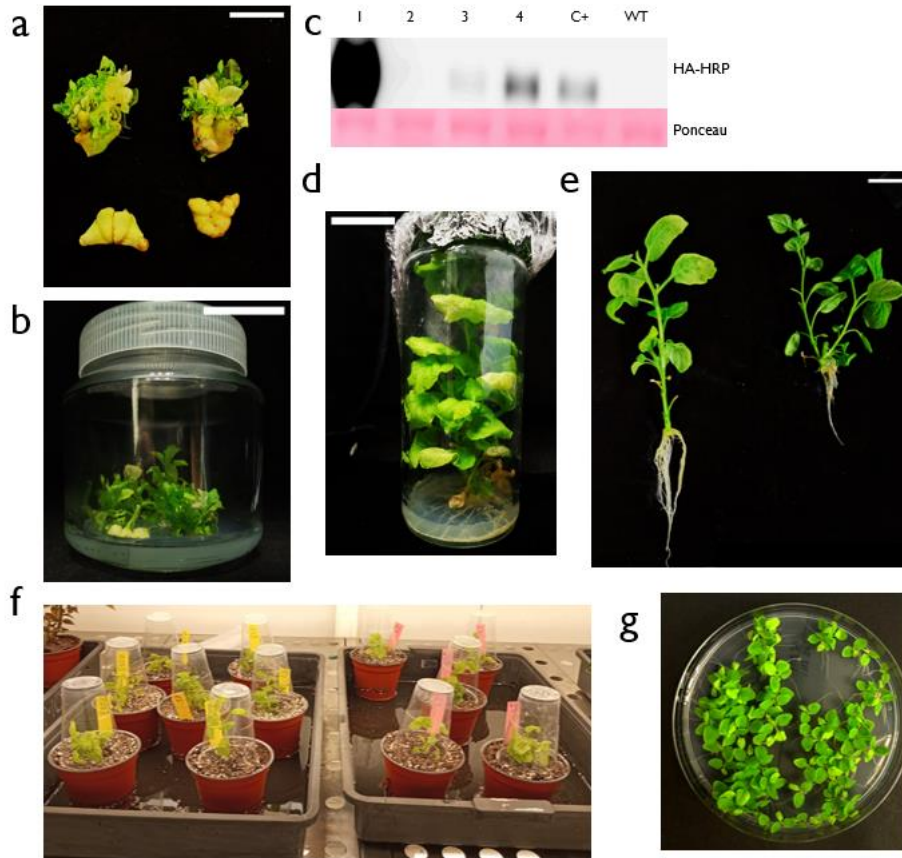
#### **Transformación**

La transformación se llevó a cabo de manera exitosa, según se observa en la Fig. 10. El 42.23% de las líneas independientes enraizaron en kanamicina, lo que demuestra su resistencia. Estas plantas se estudiaron en el citómetro de flujo, resultando en un 97.60% de líneas tetraploides. Solamente se obtuvo una línea octaploide.

Posteriormente, se realizó un análisis Western blot con 10 líneas independientes de las 40 resistentes a kan. Tres de ellas expresaron la proteína, la 1, la 3, y la 4 (Fig. 10 c). El Western blot se repitió dos veces para reafirmar los resultados.

Por otro lado, se ha conseguido, por ahora, dos líneas homocigotas independientes perteneciente a la TG3 (Fig. 10 g).





**Fig. 10 Obtención de la línea de sobreexpresión de *N. benthamiana* 5M.** a) Callos transformados arriba y no transformados abajo crecidos en placas de kan. Incubados con *Agrobacterium tumefaciens* pKAN-Alligator:CsPYLI<sup>5m</sup>. b) Brotes resistentes a kan. c) Análisis Western blot con anticuerpo anti-HA que muestra la expresión de 3HA-CsPYLI<sup>5m</sup>. Debajo se muestra la tinción Ponceau, usado como control de carga. d) Elongación de ápices resistentes a kan. e) Plantas enraizadas preparadas para la aclimatación en suelo. f) Plantas TG1 que expresan la proteína en suelo (a la izquierda, plantas 5M y a la derecha, plantas WT). g) Selección de semillas TG3 resistentes a kan en placa MS+kan. Las semillas pertenecen a dos plantas de dos líneas independiente de la TG2. La escala mide 3 cm.

### Ensayos de germinación dosis-respuesta

Los ensayos de germinación revelaron diferencias significativas en la sensibilidad a ABA e iSB09 entre las semillas WT y las transgénicas (5M) (Fig. 11). Ambos tipos de semillas mostraron inhibición de la germinación a partir de 1  $\mu$ M de ABA. Sin embargo, las semillas 5M fueron notablemente más sensibles a iSB09, mostrando inhibición del establecimiento a partir de 1  $\mu$ M. A pesar de haber emergencia de radícula a 1 y 2  $\mu$ M, no pasas a las

fases siguientes del desarrollo. Mientras tanto, WT en iSB09 solo se inhibieron a concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  o superiores.

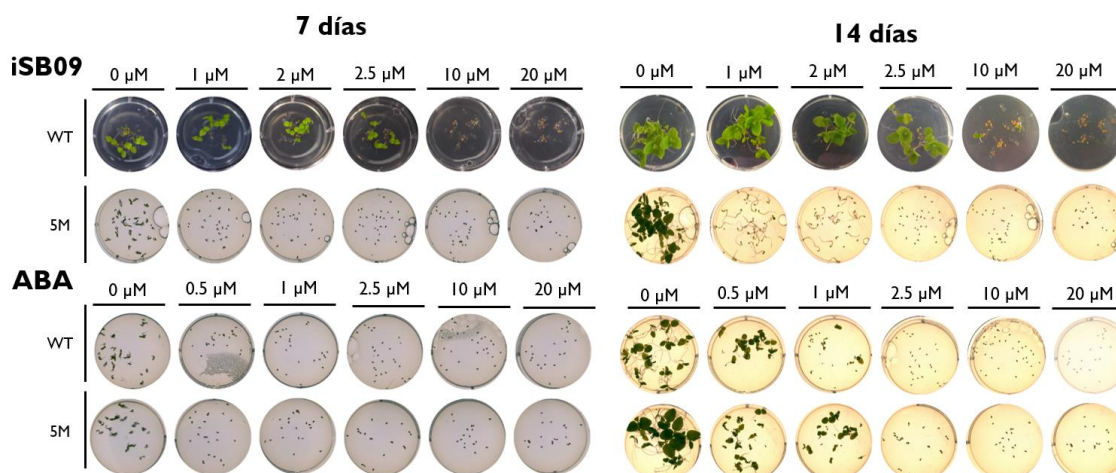


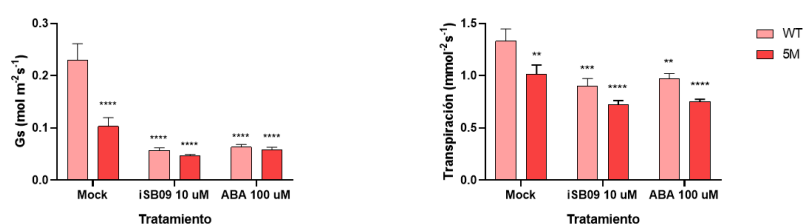
Fig. 11 **Inhibición de la germinación de ABA e iSB09.** Germinación a los 7 y a los 14 días. Se observan las semillas tratadas con distintas concentraciones de ABA e iSB09. Todas las semillas fueron germinadas en agar, pero la configuración de la lupa en plantas WT se modificó para una mejor visualización.

### Experimentos de pulverización con agonistas

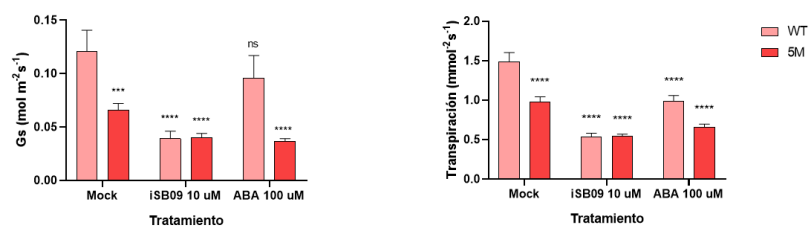
En los experimentos en condiciones de riego, se observa el cierre estomático que conduce a una disminución de la conductancia estomática y de la transpiración (Fig. 12). A las 24 horas, se observa cómo se incrementan los efectos fisiológicos de la aplicación de los agonistas. Se observa un cierre estomático parecido en iSB09 10  $\mu\text{M}$  y ABA 100  $\mu\text{M}$ , aunque la concentración de este último es diez veces superior. Los efectos a las 24 horas se observan tanto en plantas 5M como en WT y en los parámetros de Gs y transpiración.

A las 48 horas, se observa como las plantas WT tratadas con ABA empiezan a perder el efecto del tratamiento de ABA, no existiendo diferencias estadísticamente significativas en la Gs. Se observa un contraste con las plantas tratadas con iSB09, ya que estas siguen con la Gs y transpiración caída. Finalmente, a las 96 horas se sigue observando una tendencia parecida a las 48 horas.

24 horas



48 horas



96 horas

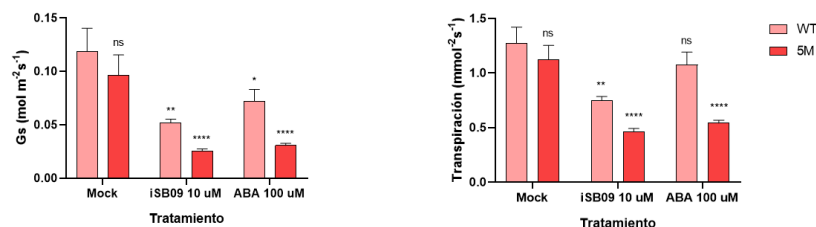


Fig. 12 **La aplicación foliar de iSB09 y ABA mediante pulverización reduce la pérdida de agua.** Conductancia estomática (Gs) y transpiración (E) tras la aplicación de los tratamientos a 24, 48 y 96 h. Los asteriscos indican significancia estadística (ns p-valor > 0.05; \* p-valor ≤ 0.05; \*\* p-valor ≤ 0.01; \*\*\* p-valor ≤ 0.001; \*\*\*\* p-valor ≤ 0.0001) en la prueba post-hoc de Dunnet de comparaciones múltiples en comparación al control WT. Los valores representan la media ± el error estándar (Standard Error of the Mean; SEM).

En la Fig. 13, se muestran los resultados de un PCA de las plantas 5M y WT después de 72 horas de ser tratadas con iSB09 10 μM y ABA 100 μM con los datos de transpiración, Gs y tasa fotosintética. El PCI explica el 88.1% de la varianza total, lo que indica que la mayor parte de la variabilidad en los datos se captura en esta primera dimensión. Los tratamientos con ABA e iSB09 tienden a agruparse más cerca entre sí y hacia la izquierda del gráfico (con valores negativos del PCI). Se observa una separación visible entre los genotipos WT y 5M, especialmente en el control, lo que puede indicar un efecto en el genotipo *per se*. La gran varianza explicada por el PCI indica que la mayor parte de las diferencias observadas se deben probablemente a los efectos del tratamiento. Esta visualización permite observar las diferencias en la respuesta global entre las plantas WT y 5M bajo los distintos tratamientos, además de la similitud entre los efectos de ABA e iSB09 en contraste con el control.

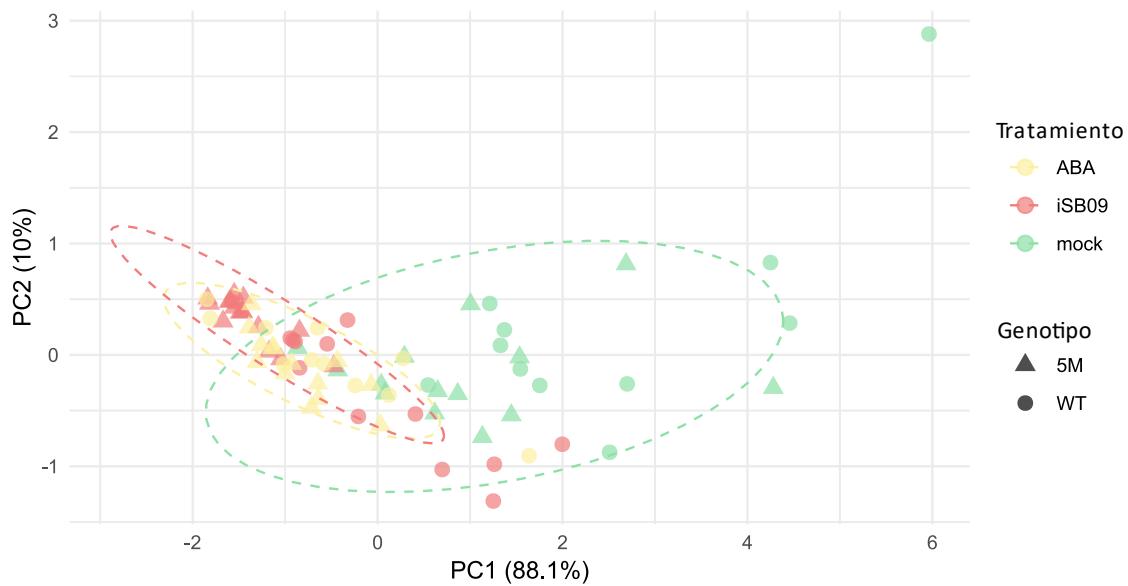
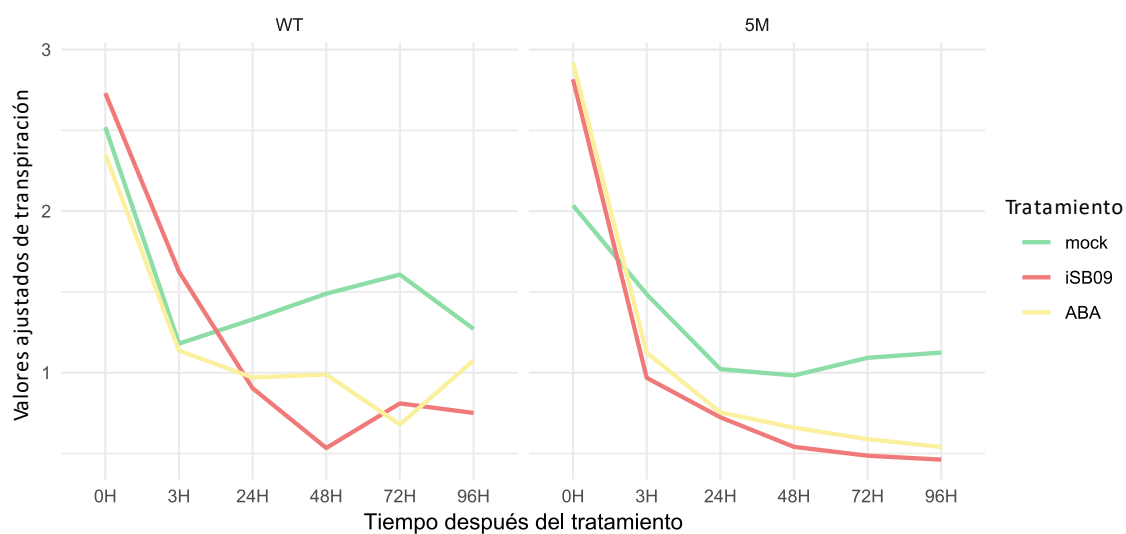


Fig. 13 **Análisis de Componentes Principales (PCA) de la respuesta de plantas 5M y WT a ABA e iSB09.** Se muestran las dos componentes principales (PC1 y PC2) a las 72 horas post-tratamiento. Los puntos representan muestras individuales, coloreados según el tratamiento (ABA en amarillo, iSB09 en rojo, y control (mock) en verde) y con formas distintas para cada genotipo (5M como triángulos y WT como círculos). Las elipses engloban el 95% de confianza para cada grupo de tratamiento-genotipo.

En el modelo de regresión lineal se ha analizado cómo la transpiración varía en función del tiempo, tratamiento, genotipo y sus interacciones ( $E \sim \text{tiempo} * \text{tratamiento} * \text{genotipo}$ ). El valor de  $R^2$  ajustado es de 0.7475, lo que significa que el modelo explica aproximadamente el 74.75% de la variabilidad en los datos. El p-valor general del modelo es  $< 2.2e-16$ , indicando que el modelo es estadísticamente significativo. Todos los niveles de tiempo son altamente significativos, por lo que existen cambios en la transpiración a lo largo del experimento. El genotipo 5M es significativamente diferente del WT (p-valor= 0.001139). Sin embargo, por sí solos, el iSB09 y el ABA no muestran efectos significativos entre ellos, aunque ambos tratamientos muestran interacciones significativas con las plantas 5M. En la Fig. 14, se comparan las respuestas fisiológicas predichas según el modelo de ambos genotipos a los diferentes tratamientos. Se observan patrones distintos de regulación de la transpiración entre WT y 5M, así como efectos diferenciales de iSB09 y ABA en cada genotipo.



**Fig. 14 Dinámica temporal de la transpiración en genotipos WT y 5M bajo diferentes tratamientos.** Se muestran los valores ajustados de transpiración para las plantas WT y 5M en respuesta a tres tratamientos: control (mock), iSB09 y ABA. Las mediciones se realizaron a intervalos específicos durante 96 horas después del tratamiento. Las líneas representan la tendencia de los valores ajustados de transpiración a lo largo del tiempo para cada combinación de genotipo y tratamiento.

Estos resultados se ven reafirmados por los observados mediante termografía. En la Fig. 15a, se observan imágenes termográficas de plantas WT y 5M a diferentes tiempos (0, 3, 24, 48, 72 y 96 horas) después de la aplicación de los tratamientos con DMSO, iSB09 y ABA. Las imágenes muestran un aumento gradual de la temperatura foliar (indicado por colores más cálidos) en las plantas tratadas con iSB09 y ABA en comparación con el control, siendo este efecto más pronunciado en las plantas 5M que en las WT.

En la Fig. 15b, se cuantifica la diferencia de temperatura entre las plantas 5M y las WT control a lo largo del tiempo y con distintos tratamientos. A partir de las 3 horas, tanto iSB09 como ABA inducen un aumento significativo de la temperatura foliar en comparación con el control. El efecto de aumento de temperatura es máximo a las 72 horas para ambos compuestos. El iSB09 muestra un efecto más potente que el ABA en el aumento de temperatura foliar en todos los tiempos, teniendo en cuenta que la concentración de éste es 10 veces menor. A las 96 horas el efecto comienza a disminuir, aunque sigue siendo significativo para ambos compuestos.

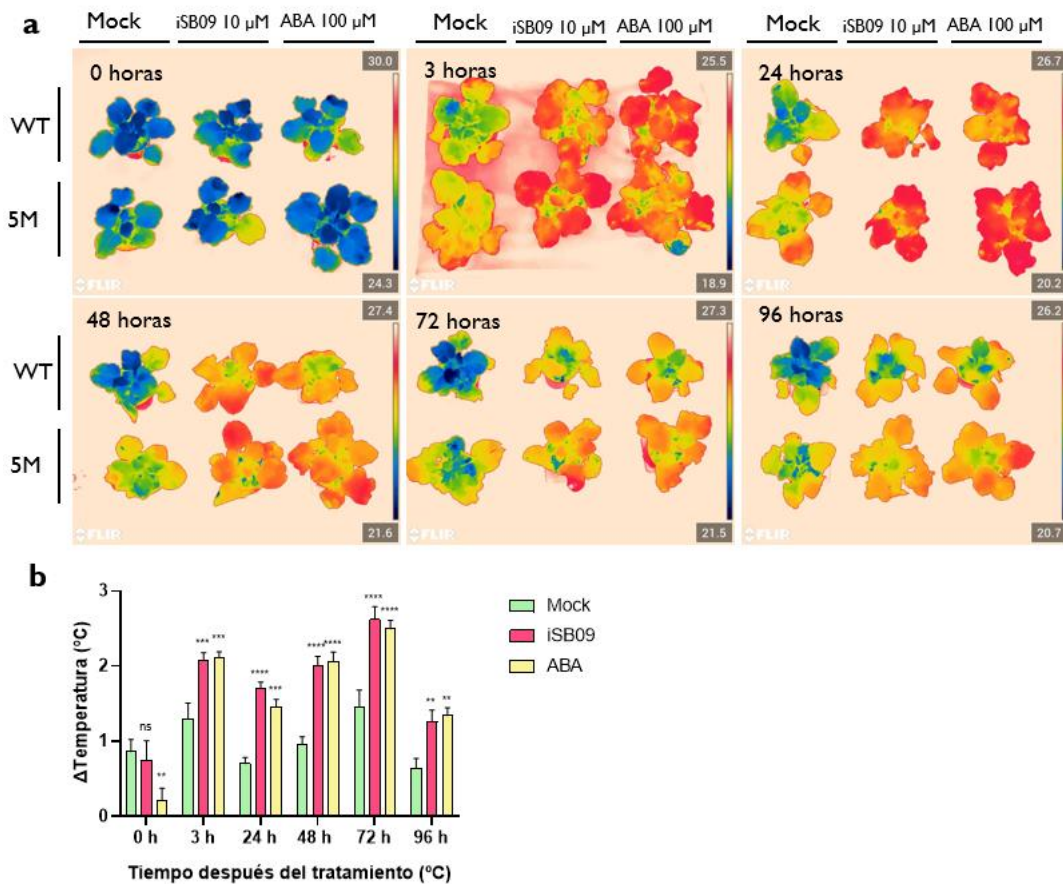


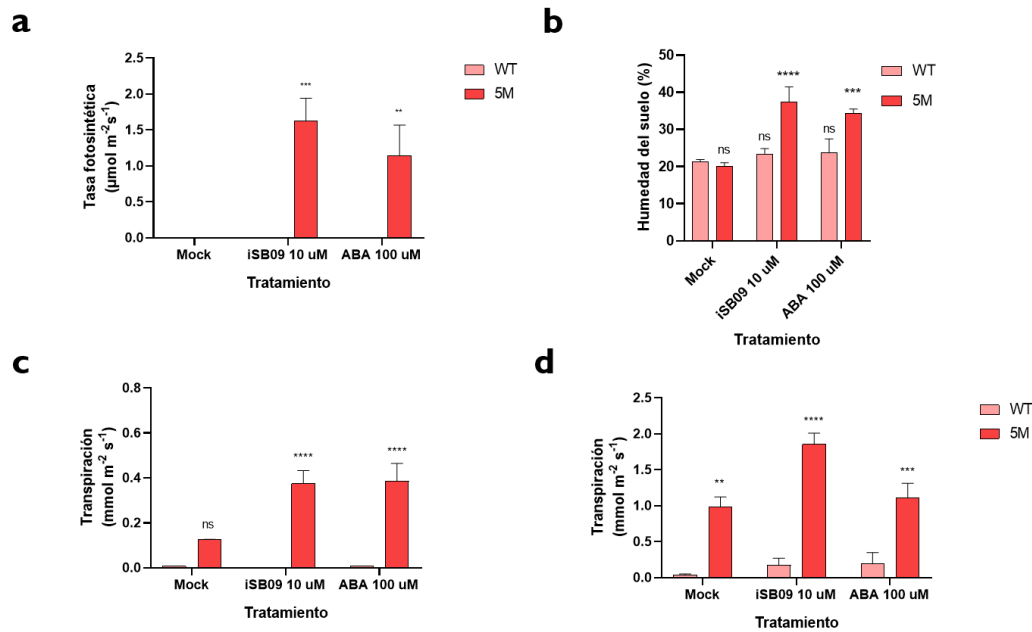
Fig. 15 **Temperatura foliar cuantificada con cámara de infrarrojos FLIR.** a) Termografía de plantas de dos semanas tras la aplicación los tratamientos a 0, 3, 24, 48, 72 y 96 h. b) Diferencia de temperatura de plantas 5M y WT control a cada hora (con riego). Los asteriscos indican significancia estadística (ns p-valor > 0.05; \* p-valor ≤ 0.05; \*\* p-valor ≤ 0.01; \*\*\* p-valor ≤ 0.001; \*\*\*\* p-valor ≤ 0.0001) en el test post-hoc de Dunnet en comparación a las plantas 5M control a cada hora.

En los experimentos con déficit hídrico también se muestra un efecto de protección de las plantas 5M con agonistas (Fig. 16). Las plantas 5M tratadas con iSB09 y ABA mantienen tasas fotosintéticas significativamente más altas que las plantas WT después de 12 días sin riego (Fig. 16a). El efecto es más pronunciado con iSB09 que con ABA, aunque ambos tratamientos muestran un aumento significativo en comparación con el control. Tras 6 días sin riego, el porcentaje de humedad del suelo en las macetas con plantas 5M tratadas con iSB09 y ABA es significativamente mayor que en las macetas con plantas WT, según se observa en la Fig. 16b. Esto indica que las plantas 5M tratadas conservan mejor el agua del suelo. El efecto es más notable con iSB09 que con ABA.

Respecto a la transpiración, las plantas 5M muestran tasas de transpiración significativamente más altas que las WT después de 15 días de sequía cuando son tratadas con iSB09 o ABA. Tras el riego, posterior a los 15 días de sequía, las plantas 5M muestran tasas de transpiración significativamente más altas que las WT en todos los tratamientos,



incluyendo el control. El aumento es más pronunciado en el tratamiento con iSB09, seguido por ABA y luego el control.



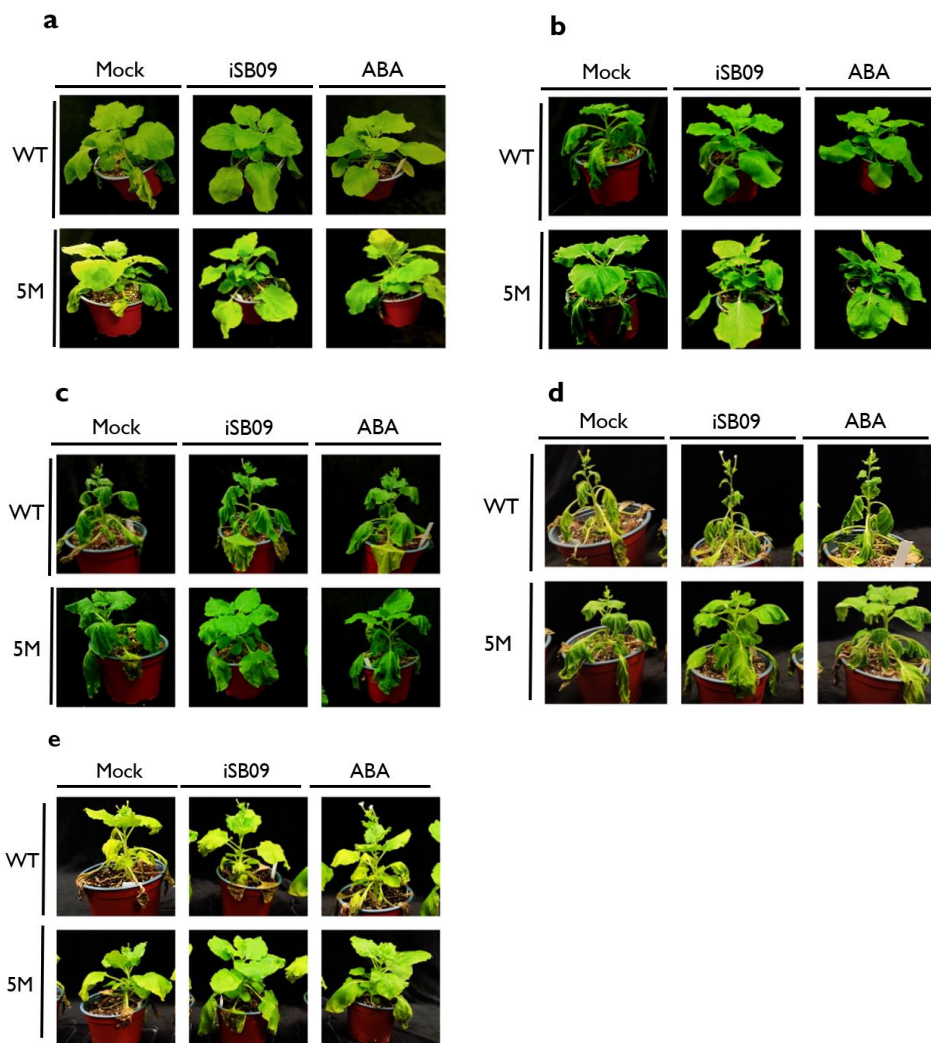
**Fig. 16 Los parámetros fisiológicos se mantienen en sequía en plantas tratadas con iSB09 10  $\mu\text{M}$  y ABA 100  $\mu\text{M}$ .** a) Las tasas fotosintéticas de las plantas 5M tratadas con iSB09 y ABA se mantienen tras 12 días sin riego. b) Porcentaje de humedad en el suelo tras 6 días sin riego. c) Las plantas 5M siguen transpirando a niveles basales tras 12 días sin riego. d) Transpiración después del riego tras 15 días de sequía. Los asteriscos indican significancia estadística (ns  $p$ -valor  $> 0.05$ ; \*  $p$ -valor  $\leq 0.05$ ; \*\*  $p$ -valor  $\leq 0.01$ ; \*\*\*  $p$ -valor  $\leq 0.001$ ; \*\*\*\*  $p$ -valor  $\leq 0.0001$ ) en el test post-hoc de Dunnet de comparaciones múltiples en comparación al WT (a, c y d) y el test post-hoc de Sidak en comparación al WT (b). Los valores representan la media  $\pm$  SEM.

La apariencia física de las plantas coincidió con la información de la termografía y del análisis IRGA, según se observa en la Fig. 17. Las plantas 5M se observan más turgentes y tienen una mayor retención de agua frente a las WT. Además, se observa un menor marchitamiento en las plantas que han tenido tratamientos con ABA e iSB09, especialmente con este último. La recuperación tras el riego después de la sequía es mayor en las plantas 5M y en las que han tenido tratamiento.

Las plantas WT control tratadas con DMSO muestran signos claros de estrés hídrico, mientras que las tratadas con iSB09 y ABA parecen menos afectadas. Las plantas 5M muestran mayor respuesta en los tratamientos con iSB09 y ABA. Las plantas tras 7 días sin agua (Fig. 17b) muestran que el estrés es más evidente en las plantas control WT, mientras que las 5M mantienen mejor su turgencia, especialmente con los tratamientos de iSB09 y ABA.

En las plantas después de 12 días sin agua las diferencias son más pronunciadas (Fig. 17c). Las plantas WT muestran marchitez severa en todos los tratamientos. Las plantas 5M, especialmente las tratadas con iSB09 y ABA, mantienen mejor su turgencia. Las plantas tras 15 días sin agua WT están severamente marchitas en todos los tratamientos (Fig. 17d). Las plantas 5M, aunque visiblemente estresadas, mantienen mejor su estructura, particularmente con iSB09 y ABA.

Tras el riego después de 15 días de sequía (Fig. 17e), las plantas control WT muestran poca recuperación, mientras que las tratadas con iSB09 y ABA se recuperan parcialmente. Las plantas 5M muestran una recuperación notable en todos los tratamientos, siendo más evidente en las tratadas con iSB09 y ABA.



**Fig. 17 La aplicación foliar de iSB09 mediante pulverización mejora la resistencia a sequía.** Plantas de dos semanas después de 6 (a), 7 (b), 12 (c) y 15 (d) días sin agua. e) Recuperación de las plantas tras el riego después de 15 días de sequía.



## Búsqueda de nuevos compuestos

Los compuestos estudiados activan la señalización de ABA, según se observan en los ensayos de luciferasa de la Fig. 18a, a 100 y 200  $\mu\text{M}$ . No existen diferencias significativas en la germinación frente a los no tratados y tampoco con la longitud de la radícula. Sin embargo, sí que se observa una tendencia en cuanto a un menor crecimiento de los pelos radiculares en el compuesto I frente a aquellas sin tratar o tratadas con ABA. Este fenotipo se observó desde las 24 h hasta la semana que duró el experimento. Por otro lado, no se observa una inhibición de la actividad fosfatasa con ninguno de los compuestos.

Finalmente, se observa una fuerte activación transcripcional en los genes marcadores de respuesta a ABA RAB18, LEA y P5CS (Fig. 18b). Esta activación se ve acentuada sobre todo en el compuesto I.

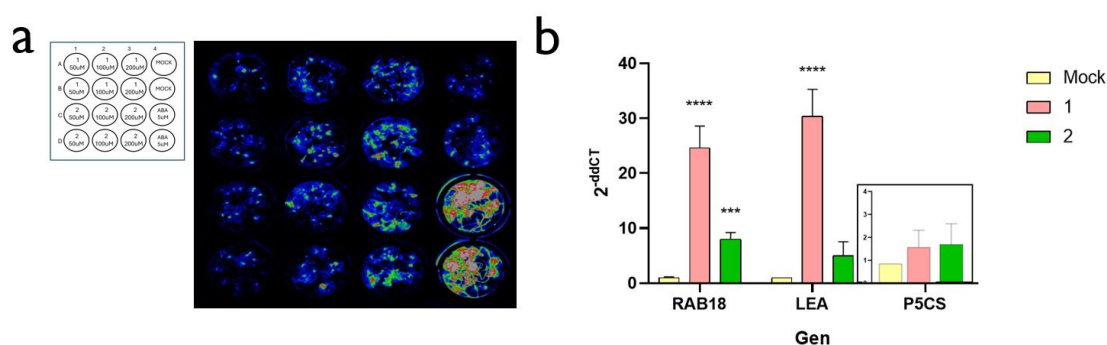


Fig. 18 **Los compuestos 1 y 2 activan la señalización de ABA.** a) Imagen del ensayo de actividad luciferasa con *A. thaliana* y los compuestos a distintas concentraciones (Imagen elaborada por la Dra Constanza Vasquez y el Dr Alberto Coego). b) Resultados de la RT-qPCR revelan activación transcripcional de genes de respuesta a ABA. Los asteriscos indican significancia estadística (ns  $p$ -valor  $> 0.05$ ; \*  $p$ -valor  $\leq 0.05$ ; \*\*  $p$ -valor  $\leq 0.01$ ; \*\*\*  $p$ -valor  $\leq 0.001$ ; \*\*\*\*  $p$ -valor  $\leq 0.0001$ ) en el test post-hoc de Dunnet en comparación al control.

## 4. Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran el potencial de la sobreexpresión del receptor *CsPYLI*<sup>5m</sup> de ABA en *Nicotiana benthamiana*, combinado con el uso del agonista iSB09, para mejorar la tolerancia a la sequía en plantas.

La transformación genética de *N. benthamiana* con la construcción *pAlligator2-35S:HACsPYLI*<sup>5m</sup> fue exitosa, logrando obtener líneas estables que expresan la proteína de interés. Esto proporciona una base sólida para estudiar los efectos de la

sobreexpresión de este receptor modificado de ABA en la fisiología de una planta de interés biotecnológico.

Los ensayos de germinación realizados con ABA e iSB09 revelaron diferencias importantes en la inhibición del crecimiento entre las semillas transgénicas (5M) y las no transformadas (WT). A partir de 1  $\mu\text{M}$  de ABA, se observó inhibición en ambas. Sin embargo, con iSB09 se observaron diferencias más marcadas. Las semillas 5M mostraron una inhibición en el establecimiento ya a dosis bajas de agonista (iSB09 1  $\mu\text{M}$ ), a diferencia de las WT, que solo se inhibieron a partir de 10  $\mu\text{M}$  (Fig. 11). Estos resultados sugieren que las semillas transgénicas 5M tienen reforzada la señalización de ABA mediada por iSB09. Esto es coherente con estudios previos que han demostrado el papel crucial del ABA en la regulación de la dormición y germinación de semillas (Ali et al., 2022; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Rodríguez-Gacio et al., 2009). El ABA activa genes relacionados con la dormición y reprime genes asociados con la germinación (Yang et al., 2023). Además, inhibe la síntesis y señalización de giberelinas, previene la imbibición de la semilla y controla el ciclo celular (Piskurewicz et al., 2008).

Los experimentos de aplicación foliar de iSB09 y ABA proporcionaron evidencia sólida sobre los efectos fisiológicos de estos compuestos en plantas adultas. Se observó un cierre estomático más prolongado en las plantas 5M tratadas con iSB09, que se mantuvo hasta 96 horas después de la aplicación (Fig. 12). Este efecto se confirmó tanto mediante mediciones de transpiración, como por termografía infrarroja (Fig. 15), que mostró un aumento significativo en la temperatura foliar de las plantas 5M tratadas con iSB09. Estos resultados indican que la combinación de la sobreexpresión del receptor PYLI<sup>5m</sup> y el tratamiento con iSB09 produce una respuesta más sostenida en el control estomático, lo que podría contribuir a una mayor eficiencia en el uso del agua. Esto se ve apoyado por estudios anteriores del laboratorio (Lozano-Juste et al., 2023; Sanchez-Olvera et al., 2024).

Un hallazgo particularmente interesante fue la capacidad de las plantas 5M tratadas con iSB09 para mantener tasas fotosintéticas más altas durante periodos prolongados de sequía. Después de 12 días sin riego (Fig. 17), estas plantas mostraron una actividad fotosintética significativamente mayor en comparación con las plantas WT y las tratadas solo con ABA. Además, tras la rehidratación, las plantas 5M exhibieron una recuperación más rápida y eficiente de la fotosíntesis. Estos resultados sugieren que la combinación

de la sobreexpresión del receptor PYLI<sup>5m</sup> y el tratamiento con iSB09 no solo disminuye la pérdida de agua, sino que también ayuda a mantener la capacidad fotosintética en condiciones de estrés hídrico. Es importante recalcar que a pesar de la similitud en la respuesta fisiológica de las plantas tratadas con ABA e iSB09, la concentración era de 10 veces mayor, lo que muestra la potencia y eficacia de este agonista sobre las plantas 5M. Las plantas 5M sin tratamiento de agonista también señalan hacia una tendencia de protección. Anteriormente se ha descrito que la sobreexpresión de receptores de ABA, sin combinación con agonistas, tienen efecto protector (Zhang et al., 2022).

Las especies con más habilidades competitivas, hablando desde un punto ecológico, tienen una mayor capacidad de adquisición de los recursos. Estas especies, como puede ser *N. benthamiana*, tienen una  $G_{s_{max}}$  y tasa fotosintética más alta ante situaciones con muchos recursos hídricos y un cierre estomático más sensible en situaciones de déficit hídrico (Henry et al., 2019). Esto hace que esta especie pueda mantener la tasa fotosintética en condiciones de estrés hídrico moderado, hasta los 7 días sin riego. Después, solamente las plantas 5M que habían recibido tratamiento con ABA 100  $\mu$ M o iSB09 10  $\mu$ M mantuvieron las tasas fotosintéticas en los días posteriores. Esto parece señalar a un efecto de *priming* o acondicionamiento.

En resumen, los resultados muestran que el tratamiento con iSB09 tiene un efecto significativo en la fisiología de las plantas, especialmente en las plantas transgénicas 5M. La interacción entre el genotipo, el tratamiento y el tiempo es clave para comprender las diferencias en la respuesta fotosintética y en la resistencia a la sequía. Las plantas 5M tratadas con iSB09 demostraron una mayor resiliencia frente a condiciones de estrés hídrico en comparación con las plantas WT y aquellas tratadas con ABA.

Los compuestos 1 y 2 presentan un potencial como bioestimulantes para aumentar la señalización del ácido abscísico y la tolerancia a estrés en plantas. En los ensayos iniciales de luciferasa, dos compuestos mostraron actividad prometedora en la activación de dicha señalización. A pesar de esto, no se observó inhibición de las fosfatasa PP2C, lo que sugiere que estos compuestos no actúan uniéndose directamente a los receptores. Finalmente, ambos compuestos, especialmente el compuesto 1, provocaron una fuerte activación de genes marcadores de respuesta a ABA, indicando su importancia en la expresión génica relacionada con el estrés abiótico. En estudios anteriores, se ha visto la relación del compuesto 1 con el estrés y la señalización de ROS, por lo que se

hipotetiza que pueda estar conectado con el ABA. Además, se ha visto anteriormente que el compuesto 2 se induce en las células guarda de los estomas en presencia de ABA. Estos hallazgos son prometedores en el campo de la señalización hormonal por estrés. El siguiente paso en el laboratorio es analizar el RNA-seq con estos compuestos para estudiar los cambios inducidos en el transcriptoma.

## 5. Conclusiones

**1. Expresión estable de CsPYLI<sup>5m</sup> mediante la transformación genética de *N. benthamiana*.** La transformación genética en *N. benthamiana* se llevó a cabo de manera exitosa. Se han conseguido líneas no segregantes con la integración estable del transgén y la expresión de la proteína de interés, 3HA-CsPYLI<sup>5m</sup>.

**2. Inhibición de la germinación del ABA e iSB09 en la germinación.** Los ensayos de germinación mostraron que las semillas transgénicas 5M y las WT responden de manera diferente a los tratamientos con ABA e iSB09. Las semillas 5M fueron más sensibles a iSB09 ya a dosis bajas de agonista, mientras que las WT solo mostraron inhibición a partir de 10  $\mu$ M.

**3. Cierre estomático y fotosíntesis.** Los experimentos de pulverización con agonistas revelaron que tanto el ABA como el iSB09 indujeron un cierre estomático significativo en plantas 5M y WT. Sin embargo, las plantas 5M mostraron un cierre estomático más prolongado, especialmente con iSB09, afectando a la transpiración por un periodo más largo que en las WT.

**4. Resistencia a la sequía.** Las plantas 5M tratadas con iSB09 y ABA mostraron una mayor resistencia a la sequía, manteniendo la tasa fotosintética durante más tiempo en condiciones de estrés hídrico. Tras la rehidratación, las plantas 5M mostraron una recuperación fotosintética más rápida y efectiva que las WT.

**5. Interacción tratamiento-genotipo-tiempo.** Los resultados del análisis estadístico revelaron efectos significativos del tratamiento, el genotipo y el tiempo sobre los parámetros fisiológicos. La interacción entre estas variables demostró que el tratamiento con iSB09 afecta de manera diferencial a las plantas 5M en comparación con las WT, particularmente en términos de fotosíntesis y respuesta al cierre estomático.

**6. Se han descubierto dos compuestos de origen natural identificados mediante computación de alto rendimiento con potencial de protección frente a la sequía.** Los compuestos 1 y 2 activan la señalización de ABA.

**7. Los resultados de este Trabajo de Fin de Máster demuestran el potencial de los abordajes genéticos-químicos en la resistencia a estreses abióticos, como la sequía.**

## Bibliografía

- Ali, F., Qanmber, G., Li, F., & Wang, Z. (2022). Updated role of ABA in seed maturation, dormancy, and germination. *Journal of Advanced Research*, 35, 199-214. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.03.011>
- Bally, J., Jung, H., Mortimer, C., Naim, F., Philips, J. G., Hellens, R., Bombarely, A., Goodin, M. M., & Waterhouse, P. M. (2018). The Rise and Rise of *Nicotiana benthamiana*: A Plant for All Reasons. *Annual Review of Phytopathology*, 56(1), 405-426. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-050141>
- Belda-Palazon, B., Gonzalez-Garcia, M.-P., Lozano-Juste, J., Coego, A., Antoni, R., Julian, J., Peirats-Llobet, M., Rodriguez, L., Berbel, A., Dietrich, D., Fernandez, M. A., Madueño, F., Bennett, M. J., & Rodriguez, P. L. (2018). PYL8 mediates ABA perception in the root through non-cell-autonomous and ligand-stabilization-based mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(50). <https://doi.org/10.1073/pnas.1815410115>
- Bensmihen, S., To, A., Lambert, G., Kroj, T., Giraudat, J., & Parcy, F. (2004). Analysis of an activated ABI5 allele using a new selection method for transgenic *Arabidopsis* seeds. *FEBS Letters*, 561(1-3), 127-131. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00148-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00148-6)
- Burla, B., Pfrunder, S., Nagy, R., Francisco, R. M., Lee, Y., & Martinoia, E. (2013). Vacuolar Transport of Abscisic Acid Glucosyl Ester Is Mediated by ATP-Binding Cassette and Proton-Antiport Mechanisms in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 163(3), 1446-1458. <https://doi.org/10.1104/pp.113.222547>
- Cao, M., Liu, X., Zhang, Y., Xue, X., Zhou, X. E., Melcher, K., Gao, P., Wang, F., Zeng, L., Zhao, Y., Zhao, Y., Deng, P., Zhong, D., Zhu, J.-K., Xu, H. E., & Xu, Y. (2013). An ABA-mimicking ligand that reduces water loss and promotes drought resistance in plants. *Cell Research*, 23(8), 1043-1054. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.95>
- Cao, M.-J., Zhang, Y.-L., Liu, X., Huang, H., Zhou, X. E., Wang, W.-L., Zeng, A., Zhao, C.-Z., Si, T., Du, J., Wu, W.-W., Wang, F.-X., Xu, H. E., & Zhu, J.-K. (2017). Combining chemical and genetic approaches to increase drought resistance in plants. *Nature Communications*, 8(1), 1183. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01239-3>
- Clemente, T. (2006). *Nicotiana* (*Nicotiana tobaccum*, *Nicotiana benthamiana*). En *Agrobacterium Protocols* (pp. 143-154). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:143>
- Cutler, A. J., & Krochko, J. E. (1999). Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Science*, 4(12), 472-478. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(99\)01497-1](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(99)01497-1)
- Fidler, J., Graska, J., Gietler, M., Nykiel, M., Prabucka, B., Rybarczyk-Płońska, A., Muszyńska, E., Morkunas, I., & Labudda, M. (2022). PYR/PYL/RCAR Receptors Play a Vital Role in the Abscisic-Acid-Dependent Responses of Plants to External or Internal Stimuli. *Cells*, 11(8), 1352. <https://doi.org/10.3390/cells11081352>

- Finch-Savage, W. E., & Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, *171*(3), 501-523. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01787.x>
- Finkelstein, R. R., Gampala, S. S. L., & Rock, C. D. (2002). Abscisic Acid Signaling in Seeds and Seedlings. *The Plant Cell*, *14*(suppl 1), S15-S45. <https://doi.org/10.1105/tpc.010441>
- FLIR Systems. (2024). *FLIR Thermal Studio*.
- Fuchs, S., Grill, E., Meskiene, I., & Schweighofer, A. (2013). Type 2C protein phosphatases in plants. *The FEBS Journal*, *280*(2), 681-693. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08670.x>
- Gao, F., Hu, T., Tan, W., Yu, C., Li, Z., Zhang, L., & Duan, L. (2016). Photoprotectant improves photostability and bioactivity of abscisic acid under UV radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *158*, 99-104. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.02.016>
- García-Maquilón, I., Rodríguez, P. L., Vaidya, A. S., & Lozano-Juste, J. (2021). A Luciferase Reporter Assay to Identify Chemical Activators of ABA Signaling (pp. 113-121). [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0954-5\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0954-5_10)
- Gonzalez-Guzman, M., Pizzio, G. A., Antoni, R., Vera-Sirera, F., Merilo, E., Bassel, G. W., Fernández, M. A., Holdsworth, M. J., Perez-Amador, M. A., Kollist, H., & Rodríguez, P. L. (2012). *Arabidopsis* PYR/PYL/RCAR Receptors Play a Major Role in Quantitative Regulation of Stomatal Aperture and Transcriptional Response to Abscisic Acid. *The Plant Cell*, *24*(6), 2483-2496. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.098574>
- González-Guzmán, M., Rodríguez, L., Lorenzo-Orts, L., Pons, C., Sarrión-Perdigones, A., Fernández, M. A., Peirats-Llobet, M., Forment, J., Moreno-Alvero, M., Cutler, S. R., Albert, A., Granell, A., & Rodríguez, P. L. (2014). Tomato PYR/PYL/RCAR abscisic acid receptors show high expression in root, differential sensitivity to the abscisic acid agonist quinabactin, and the capability to enhance plant drought resistance. *Journal of Experimental Botany*, *65*(15), 4451-4464. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru219>
- Goulet, M.-C., Gaudreau, L., Gagné, M., Maltais, A.-M., Laliberté, A.-C., Éthier, G., Bechtold, N., Martel, M., D'Aoust, M.-A., Gosselin, A., Pepin, S., & Michaud, D. (2019). Production of Biopharmaceuticals in *Nicotiana benthamiana*—Axillary Stem Growth as a Key Determinant of Total Protein Yield. *Frontiers in Plant Science*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00735>
- GraphPad Software. (s. f.). *GraphPad Prism version 8.0.0 for Windows*.
- Hadas, A. (2005). GERMINATION AND SEEDLING ESTABLISHMENT. En *Encyclopedia of Soils in the Environment* (pp. 130-137). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-348530-4/00149-1>
- Hao, Q., Yin, P., Li, W., Wang, L., Yan, C., Lin, Z., Wu, J. Z., Wang, J., Yan, S. F., & Yan, N. (2011). The Molecular Basis of ABA-Independent Inhibition of PP2Cs by a Subclass of PYL Proteins. *Molecular Cell*, *42*(5), 662-672. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.05.011>

- Henry, C., John, G. P., Pan, R., Bartlett, M. K., Fletcher, L. R., Scoffoni, C., & Sack, L. (2019). A stomatal safety-efficiency trade-off constrains responses to leaf dehydration. *Nature Communications*, *10*(1), 3398. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11006-1>
- Hewage, K. A. H., Yang, J., Wang, D., Hao, G., Yang, G., & Zhu, J. (2020). Chemical Manipulation of Abscisic Acid Signaling: A New Approach to Abiotic and Biotic Stress Management in Agriculture. *Advanced Science*, *7*(18). <https://doi.org/10.1002/advs.202001265>
- Hirayama, T., & Shinozaki, K. (2007). Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends in Plant Science*, *12*(8), 343-351. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.06.013>
- Jia, K.-P., Mi, J., Ali, S., Ohyanagi, H., Moreno, J. C., Ablazov, A., Balakrishna, A., Berqdar, L., Fiore, A., Diretto, G., Martínez, C., de Lera, A. R., Gojobori, T., & Al-Babili, S. (2022). An alternative, zeaxanthin epoxidase-independent abscisic acid biosynthetic pathway in plants. *Molecular Plant*, *15*(1), 151-166. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.09.008>
- Jiménez-Arias, D., Morales-Sierra, S., Suárez, E., Lozano-Juste, J., Coego, A., Estevez, J. C., Borges, A. A., & Rodríguez, P. L. (2023). Abscisic acid mimic-fluorine derivative 4 alleviates water deficit stress by regulating ABA-responsive genes, proline accumulation, CO<sub>2</sub> assimilation, water use efficiency and better nutrient uptake in tomato plants. *Frontiers in Plant Science*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1191967>
- Klingler, J. P., Batelli, G., & Zhu, J.-K. (2010). ABA receptors: the START of a new paradigm in phytohormone signalling. *Journal of Experimental Botany*, *61*(12), 3199-3210. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq151>
- Lee, S. C., & Luan, S. (2012). ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. *Plant, Cell & Environment*, *35*(1), 53-60. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02426.x>
- Lozano-Juste, J., Alrefaei, A. F., & Rodríguez, P. L. (2020). Plant Osmotic Stress Signaling: MAPKKs Meet SnRK2s. *Trends in Plant Science*, *25*(12), 1179-1182. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.09.003>
- Lozano-Juste, J., García-Maquilón, I., Ruiz-Partida, R., & Rodríguez, P. L. (2020). Drug Discovery for Thirsty Crops. *Trends in Plant Science*, *25*(9), 844-846. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.07.001>
- Lozano-Juste, J., Infantes, L., Garcia-Maquilon, I., Ruiz-Partida, R., Merilo, E., Benavente, J. L., Velazquez-Campoy, A., Coego, A., Bono, M., Forment, J., Pampín, B., Destito, P., Monteiro, A., Rodríguez, R., Cruces, J., Rodríguez, P. L., & Albert, A. (2023). Structure-guided engineering of a receptor-agonist pair for inducible activation of the ABA adaptive response to drought. *Science Advances*, *9*(10). <https://doi.org/10.1126/sciadv.ade9948>
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., & Grill, E. (2009). Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Abscisic Acid Sensors. *Science*, *324*(5930), 1064-1068. <https://doi.org/10.1126/science.1172408>



- Melcher, K., Ng, L.-M., Zhou, X. E., Soon, F.-F., Xu, Y., Suino-Powell, K. M., Park, S.-Y., Weiner, J. J., Fujii, H., Chinnusamy, V., Kovach, A., Li, J., Wang, Y., Li, J., Peterson, F. C., Jensen, D. R., Yong, E.-L., Volkman, B. F., Cutler, S. R., ... Xu, H. E. (2009). A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature*, 462(7273), 602-608. <https://doi.org/10.1038/nature08613>
- Molina-Hidalgo, F. J., Vazquez-Vilar, M., D'Andrea, L., Demurtas, O. C., Fraser, P., Giuliano, G., Bock, R., Orzáez, D., & Goossens, A. (2021). Engineering Metabolism in Nicotiana Species: A Promising Future. *Trends in Biotechnology*, 39(9), 901-913. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.11.012>
- Montoya, F. G., Baños, R., Meroño, J. E., & Manzano-Agugliaro, F. (2016). The research of water use in Spain. *Journal of Cleaner Production*, 112, 4719-4732. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.06.042>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nishimura, N., Hitomi, K., Arvai, A. S., Rambo, R. P., Hitomi, C., Cutler, S. R., Schroeder, J. I., & Getzoff, E. D. (2009). Structural mechanism of abscisic acid binding and signaling by dimeric PYR1. *Science*, 326(1095-9203 (Electronic)), 1373-1379.
- Okamoto, M., Kushiro, T., Jikumaru, Y., Abrams, S. R., Kamiya, Y., Seki, M., & Nambara, E. (2011). ABA 9'-hydroxylation is catalyzed by CYP707A in *Arabidopsis*. *Phytochemistry*, 72(8), 717-722. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.02.004>
- Okamoto, M., Peterson, F. C., Defries, A., Park, S.-Y., Endo, A., Nambara, E., Volkman, B. F., & Cutler, S. R. (2013). Activation of dimeric ABA receptors elicits guard cell closure, ABA-regulated gene expression, and drought tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(29), 12132-12137. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305919110>
- Park, S.-Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D. R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T. F., Alfred, S. E., Bonetta, D., Finkelstein, R., Provart, N. J., Desveaux, D., Rodriguez, P. L., McCourt, P., Zhu, J.-K., Schroeder, J. I., ... Cutler, S. R. (2009a). Abscisic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins. *Science*, 324(5930), 1068-1071. <https://doi.org/10.1126/science.1173041>
- Paul, D., Sanap, G., Shenoy, S., Kalyane, D., Kalia, K., & Tekade, R. K. (2021). Artificial intelligence in drug discovery and development. *Drug Discovery Today*, 26(1), 80-93. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.10.010>
- Piskurewicz, U., Jikumaru, Y., Kinoshita, N., Nambara, E., Kamiya, Y., & Lopez-Molina, L. (2008). The Gibberellic Acid Signaling Repressor RGL2 Inhibits *Arabidopsis* Seed Germination by Stimulating Abscisic Acid Synthesis and ABI5 Activity. *The Plant Cell*, 20(10), 2729-2745. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.061515>
- Pizzio, G. A., Mayordomo, C., Illescas-Miranda, J., Coego, A., Bono, M., Sanchez-Olvera, M., Martin-Vasquez, C., Samantara, K., Merilo, E., Forment, J., Estevez, J.

- C., Nebauer, S. G., & Rodriguez, P. L. (2024). Basal ABA signaling balances transpiration and photosynthesis. *Physiol Plant*, 176(0031-9317 (Linking)), e14494.
- Pizzio, G. A., Mayordomo, C., Lozano-Juste, J., Garcia-Carpintero, V., Vazquez-Vilar, M., Nebauer, S. G., Kaminski, K. P., Ivanov, N. V., Estevez, J. C., Rivera-Moreno, M., Albert, A., Orzaez, D., & Rodriguez, P. L. (2022). PYL1- and PYL8-like ABA Receptors of *Nicotiana benthamiana* Play a Key Role in ABA Response in Seed and Vegetative Tissue. *Cells*, 11(5), 795. <https://doi.org/10.3390/cells11050795>
- Praveen, A., Dubey, S., Singh, S., & Sharma, V. K. (2023). Abiotic stress tolerance in plants: a fascinating action of defense mechanisms. *3 Biotech*, 13(3), 102. <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03519-w>
- R Core Team. (2020). *R: A language and environment for statistical computing*.
- Raghavendra, A. S., Gonugunta, V. K., Christmann, A., & Grill, E. (2010). ABA perception and signalling. *Trends in Plant Science*, 15(7), 395-401. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.04.006>
- Rodrigues, A., Adamo, M., Crozet, P., Margalha, L., Confraria, A., Martinho, C., Elias, A., Rabissi, A., Lumbreras, V., González-Guzmán, M., Antoni, R., Rodriguez, P. L., & Baena-González, E. (2013). ABI1 and PP2CA Phosphatases Are Negative Regulators of Snf1-Related Protein Kinase I Signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 25(10), 3871-3884. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.114066>
- Rodriguez, P. L., Lozano-Juste, J., & Albert, A. (2019). PYR/PYL/RCAR ABA receptors. *Advances in Botanical Research*, 92, 51-82. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2019.05.003>
- Rodríguez-Gacio, M. del C., Matilla-Vázquez, M. A., & Matilla, A. J. (2009). Seed dormancy and ABA signaling. *Plant Signaling & Behavior*, 4(11), 1035-1048. <https://doi.org/10.4161/psb.4.11.9902>
- RStudio Team. (2020). *RStudio: Integrated Development for R*.
- Sanchez-Olvera, M., Martin-Vasquez, C., Mayordomo, C., Illescas-Miranda, J., Bono, M., Coego, A., Alonso, J., Hernández-González, M., Jiménez-Arias, D., Forment, J., Albert, A., Granell, A., Borges, A. A., & Rodriguez, P. L. (2024). ABA-receptor agonist iSB09 decreases soil water consumption and increases tomato CO<sub>2</sub> assimilation and water use efficiency under drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, 225, 105847. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2024.105847>
- Schiavinato, M., Bodrug-Schepers, A., Dohm, J. C., & Himmelbauer, H. (2021). Subgenome evolution in allotetraploid plants. *The Plant Journal*, 106(3), 672-688. <https://doi.org/10.1111/tpj.15190>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Seo, M., & Marion-Poll, A. (2019). *Abscisic acid metabolism and transport* (pp. 1-49). <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2019.04.004>
- Shahin, E. A. (1985). Totipotency of tomato protoplasts. *Theoretical and Applied Genetics*, 69(3), 235-240. <https://doi.org/10.1007/BF00662431>

- Smulders, M. J. M., Rus-Kortekaas, W., & Gilissen, L. J. W. (1993). Development of polysomaty during differentiation in diploid and tetraploid tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants. *Plant Science*.
- Torti, S., Schlesier, R., Thümmler, A., Bartels, D., Römer, P., Koch, B., Werner, S., Panwar, V., Kanyuka, K., Wirén, N. von, Jones, J. D. G., Hause, G., Giritch, A., & Gleba, Y. (2021). Transient reprogramming of crop plants for agronomic performance. *Nature Plants*, 7(2), 159-171. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-00851-y>
- Tossi, V., Cassia, R., Bruzzone, S., Zocchi, E., & Lamattina, L. (2012). ABA says NO to UV-B: a universal response? *Trends in Plant Science*, 17(9), 510-517. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.05.007>
- Vaidya, A. S., Helander, J. D. M., Peterson, F. C., Elzinga, D., Dejonghe, W., Kaundal, A., Park, S.-Y., Xing, Z., Mega, R., Takeuchi, J., Khanderahoo, B., Bishay, S., Volkman, B. F., Todoroki, Y., Okamoto, M., & Cutler, S. R. (2019). Dynamic control of plant water use using designed ABA receptor agonists. *Science*, 366(6464). <https://doi.org/10.1126/science.aaw8848>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.
- Xiong, L., & Zhu, J.-K. (2003). Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis. *Plant Physiology*, 133(1), 29-36. <https://doi.org/10.1104/pp.103.025395>
- Yang, C., Li, X., Chen, S., Liu, C., Yang, L., Li, K., Liao, J., Zheng, X., Li, H., Li, Y., Zeng, S., Zhuang, X., Rodriguez, P. L., Luo, M., Wang, Y., & Gao, C. (2023). ABI5–FLZ13 module transcriptionally represses growth-related genes to delay seed germination in response to ABA. *Plant Communications*, 4(6), 100636. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2023.100636>
- Zhang, Y., Zhao, Y., Li, T., Ni, C., Han, L., Du, P., & Xiao, K. (2022). TaPYL4, an ABA receptor gene of wheat, positively regulates plant drought adaptation through modulating the osmotic stress-associated processes. *BMC Plant Biology*, 22(1), 423. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03799-z>

## **ANEXO I. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030**

### **Anexo al Trabajo de Fin de Grado y Trabajo de Fin de Máster: Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030**

Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

<b>Objetivos de Desarrollo Sostenibles</b>	<b>Alto</b>	<b>Medio</b>	<b>Bajo</b>	<b>No procede</b>
ODS 1. <b>Fin de la pobreza.</b>			<b>X</b>	
ODS 2. <b>Hambre cero.</b>	<b>X</b>			
ODS 3. <b>Salud y bienestar.</b>		<b>X</b>		
ODS 4. <b>Educación de calidad.</b>				<b>X</b>
ODS 5. <b>Igualdad de género.</b>				<b>X</b>
ODS 6. <b>Agua limpia y saneamiento.</b>				<b>X</b>
ODS 7. <b>Energía asequible y no contaminante.</b>				<b>X</b>
ODS 8. <b>Trabajo decente y crecimiento económico.</b>				<b>X</b>
ODS 9. <b>Industria, innovación e infraestructuras.</b>	<b>X</b>			
ODS 10. <b>Reducción de las desigualdades.</b>			<b>X</b>	
ODS 11. <b>Ciudades y comunidades sostenibles.</b>				<b>X</b>
ODS 12. <b>Producción y consumo responsables.</b>		<b>X</b>		
ODS 13. <b>Acción por el clima.</b>	<b>X</b>			
ODS 14. <b>Vida submarina.</b>				<b>X</b>
ODS 15. <b>Vida de ecosistemas terrestres.</b>			<b>X</b>	
ODS 16. <b>Paz, justicia e instituciones sólidas.</b>				<b>X</b>
ODS 17. <b>Alianzas para lograr objetivos.</b>				<b>X</b>

**Descripción de la alineación del TFG/TFM con los ODS con un grado de relación más alto.**

**ODS 2: Hambre Cero**

Mi TFM contribuye directamente a este objetivo ya que busca aumentar la productividad agrícola y la resiliencia de los cultivos frente al cambio climático. Esto es crucial para garantizar la seguridad alimentaria global.

**ODS 9: Industria, Innovación e Infraestructura**

Este trabajo contribuye al avance del conocimiento científico en el campo de la fisiología vegetal y la biología molecular. Los resultados de esta investigación podrían tener aplicaciones en la industria agrícola y biotecnológica.

**ODS 13: Acción por el Clima**

Frente a condiciones climáticas cambiantes, esta estrategia ayuda a los cultivos a adaptarse a condiciones más secas, que son una consecuencia prevista del cambio climático.