



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y  
Celular de Plantas

Caracterización genotípica y fenotípica de mutantes de  
receptores de ABA de *Nicotiana benthamiana* obtenidos  
por mutagénesis con CRISPR/Cas9

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de  
Plantas

AUTOR/A: González Bermúdez, María del Rosario

Tutor/a: Bueso Ródenas, Eduardo

Cotutor/a externo: PIZZIO BIANCHI, GASTON ALFREDO

Director/a Experimental: LOZANO JUSTE, JORGE

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023



**Caracterización genotípica y fenotípica de mutantes doreceptores de ABA de *Nicotiana benthamiana* obtenidos por mutagénesis con CRISPR/Cas9**

**Autora:** María del Rosario González Bermúdez

**Tutor:** Eduardo Bueso Ródenas

**Cotutor externo:** Gastón Alfredo Pizzio Bianchi

**Director experimental:** Jorge Lozano Juste

Valencia, enero de 2023

# ÍNDICE

Resumen

Abstract

Abreviaturas

|  |    |
|--|----|
| 1. Introducción .....  | 1  |
| 1.1. Importancia del estudio de la vía de señalización de ABA .....                                | 1  |
| 1.2. Receptores PYR/PYL .....  | 3  |
| 1.3. Agonistas de los receptores de ABA .....  | 5  |
| 1.4. <i>Nicotiana benthamiana</i> .....  | 6  |
| 1.5. Antecedentes .....  | 8  |
| 1.6. Hipótesis .....   | 10 |
| 2. Objetivos .....   | 11 |
| 3. Material y métodos .....  | 12 |
| 3.1. Material vegetal .....  | 12 |
| 3.2. Extracción de DNA genómico .....  | 12 |
| 3.3. Análisis del DNA genómico editado e identificación de alelos mutantes .....                   | 13 |
| 3.4. Germinación de semillas y cultivo de plántulas .....  | 14 |
| 3.5. Ensayos de germinación y establecimiento .....  | 14 |
| 3.6. Ensayos de crecimiento de raíz y de parte aérea .....   | 15 |
| 3.7. Cultivo <i>in vitro</i> para generar plantas transgénicas de <i>Nicotiana benthamiana</i> ... | 15 |
| 3.7.1. Medios de cultivo .....   | 15 |
| 3.7.2. Esterilización de hojas y preparación de explantes .....                                    | 16 |
| 3.7.3. Infección con <i>Agrobacterium</i> .....  | 16 |
| 3.7.4. Regeneración de callos y brotes .....   | 17 |
| 3.8. Análisis de datos .....   | 18 |
| 4. Resultados .....  | 19 |
| 4.1. Caracterización genotípica de plantas editadas .....  | 19 |
| 4.2. Germinación de plantas editadas .....   | 22 |
| 4.3. Establecimiento de plantas editadas .....   | 22 |
| 4.4. Crecimiento de plantas editadas .....   | 25 |
| 4.5. Cultivo <i>in vitro</i> para generar plantas transgénicas de <i>Nicotiana benthamiana</i> ... | 28 |

|                           |    |
|---------------------------|----|
| 5. Discusión .....        | 31 |
| 5.1. Líneas futuras ..... | 36 |
| 6. Conclusiones .....     | 40 |
| 7. Bibliografía .....     | 42 |
| Índice de figuras         |    |
| Índice de tablas          |    |
| Anexo I                   |    |

## **Caracterización genotípica y fenotípica de mutantes de receptores de ABA de *Nicotiana benthamiana* obtenidos por mutagénesis con CRISPR/Cas9**

### **RESUMEN**

El ácido abscísico (ABA) es la hormona vegetal que regula la transpiración y la apertura estomática bajo estrés por sequía. Por lo tanto, es de vital importancia ahondar en el conocimiento que poseemos sobre el ABA y su vía de señalización asociada para poder mejorar la eficiencia en el uso del agua de las plantas de cosecha de cara a los efectos del cambio climático. La unión del ABA entre los *loops gate* y *latch* de los receptores PYR/PYL desencadena la formación del complejo ternario de alta afinidad receptor-ABA-PP2C, que provoca la inactivación de la fosfatasa PP2C y pone en marcha las cascadas de señalización aguas abajo, con respuestas tanto genómicas como no genómicas. En el presente estudio, se llevó a cabo la caracterización genotípica y fenotípica de mutantes de pérdida de función en varios receptores de la familia PYR/PYL de la planta alotetraploide *Nicotiana benthamiana*. Todas las líneas analizadas tenían cinco mutaciones, localizadas en los genes *NbPYL1a*, *NbPYL1b*, *NbPYL8a*, *b* y *c*. De entre ellas, la línea mutante 10K2.7\_8/*pent3* fue escogida para su caracterización fenotípica. Las semillas de las plantas *pent3* mostraron insensibilidad en la germinación y el establecimiento con respecto a *N. benthamiana* ecotipo silvestre (WT5), usada como control, en presencia de una concentración moderada de ABA. Por otro lado, se midieron otras respuestas a ABA como son la longitud de la raíz, el número de raíces laterales y el peso fresco tanto de la parte radicular como de la parte aérea en ambas líneas en presencia de agonista X, que se une específicamente a receptores de tipo PYL8. Después de 13 días en contacto con el compuesto, la raíz primaria alcanzó una longitud mayor en *pent3*, mientras que no se observaron diferencias destacables con WT5 en el peso fresco de la parte radicular en conjunto. En cuanto a las raíces laterales, las diferencias entre ambas líneas tampoco fueron significativas; sin embargo, el peso fresco de la parte aérea sí que era mayor en *pent3*, con unos 12 mg de diferencia con WT5. Estos resultados indican la existencia fenotipos de insensibilidad parcial a ABA y a agonistas de los receptores de ABA en los mutantes péntuples de genes PYR/PYL estudiados, lo cual pone de manifiesto sus alteraciones en la vía de señalización de ABA y refleja un control redundante de los receptores PYR/PYL sobre la vía en *Nicotiana benthamiana*.

**Palabras clave:**

ABA; PYL; sequía; *Nicotiana benthamiana*; receptores de ABA; edición génica; CRISPR/Cas9; tetraploide; sensibilidad a ABA

## Genotypic and phenotypic characterization of CRISPR/Cas9-edited *Nicotiana benthamiana* ABA-receptor-mutants

### ABSTRACT

Abscisic acid (ABA) is the plant hormone which regulates transpiration and stomatal opening under drought stress. Therefore, it is essential to develop a better understanding on ABA and its signalling pathway in order to improve water use efficiency of crop plants, in view of the challenges posed by climate change. Binding of ABA between the gate and latch loops of PYR/PYL receptors triggers the formation of a receptor-ABA-PP2C high-affinity ternary complex, which causes inactivation of PP2C phosphatase activity and unleashes genomic and non-genomic responses. In the present study, a genotypic and phenotypic characterization was carried out on allotetraploid *Nicotiana benthamiana* PYR/PYL-receptor loss-of-function mutants. All lines analysed contained five mutations, located in *NbPYL1a*, *NbPYL1b*, *NbPYL8a*, *b* and *c* genes. Among them, the mutant line 10K2.7\_8/*pent3* was selected for its phenotypic characterization. The seeds of *pent3* plants showed reduced sensitivity in germination and establishment compared to control wild type (WT5) *N. benthamiana* plants, in the presence of ABA in moderate concentration. On the other hand, other responses to ABA such as primary root length, lateral root number, and fresh weight of root and shoot were measured on both lines in the presence of X agonist, which specifically binds to PYL8-like receptors. After 13 days in contact with the compound, the primary root was longer in *pent3*, while no remarkable differences with WT5 were observed in root fresh weight as a whole. Regarding lateral roots, the difference between both lines was not significant either; however, shoot fresh weight was about 12 mg higher in *pent3* than in WT5. These results indicate the existence of phenotypes of partial insensitivity to ABA and ABA-receptor agonists in the five-PYR/PYL-receptor mutants studied. This highlights alterations in ABA signalling pathway in the mutants and reflects a redundant control of PYR/PYL receptors on the pathway in *Nicotiana benthamiana*.

**Keywords:**

ABA; PYL; drought; *Nicotiana benthamiana*; ABA receptors; gene editing; CRISPR/Cas9; tetraploid; ABA sensitivity

## Abreviaturas

|              |   |
|--------------|---|
| <b>ABA</b>   | ácido abscísico   |
| <b>SnRK2</b> | quinasas 2 relacionadas con SNF-1                       |
| <b>PYR1</b>  | <i>Pyrabactin Resistance 1</i>                          |
| <b>PYL</b>   | <i>PYR1-like</i>  |
| <b>RCAR</b>  | <i>Regulatory Components of ABA Receptors</i>           |
| <b>WT</b>    | <i>wild-type</i>  |
| <b>CTAB</b>  | bromuro de cetiltrimetilamonio                          |
| <b>DAS</b>   | días después de la siembra ( <i>days after sowing</i> ) |
| <b>NAA</b>   | ácido 1-naftalenacético                                 |
| <b>BAP</b>   | 6-bencilaminopurina                                     |
| <b>HOM</b>   | homocigoto  |
| <b>BA</b>    | bialélico   |
| <b>G</b>     | guanina   |
| <b>SEM</b>   | error estándar de la media                              |
| <b>PF</b>    | peso fresco   |
| <b>PEG</b>   | polietilenglicol  |

## 1. Introducción

La sequía supone un grave problema para la agricultura que se ve acentuado por causa del calentamiento global. Con una población mundial en aumento, cada vez es más difícil conseguir una producción de alimentos segura y suficiente. Dado que las actividades agrícolas son las responsables de un gran porcentaje del consumo de agua dulce a nivel global, uno de los puntos clave para acometer dicha cuestión pasa por mejorar la eficiencia del uso del agua de los cultivos.

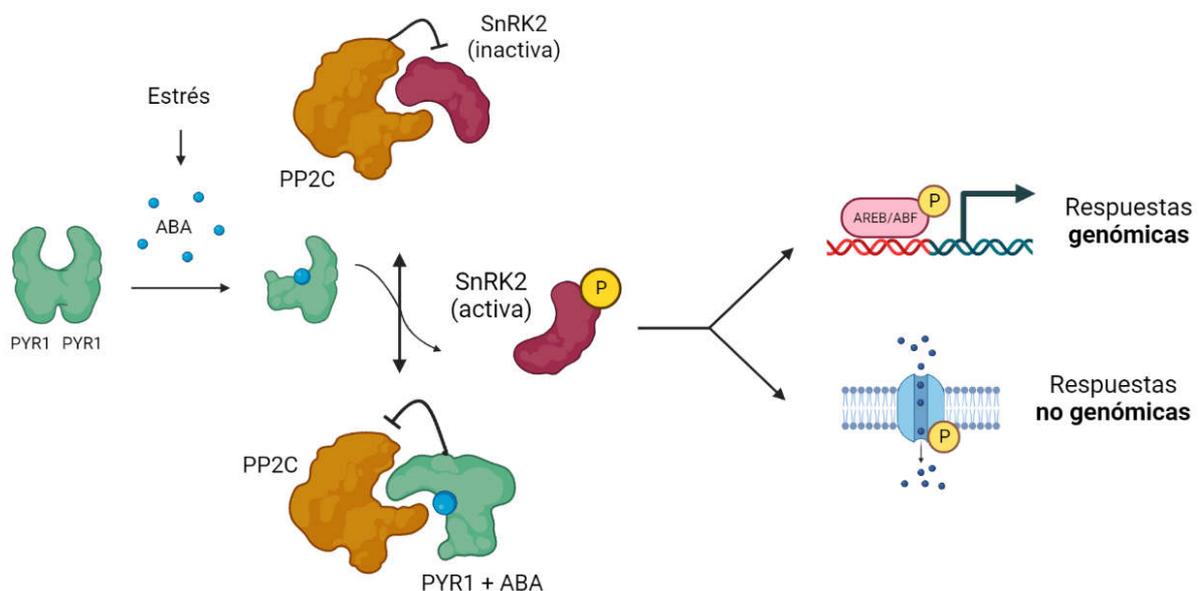
El estudio de mutantes constituye una herramienta experimental muy útil para dilucidar vías de señalización y otros fenómenos fisiológicos que tienen lugar en el interior de las células. Así, en el contexto de la agricultura, la investigación básica en biología celular y molecular aporta unos conocimientos esenciales que facilitan el éxito de las futuras aplicaciones biotecnológicas en campo.

### **1.1. Importancia del estudio de la vía de señalización de ABA**

En las plantas, la pérdida de agua se produce en gran medida a través de los estomas durante el intercambio gaseoso. En condiciones de sequía, las plantas pueden reducir el consumo de agua limitando al mínimo la transpiración a través de los estomas en las hojas. Así, este supone un punto clave cuando se ha de combatir el estrés por sequía. El ácido abscísico (ABA) es la hormona vegetal que regula la transpiración y la apertura estomática en esta situación; por tanto, es de vital importancia ahondar en el conocimiento que poseemos sobre el ABA y su vía de señalización asociada para poder entender y mejorar la eficiencia en el uso del agua de las plantas de cosecha (Yang *et al.*, 2019). La señalización de ABA es una de las dianas de mejora de la tolerancia a estrés por sequía más interesantes (Lozano-Juste, García-Maquilón, Ruiz-Partida y Rodríguez, 2020). Además, poseer ese conocimiento constituye el primer paso para mejorar la respuesta a estreses tanto abióticos como bióticos en las plantas por medio de compuestos bioactivos basados en hormonas vegetales (Hewage *et al.*, 2020).

Desde su descubrimiento en los años 60, esta hormona vegetal ha sido relacionada con una variedad de funciones fisiológicas (Finkelstein y Rock, 2002). El ABA es responsable de la activación de la respuesta a estrés hídrico en plantas vasculares; además de esto, interviene en una variedad de procesos diferentes relacionados con el crecimiento, el desarrollo y la respuesta a estrés biótico, entre otros (Cutler, Rodriguez, Finkelstein y Abrams, 2010).

La señalización de ABA ocurre por medio de un módulo que comprende varios componentes: receptores, fosfatasa de tipo PP2C del clado A, quinasas relacionadas con SNF-1 del tipo 2 (SnRK2) activadas por ABA, y elementos de respuesta a ABA incluyendo factores de transcripción y canales iónicos (Lim, Lim y Lee, 2022). El ABA es percibido cuando se une a receptores solubles de la familia PYRABACTIN RESISTANCE1 (PYR1), PYR1-LIKE (PYL), REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTORS (RCAR) (también conocidos como PYR/PYL). Cuando los niveles de ABA son bajos, los receptores se encuentran libres y las fosfatasa, que actúan como reguladores negativos en la señalización, bloquean las quinasas impidiendo su fosforilación. En esta situación, las SnRK2s se encuentran inactivas. Pero, cuando los niveles de ABA suben y ello es percibido por los receptores, se forma un complejo ternario de alta afinidad formado por el receptor PYR/PYL, ABA y la fosfatasa PP2C. Así, la señalización es desbloqueada, ya que las quinasas SnRK2 pueden ser fosforiladas y, por tanto, activadas, para fosforilar —y activar— a su vez a los elementos efectores aguas abajo, como factores de transcripción que reconozcan cajas de respuesta a ABA en el DNA, o canales iónicos (Fig. 1).



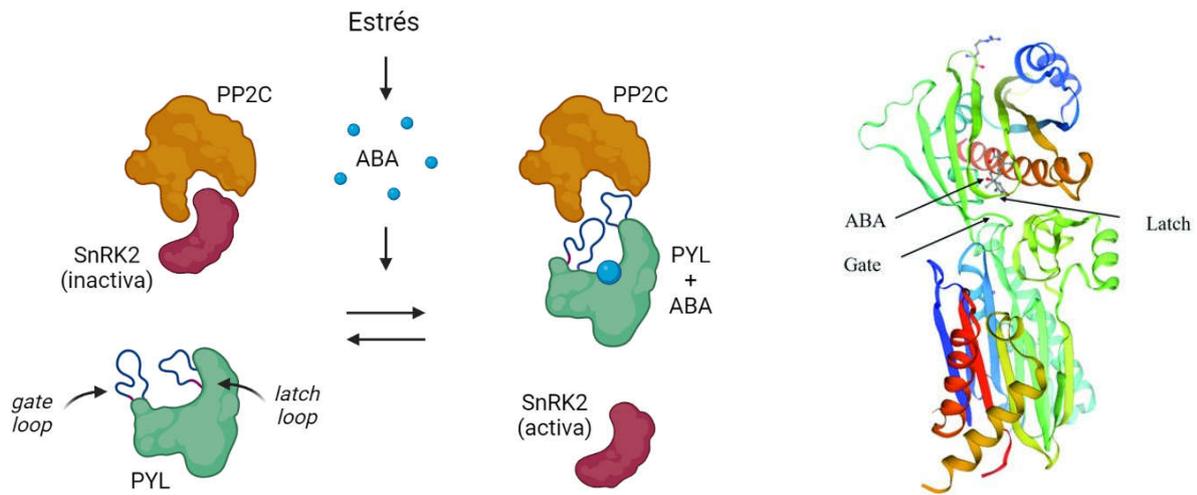
**Figura 1. Esquema simplificado de la vía de señalización de ABA.** De izquierda a derecha, un estrés aumenta los niveles intracelulares de ABA; el ABA se une a un receptor, en este caso dimérico, y lo activa. El receptor de ABA desplaza a la quinasa SnRK2 que estaba interaccionando con la fosfatasa PP2C. La SnRK2, ya libre, puede autofosforilarse, con lo que se encuentra activa para fosforilar a una variedad de proteínas diana aguas abajo, poniendo en marcha respuestas tanto genómicas (por ejemplo, fosforilación de elementos de respuesta a ABA como AREB/ABF) como no genómicas (por ejemplo, fosforilación de canales iónicos transmembrana como SLAC1). Figura de elaboración propia creada con Biorender (<https://biorender.com>), adaptada de Lozano-Juste *et al.* (2021).

Las SnRK2s fosforilan a un gran número de proteínas diana implicadas en la adaptación a estrés. Por tanto, la activación de la vía de señalización de ABA da como resultado una variedad de fenómenos celulares que suceden aguas abajo. En la membrana plasmática, se produce la fosforilación de una serie de transportadores de potasio que promueven la salida del ion  $K^+$  e inhiben su entrada en la célula; esto, unido a la activación de acuaporinas y canales iónicos, llevan a la pérdida masiva de turgencia en las células oclusivas y, con ello, al cierre estomático.

## 1.2. Receptores PYR/PYL

La transducción de la señal de ABA ocurre por medio de los citados receptores PYR/PYL. Las proteínas de tipo PYR/PYL pertenecen a la superfamilia de proteínas con dominio START, caracterizadas por contener una estructura específica con bolsillo hidrofóbico flanqueado por dos *loops* flexibles (el *latch loop* y el *gate loop*) esenciales para que se una un ligando (Fig. 2B) (Cutler *et al.*, 2010; Pizzio *et al.*, 2022). Las características químicas del ABA y la estructura de los receptores hacen posible que se dé el proceso de unión de ligando. La entrada del *gate loop* del receptor PYL en el núcleo catalítico de la fosfatasa PP2C (desplazando a la quinasa sustrato) es necesaria para la formación del complejo ternario de alta afinidad receptor-ABA-PP2C, el cual provoca la inactivación de la actividad fosfatasa de la PP2C y pone en marcha las cascadas de señalización aguas abajo (Fig. 2A) (Lozano-Juste *et al.*, 2021).

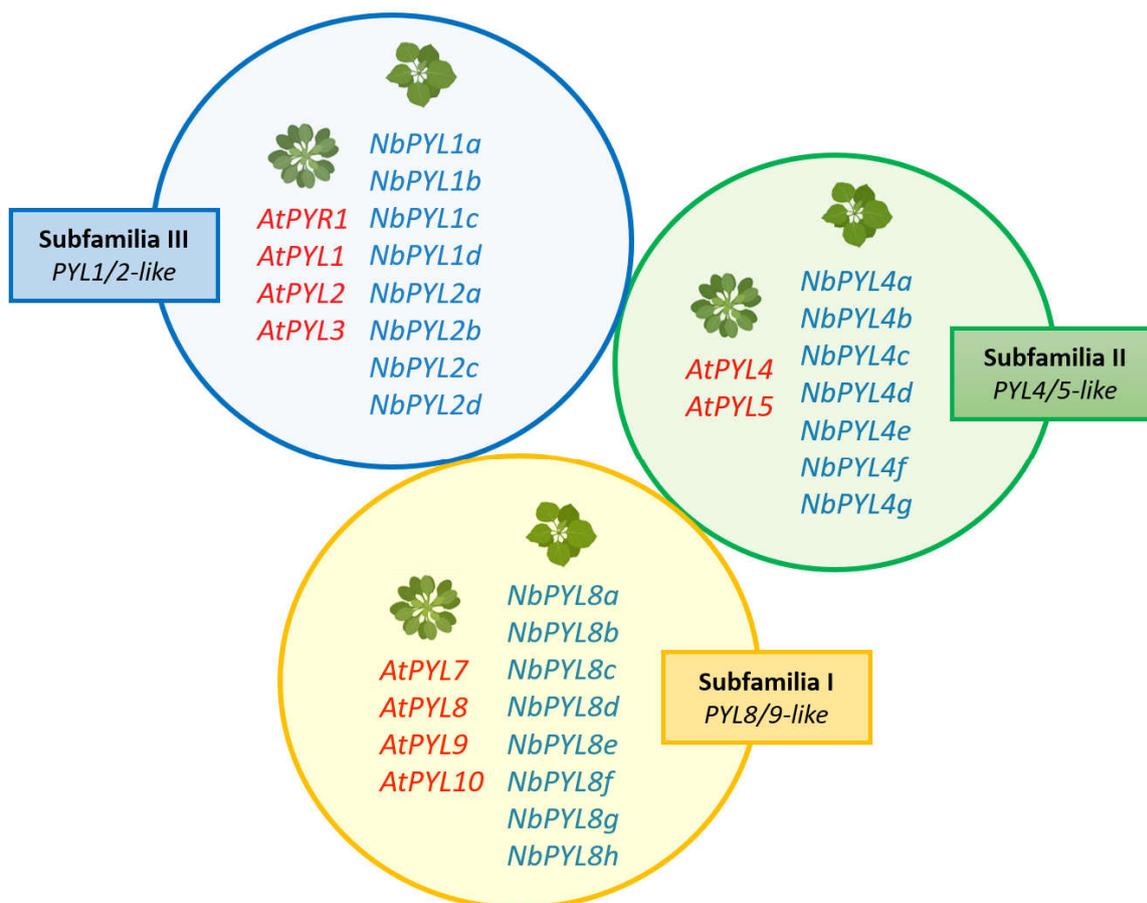
(A) La identificación de los receptores de ABA no fue posible hasta la aplicación de una aproximación de genética química, que mediante el uso del agonista pirabactina permitió romper la redundancia génica que se daba entre ellos (Park *et al.*, 2009). Existen dos tipos de receptores de ABA atendiendo a su estado oligomérico: por un lado, los que funcionan como dímero (PYR1, PYL1, PYL2, PYL3) y, por otro, los que actúan como monómero (PYL4-10). Estos últimos tienen mayor afinidad intrínseca por el ABA; no obstante, cuando las fosfatasas PP2C están presentes, ambos tipos presentan una  $K_d$  en rango nanomolar (Dupeaux *et al.*, 2011). En total son 14 los receptores PYR/PYL capaces de percibir ABA en *A. thaliana* (Fujii *et al.*, 2009), clasificados en tres subfamilias: PYL7-10 (clado I), PYL4-6 y PYL11/12 (clado II) (monoméricos) y PYR1 y PYL1-3 (clado III) (dímeros) (Fig. 3). El papel de cada subfamilia varía según el tejido, y algunas de sus funciones específicas han sido dilucidadas en los últimos años (García-Maquilón *et al.*, 2020). Por ejemplo, PYL8 está implicado en la señalización de ABA en la raíz, y se ha observado que el ABA promueve la estabilización y acumulación de este receptor



**Figura 2. Formación (A) y estructura (B) del complejo ternario ABA-PYL-PP2C.** (A) Esquema de la formación del complejo ternario de alta afinidad formado por el receptor PYL unido a ABA y la fosfatasa PP2C. En la situación inicial, la fosfatasa está interaccionando con la quinasa SnRK2, por lo que esta se encuentra inactiva. En condiciones de estrés, la concentración intracelular de ABA aumenta; este se une al receptor PYL, que mimetiza a SnRK2 al interaccionar con la PP2C a través de los *loops gate* y *latch*. La SnRK2, una vez desplazada, se encuentra activa. Figura de elaboración propia creada con Biorender (<https://biorender.com>), adaptada de Soon *et al.* (2012). (B) Representación esquemática de la estructura del complejo ternario PYL1-ABA-ABI1. La posición del *gate loop*, el *latch loop* y el ABA se indican con flechas. Figura recuperada de Sun *et al.* (2021).

(Belda-Palazón *et al.*, 2018). Otros receptores han sido relacionados con la regulación del cierre estomático por medio de la integración de señales en las células oclusivas, como PYL2, PYL4 y PYL5 (Dittrich *et al.*, 2019).

Como consecuencia de la identificación de la familia PYR/PYL de 14 miembros en *A. thaliana*, se descubrieron otras familias multigénicas de receptores de ABA en diferentes especies de plantas de cosecha, como el tomate (15 miembros), el maíz (13 miembros), el trigo (38 miembros) y la naranja dulce (11 miembros) (García-Maquilón *et al.*, 2020). En *N. benthamiana* se han identificado y anotado 23 miembros de dicha familia génica (Pizzio *et al.*, 2022), pero sus características fisiológicas todavía han sido poco estudiadas (Fig. 3).



**Figura 3. Clasificación de los receptores de ABA en *A. thaliana* y *N. benthamiana*.** Se muestran, para cada subfamilia génica, los miembros conocidos en *A. thaliana* (letras rojas) y en *N. benthamiana* (letras azules). Figura de elaboración propia, adaptada del cladograma de Pizzio *et al.* (2022).

### 1.3. Agonistas de los receptores de ABA

Los análogos funcionales del ABA se han estudiado ampliamente en los últimos años, siendo las estructuras más representativas las sulfonamidas y los derivados de amidas (Liu, Chen, Wei, Guo y Wu, 2022). Los compuestos agonistas de los receptores de ABA pueden tener actividades de distinta naturaleza, como promover el cierre estomático, inhibir la germinación de la semilla o promover la conductividad hidráulica en las raíces (Fan *et al.*, 2015). Así, se ha visto que su uso podría mejorar la tolerancia de las plantas al estrés por sequía, lo que aplicado a plantas de cosecha tiene gran interés.

Park *et al.* (2009) describieron el primer agonista sintético de los receptores de ABA, denominado pirabactina (Fig. 4B). Más tarde, otras moléculas derivadas de sulfonamidas (e. g. quinabactina/AM1) (Fig. 4C), fluoruros derivados de estas últimas (e. g. AMF4) (Fig. 4D) y fosfonamidas análogas a pirabactina fueron desarrolladas, algunas

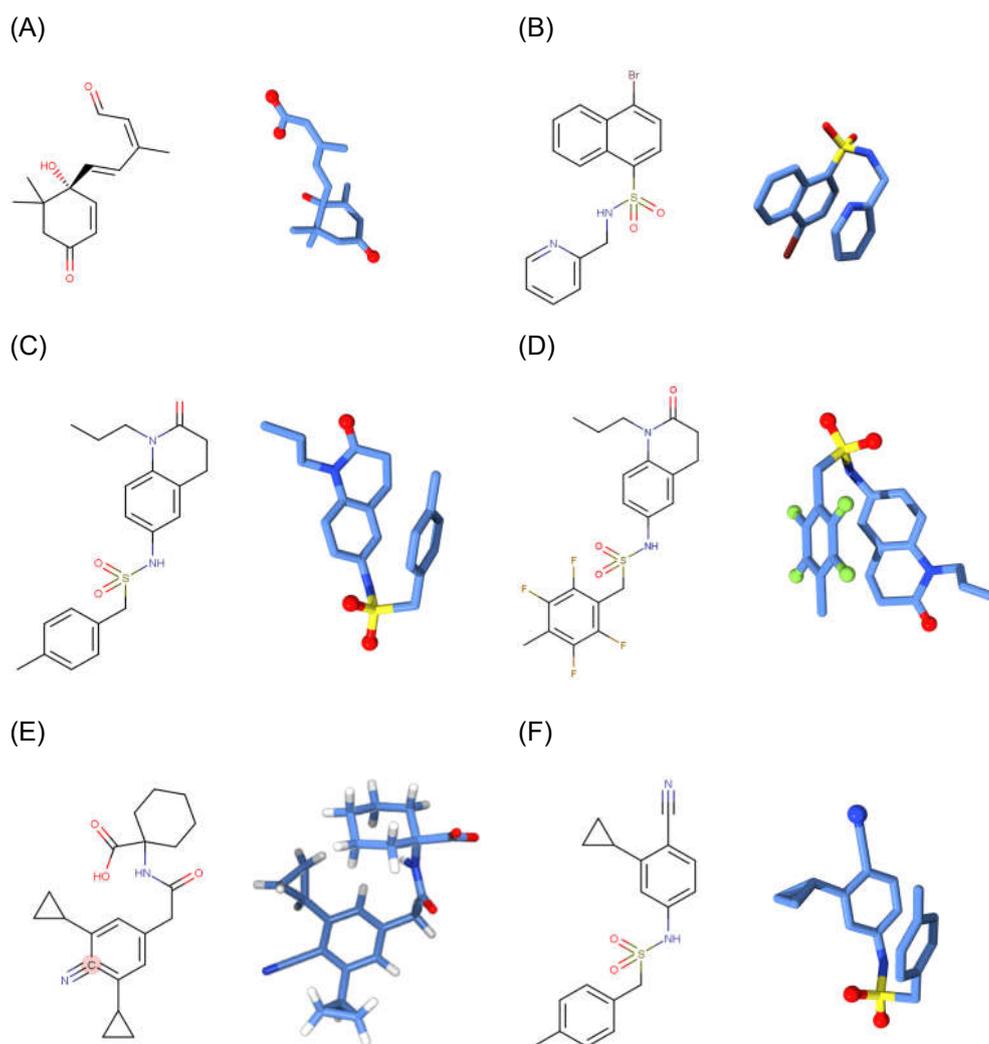
de las cuales se probaron más activas biológicamente que el propio ABA (Liu *et al.*, 2022). Un agonista de los receptores de ABA denominado opabactina (Fig. 4E), con una actividad in vivo al menos 10 veces superior al propio ABA, fue desarrollado en el laboratorio del Dr. Sean Cutler y es el agonista más potente descrito hasta la fecha (Vaidya *et al.*, 2019). Merece especial atención la cianabactina (Fig. 4F), que con una estructura compacta y simple actúa como ligando efectivo de PYR1, activando una variedad de respuestas a ABA que regulan la transpiración (Vaidya *et al.*, 2017).

Los compuestos capaces de activar los receptores PYR/PYL y, por tanto, poner en marcha la vía de señalización de ABA, son un objeto de estudio muy interesante debido a su potencial aplicación en agricultura para reducir el impacto de las sequías en la productividad de los cultivos. En ciertos ensayos del presente trabajo, se empleó un agonista de los receptores de ABA cedido a este laboratorio para fines experimentales, pero que por no haber sido descrito aún en ninguna publicación no se muestran su nombre ni características; a partir de aquí, será denominado “agonista X”. Se trata de un agonista específico de PYL-8.

Aún más allá de la aplicación de ligandos sintéticos, se encuentra la combinación de estos con plantas editadas cuyos receptores respondan mejor a ellos (Cao *et al.* 2017). Este concepto supone una capa adicional de regulación, con las ventajas que ello conllevaría en la productividad de los cultivos.

#### **1.4. *Nicotiana benthamiana***

Es de vital importancia trasladar el conocimiento sobre la vía de señalización de ABA adquirido en *A. thaliana* a plantas de cosecha, donde la información disponible es aún muy limitada (Ruiz-Partida, Rosario y Lozano-Juste, 2021), y la identificación de los receptores de ABA es compleja debido al gran número de genes integrantes de la familia PYR/PYL (Pizzio *et al.*, 2022). La planta modelo *Nicotiana benthamiana* es considerada un *crop* biotecnológico, ya que es ampliamente utilizada en campos diversos como la biomedicina y la industria. Originaria de Australia, *N. benthamiana* es una solanácea alotetraploide cuyo genoma se compone de 19 cromosomas. Análisis de secuencia y transcriptoma de la especie han revelado que surgió de un evento de hibridación entre parentales diploides hace entre 4 y 5 millones de años, pero que la estructura de los subgenomas no se conserva en *N. benthamiana* (Bally *et al.*, 2018; Pizzio *et al.*, 2022).



**Figura 4. Estructuras 2D (izquierda) y 3D (derecha) del ABA y algunos agonistas de receptores de ABA.** (A) ABA (3OQU). (B) Pirabactina (5ZCU). (C) Quinabactina (4LA7). (D) AMF4 (5VSR). (E) Opabactina. (F) Cianabactina (5UR6). Las accesiones de PDB se indican entre paréntesis; disponibles en <https://www.rcsb.org>. Las representaciones en 2D fueron generadas usando MarvinSketch. La representación de la opabactina no está disponible en la base de datos PDB, y fue generada con Schrödinger Maestro y editada con Chimera.

Las plantas del género *Nicotiana*, y en especial *N. benthamiana*, constituyen una buena plataforma de producción o *molecular farming*, con algunos productos mayoritarios cercanos a su comercialización. Esto es debido, entre otras cosas, a que puede ser transformada genéticamente y regenerada de manera muy eficiente y a su capacidad para la expresión transitoria de proteínas, lo que la hace un sistema versátil y accesible con ventajas específicas para la producción y purificación de algunos tipos de proteínas recombinantes (Bally *et al.*, 2015). El método de agroinfiltración en *N. benthamiana* ha

sido adoptado por investigadores para un amplio abanico de aplicaciones, incluyendo ensayos de localización, interacción, expresión y purificación de proteínas. Además, por su hipersusceptibilidad a virus y su idoneidad para experimentos de silenciamiento génico, ha sido desde hace años un modelo principal en investigaciones en interacción planta-patógeno (Goodin *et al.*, 2008). *N. benthamiana* también ha sido utilizada como modelo para el estudio de otros sistemas más difíciles de manipular; por ejemplo, para caracterizar proteínas identificadas en otras especies de interés agronómico.

A pesar de su uso cada vez más frecuente en biología celular y molecular, la acumulación de información genómica y transcriptómica de *N. benthamiana* ha progresado lentamente debido a su genoma aloploide, relativamente grande y complejo, y la falta de financiación para iniciativas no centradas en plantas destinadas a la alimentación humana (Bally *et al.*, 2018). Actualmente, el mayor repositorio de información biológica sobre *N. benthamiana* está disponible en la web de Benthgenome ("Benthmania", 2022). Como su manipulación genética es relativamente sencilla, esta especie fue escogida como punto de partida para identificar los receptores principales que median la señalización de ABA en plantas poliploides.

### **1.5. Antecedentes**

El estudio presentado aquí parte de un proyecto de investigación vigente de este laboratorio, en el cual se investiga la familia génica PYR/PYL de receptores de ABA en *N. benthamiana*. Los trabajos han sido objeto de una publicación reciente (Pizzio *et al.*, 2022), donde se describe el proceso de obtención de mutantes de *N. benthamiana* que estaban afectados en varios de los principales receptores de ABA, así como el inicio de su caracterización fisiológica.

El análisis de la familia de receptores de ABA de 23 miembros de *N. benthamiana* fue abordado a través de un programa de edición génica basado en CRISPR/Cas9 con gRNA multiplexados (Vázquez-Vilar *et al.*, 2016). Inicialmente, se buscó mutar los receptores que se expresaban en mayor medida en la planta, identificados a partir de un experimento de RNA-seq. Los investigadores generaron varios mutantes de alto orden con pérdida de función en los receptores NbPYL1-*like* y NbPYL8-*like*. Además, realizaron una serie de ensayos en los que los mutantes mostraron cierta insensibilidad a ABA para inhibición del establecimiento de plántulas, crecimiento, y desarrollo de parte aérea y raíces laterales, así como sensibilidad reducida al agonista de PYL1 cianobactina (Pizzio *et al.*, 2022).

Posteriormente, en el laboratorio se continuó con la obtención de progenies editadas, y se genotiparon dos mutantes péntuples (*pent1* y *pent2*) cuya fisiología está siendo caracterizada actualmente. Así, aquí se parte de una progenie editada del mismo origen, de la que se sabe que tiene afectados los genes *NbPYL8a-c* en homocigosis. En este trabajo fin de Máster ha sido genotipado e identificado el mutante *pent3* (línea 10K2.7\_8), que tiene los genes *NbPYL1a*, *NbPYL1b*, *NbPYL8a*, *b* y *c* afectados. Además, se ha llevado a cabo su caracterización fenotípica para evaluar su sensibilidad a ABA y a agonistas de los receptores de ABA.

Una parte independiente del presente estudio, aunque dentro de la misma temática, está centrada en una línea de investigación con enfoque genético-químico, cuyo objetivo es desarrollar una herramienta biotecnológica que permita la activación condicional y eficiente de la señalización de ABA. En trabajos previos de investigadores de este laboratorio, en colaboración con otros grupos, se diseñó un receptor de tipo PYL1 de *Citrus sinensis* con afinidad mejorada hacia el agonista de los receptores de ABA sulfobactina. Este receptor incluía cinco sustituciones aminoacídicas que alteraban su función biológica, por lo que fue llamado CsPYL1<sup>5m</sup>. Además, el trabajo experimental derivado de su desarrollo llevó a generar una molécula agonista de los receptores de ABA cuya actividad se veía aumentada en combinación con el receptor editado (sometido a revisión en Science Advances). La aplicación de dicho compuesto a plantas de *A. thaliana* que sobreexpresaban el gen del receptor diseñado (plantas 5m) mostró un potente efecto de reducción de la transpiración, lo que mejoraba la tolerancia a la sequía de las plantas editadas.

En continuación con este proyecto, el siguiente objetivo propuesto en el laboratorio había sido generar plantas de *N. benthamiana* que sobreexpresaran el receptor PYL1 editado que se ha descrito previamente (CsPYL1<sup>5m</sup>). En este trabajo final de Máster se pretendía llevar a cabo un proceso de cultivo *in vitro* para obtener plantas transgénicas de *N. benthamiana* que sobreexpresaran el receptor CsPYL1<sup>5m</sup>, y emplear estas plantas en futuros ensayos de transpiración, en combinación con agonistas de los receptores de ABA, así como en otros tipos de experimentos de caracterización fenotípica.

## **1.6. Hipótesis**

La hipótesis del presente trabajo fue que habría mutantes péntuples para los receptores de la familia PYR/PYL en la progenie editada por CRISPR/Cas9 de la que se partía y que, además, estos mutantes presentarían fenotipos de insensibilidad parcial a ABA y/o a agonistas de los receptores de ABA.

## 2. Objetivos

El primer objetivo general del presente trabajo fue realizar la **caracterización genotípica** de plantas de *Nicotiana benthamiana* con mutaciones en receptores de ABA. En concreto, se persiguieron los objetivos específicos enunciados a continuación:

1. Realizar la secuenciación de los genes diana de una progenie editada por CRIPR/Cas9.
2. Analizar los resultados obtenidos en la secuenciación para identificar las mutaciones presentes en el DNA genómico de las plantas editadas.

El segundo objetivo general fue realizar la **caracterización fenotípica** de las plantas mencionadas. Para ello, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

3. Corroborar la función de los genes mutados como receptores de ABA.
4. Evaluar el efecto de tratamientos con ABA en las primeras fases del desarrollo de la progenie editada de *N. benthamiana*, midiendo el porcentaje de germinación semillas y de establecimiento de plántulas en tales condiciones.
5. Evaluar el efecto de tratamientos con ABA o agonistas de los receptores de ABA en el crecimiento de la progenie editada de *N. benthamiana*, midiendo parámetros como el peso fresco, la longitud de la raíz primaria y el número de raíces laterales.

Como objetivo adicional, se planteó describir un **programa de cultivo *in vitro*** destinado a generar plantas de *N. benthamiana* sobreexpresoras de CsPYL1<sup>5m</sup>, un receptor editado con especial afinidad para ciertos agonistas de los receptores de ABA, que pudiera ser útil en futuros trabajos centrados en la manipulación genético-química de la vía de señalización de ABA.

### **3. Material y métodos**

#### **3.1. Material vegetal.**

Para los experimentos desarrollados en el presente trabajo, se utilizaron plantas de la cepa de laboratorio de *Nicotiana benthamiana* (LAB) y plantas de la misma cepa editadas por CRISPR/Cas9 en trabajos previos del grupo de Pedro Rodríguez Egea (descrito en el apartado 1.5), así como una línea *wild-type* (WT). Las plantas se cultivaron en condiciones controladas en invernadero (16 horas de luz a una temperatura constante de 24 °C, y 8 h de luz a temperatura constante de 20 °C). Las semillas de cada línea fueron recolectadas para la creación de una colección, excepto en aquellas plantas que, por distintos motivos, murieron antes de dar semillas.

Por otro lado, se disponía de las herramientas para obtener plantas transgénicas que sobreexpresaran una variante editada del receptor de ABA CsPYL1 (descrito en el apartado 1.5). Para ello se partió de plantas WT de *Nicotiana benthamiana* que crecieron en las mismas condiciones de invernadero que las líneas editadas con CRISPR/Cas9.

#### **3.2. Extracción de DNA genómico**

La extracción del DNA genómico de cada línea transgénica fue realizada por el método del bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) a partir de 150 mg de hoja. Este método consiste en una variante del protocolo clásico descrito por Murray y Thompson (1980). El tejido, cortado y conservado previamente en tubos Eppendorf de 1,5 ml a -80 °C, fue sumergido en N<sub>2</sub> líquido y molido con un pistilo de plástico. A continuación, se añadieron 300 µl de CTAB (2x), se incubaron los tubos a 60 °C durante 10 min y se añadieron 300 µl de cloroformo:isoamilalcohol (24:1) en cámara de extracción. Tras una centrifugación de 10 min a 13000 rpm, se traspasaron 300 µl de la fase acuosa a tubos nuevos y se añadió a estos 30 µl de CTAB al 10 %. Los tubos se incubaron 2 min a 65 °C; a partir de este punto, se trabajó sobre hielo en todo momento. Se añadieron 660 µl de agua miliQ estéril y se incubaron los tubos en hielo durante 15 min. A continuación, se centrifugaron durante 15 min a 13000 rpm, tras lo cual se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet (que contenía el DNA genómico y CTAB) en 400 µl de NaCl 1M. Se añadieron 800 µl de EtOH al 100 % y se incubaron los tubos a 4 °C durante 15 min. Posteriormente, los tubos se centrifugaron nuevamente durante 15 min a 13000 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 300 µl de etanol al 70 % para lavar las sales. Se realizó una última centrifugación a 13000 rpm durante 15 min, y se descartó el sobrenadante. Por último, se dejó evaporar el etanol restante en la cámara de

extracción durante 10 min, se añadieron 40 µl de agua miliQ estéril y las muestras fueron almacenadas a -20 °C para análisis posteriores.

### **3.3. Análisis del DNA genómico editado e identificación de alelos mutantes**

Partiendo del DNA genómico extraído previamente de las líneas de *N. benthamiana* editadas, se realizó una PCR con cebadores específicos para amplificar los fragmentos de DNA que contenían los sitios diana de mutagénesis por CRISPR/Cas9. El cebador *forward* fue el mismo para la amplificación de los genes *NbPYL1a* y *NbPYL1b*, y su secuencia era: CCACTTAACGGTTCCACCCGGT. En cuanto a los cebadores *reverse*, se utilizaron las secuencias CTTTCCCATCGAGTTGTTGATAGAA para *NbPYL1a* y la secuencia CTTTCCCATCGAGTTGTTGATCGAG para *NbPYL1b*. Para un volumen final de 20 µl, se añadieron a cada tubo de PCR 2 µl de buffer estándar 10X con MgCl<sub>2</sub> para PCR, 2 µl de dNTP, 1 µl de cada cebador, 12,5 µl de agua miliQ estéril, 0,5 µl de polimerasa Taq y 1 µl de muestra de DNA genómico. Para el control negativo, se substituyó la muestra por agua miliQ estéril. Los tubos fueron sometidos a una temperatura de 95 °C durante 5 min para la desnaturalización inicial, 35 ciclos de desnaturalización (95 °C; 1 min), anillamiento (61 °C o 63 °C, según el cebador; 1 min) y alineamiento (72 °C; 1 min), y 72 °C durante 10 min para la elongación final. Una vez concluido el proceso, los productos de PCR fueron conservados a -20 °C.

La amplificación de los fragmentos de DNA de interés fue comprobada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) en tampón TAE 1X con GelRed (Biotium) al 0,5 % (v/v). En todos los casos, el tamaño esperado para el amplicón era de, aproximadamente, 500 pb. Las reacciones de PCR se trataron con la enzima ExoSAP-IT (ThermoFisher) antes de su secuenciación para eliminar cebadores y nucleótidos no incorporados. Para ello, se añadieron 0,8 µl de ExoSAP-IT a 5 µl de producto de PCR; la mezcla se incubó a 37 °C durante 25 min y, posteriormente, a 80 °C durante 15 min. La secuenciación de los productos de PCR fue realizada por el servicio de secuenciación del IBMCP, con un secuenciador capilar ABI 3130 XL (Applied Biosystems). Los cebadores utilizados en secuenciación fueron los cebadores *reverse* indicados anteriormente para la PCR. Los cromatogramas del DNA genómico editado fueron analizados mediante el software Inference of CRISPR Edits (ICE) de Synthego ("Synthego", 2022).

### **3.4. Germinación de semillas y cultivo de plántulas**

Se realizó la cosecha de semillas de las líneas 10K2.7\_1-24, además de 4 líneas WT. Para ello, se cortaron las cápsulas de cada planta en varios días durante el periodo de producción de semillas. Estas se limpiaron de otros restos y fibras vegetales y fueron dispuestas en una colección.

Se procedió a la desinfección superficial de las semillas en una solución desinfectante de hipoclorito sódico al 50 % (v/v) y Tritón X-100 al 0,02 % (v/v) durante 15 min en un tubo de 5 ml. Después, se realizaron 4 lavados con agua destilada estéril. Todo este proceso se llevó a cabo en una cámara de flujo laminar.

Se sometió a las semillas a estratificación conservándolas a 6 °C y en oscuridad durante 2 días, con objeto de sincronizar su germinación. También en cámara de flujo laminar, se realizó su siembra en placas de Petri redondas de 9 cm de diámetro, o placas de Petri cuadradas de 12 cm de lado para ensayos de crecimiento de raíz. El medio base era un medio estéril Murashige y Skoog (MS) (1/4) gelificado con fitoagar al 0,8 % (p/v). Este medio MS estaba compuesto por sales MS al 0,4 % (p/v) y tamponado con 1 M KOH hasta pH 5,7. Se denominó MS0 a este medio sin azúcares, y MS3 cuando al medio base se le añadía sacarosa al 3 % (p/v). En caso de adición de otros componentes, se indica cuáles y en qué concentración.

En cada placa se dispuso un número variables de semillas (dependiendo del experimento) con micropipeta, una a una y separadas. Posteriormente, las placas fueron transferidas a un fitotrón a 25 °C y 120  $\mu\text{mol}$  de fotones  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en régimen 16 h luz:8 h oscuridad. Se dejó crecer las plantas en estas condiciones hasta 21 días, dependiendo del experimento. Las placas fueron autoclavadas para su eliminación.

### **3.5. Ensayos de germinación y establecimiento**

Como paso previo a la caracterización fenotípica, se sembraron una serie de líneas editadas en una placa cuadrada de MS0, por un lado, y en una placa cuadrada de MS0 + ABA 2  $\mu\text{M}$ , por otro. Se hizo un seguimiento de su germinación para evaluar qué semillas eran las más viables. La línea 10K2.7\_8 fue escogida para los ensayos venideros, con 100 % de germinación en medio sin ABA (n=12) y 90 % de germinación en medio con 2  $\mu\text{M}$  ABA (n=10) a los 6 días después de la siembra (DAS). La línea WT denominada WT5 fue elegida como control en los ensayos.

Para evaluar la germinación y el establecimiento de las semillas de las líneas WT5 y 10K2.7\_8, se hizo un seguimiento de las placas descritas en el apartado 3.4 desde el momento de su siembra; en este caso, placas con MS0, MS0 + ABA 2  $\mu$ M o MS0 + ABA 4  $\mu$ M. Una semilla se consideraba germinada una vez que se observaba rota la testa. Por otro lado, una plántula se consideraba establecida una vez que sus dos cotiledones se encontraban completamente expandidos. Las medidas fueron recogidas como porcentaje de plántulas germinadas o establecidas respecto al total de semillas sembradas.

### **3.6. Ensayos de crecimiento de raíz y de parte aérea**

Para los ensayos de crecimiento, las semillas de las líneas WT5 y 10K2.7\_8 eran sembradas en placas redondas de MS0 colocadas en vertical y, una vez establecidas (pasados 5-6 días desde la siembra), 5-6 plántulas con cotiledones y raíz de tamaño similar eran trasladadas a una placa cuadrada de MS0, o bien MS0 suplementado con agonista X, en condiciones axénicas.

Se tomaron fotografías de las placas a los 19 DAS. El software libre ImageJ (Schneider, Rasband y Eliceiri, 2012) se empleó para estimar la longitud de las raíces, trazando una línea sobre estas y tomando como referencia un testigo presente en la imagen para establecer la escala en cm a partir del número de píxeles seleccionados. La evaluación de la longitud se realizó en un mínimo de 11 plántulas por condición de cultivo, y a partir de los datos se calcularon valores medios y SEM de la longitud de la raíz.

Por otro lado, se midió el peso fresco de la parte radicular y de la parte aérea, por separado, a los 19 DAS. De nuevo, estos parámetros se midieron en un mínimo de 11 plántulas por condición de cultivo, y a partir de los datos se calcularon valores medios y SEM. Además, se contó el número de raíces laterales en ambas líneas, en cada condición de cultivo.

### **3.7. Cultivo in vitro para generar plantas transgénicas de *Nicotiana benthamiana***

#### **3.7.1. Medios de cultivo**

A continuación, se describen varios medios de cultivo empleados específicamente en esta parte del proyecto. El medio MS3-NB es una variante del medio MS3 que contenía sacarosa al 3 % (p/v), sales MS a una concentración de 4,9 g/l, agar a 8 g/l, todo ello con pH ajustado a 5,7 con KOH, y suplementado con ácido 1-naftalenacético (NAA) (auxina) 0,1 mg/l y 6-bencilaminopurina (BAP) (citoquinina) 1 mg/L.

En otras ocasiones, al medio base MS3 se le añadieron otros componentes, indicados en cada caso. Por ejemplo, el medio MS3-CNB (CNB) contenía carbenicilina (200 g/l) además de todo lo anterior. Al medio MS3-CNBK (CNBK) se le añadía, además, kanamicina (0,05 g/l) como agente de selección.

### 3.7.2. Esterilización de hojas y preparación de explantes

Todo el proceso de esterilización y preparación de explantes tuvo lugar en una cabina de flujo laminar, en condiciones axénicas. Se tomaron 5 hojas grandes de plantas de *N. benthamiana* de 6 semanas. Todas las hojas fueron lavadas brevemente con agua destilada y luego sumergidas en solución desinfectante de hipoclorito sódico al 50 % (v/v) y Tritón X-100 al 0,02 % (v/v) durante 10 min. Usando pinzas estériles, las hojas fueron introducidas en etanol al 70 % durante 10 s. Por último, fueron sometidas a 3 lavados más, de 1 min cada uno, con agua destilada.

Para la preparación de los explantes, las hojas previamente esterilizadas fueron manipuladas sobre una placa de Petri estéril. Se obtuvieron discos de hoja de aproximadamente 1 cm de diámetro con un sacabocados metálico, evitando tanto márgenes como nervio central. Los discos fueron colocados con suficiente separación entre sí en placas de Petri, con el lado abaxial en contacto con el medio MS3-NB, previamente estriado. Las placas fueron incubadas durante 24 h a 24 °C, en régimen 16 h luz:8 h oscuridad y 120  $\mu\text{mol}$  de fotones  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , para su adaptación a condiciones *in vitro* (Fig. 5).

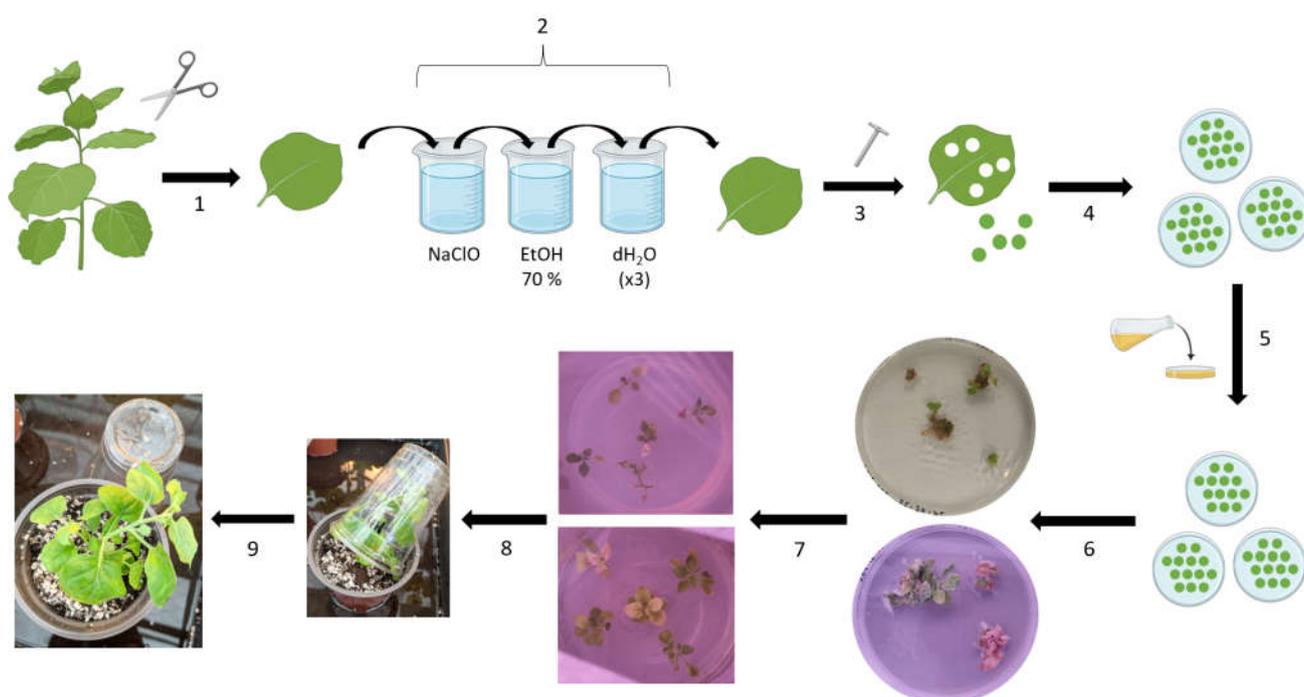
### 3.7.3. Infección con *Agrobacterium*

Para su transformación estable, los discos de hoja incubados en medio MS3-NB fueron transferidos a placas de Petri con cultivo de células de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (una cepa de laboratorio con virulencia reducida) (OD<sub>0,2-0,5</sub>) con las construcciones necesarias para la sobreexpresión del receptor CsPYL1<sup>5m</sup> en plantas WT de *N. benthamiana*. Este cultivo había sido preparado con triptona 5 g/l, extracto de levadura 3 g/l, MgCl<sub>2</sub> 1 mM y MgSO<sub>4</sub> 1mM. Transcurridos 15 min, los explantes fueron colocados de nuevo en sus placas originales de MS3-NB, donde se incubaron durante 48 h a 24 °C, en oscuridad (co-cultivo) (Fig. 5).

Además, se dispuso una placa como testigo o control positivo: medio CNBK pero sin co-cultivar con *Agrobacterium*, y otra placa como testigo negativo: con medio CNB, sin agente de selección.

### 3.7.4. Regeneración de callos y brotes

Tras dos días de incubación en medio de co-cultivo, los explantes fueron transferidos a placas de Petri con medio CNBK, con el lado abaxial en contacto con el medio. Cada 10-12 días, los explantes eran transferidos a nuevas placas con medio fresco. Cuando a partir de los callos se habían formado múltiples brotes, estos se cortaban y eran transferidos a botes con medio MS3 + carbenicilina (200 g/l) (medio de enraizamiento), como paso previo a su paso a tierra (Fig. 5).



**Figura 5. Protocolo de generación de plantas transgénicas de *N. benthamiana* mediante cultivo *in vitro*.**

**1.** Corte de hojas de plantas WT de *N. benthamiana*. **2.** Esterilización de hojas. **3.** Corte de discos de hoja con sacabocados. **4.** Paso de discos a placas de Petri con medio MS3-NB. **5.** Co-cultivo de los discos con células de *Agrobacterium* para su transformación estable. **6.** Regeneración de callos en medio CNBK. **7.** Paso de brotes a medio de enraizamiento. **8.** Paso de brotes enraizados a tierra, cubiertos con un vaso de plástico para su aclimatación. **9.** Crecimiento en invernadero de plantas *N. benthamiana* transgénicas. El esquema fue creado con Biorender (<https://biorender.com>). Las imágenes de regeneración de callos, brotes y paso a tierra son reales y forman parte de este proyecto.

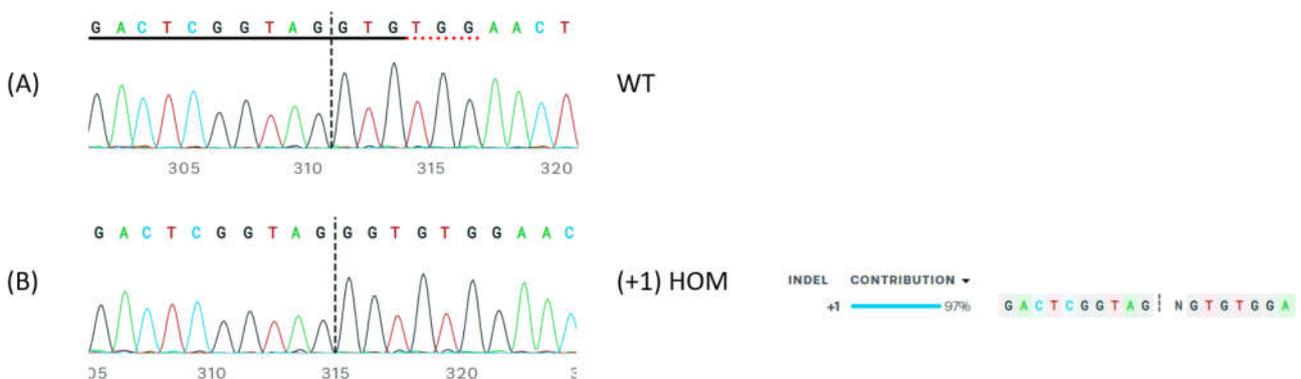
### **3.8. Análisis de datos**

Los resultados de los experimentos realizados se representan como valores medios  $\pm$  SEM, especificando cada vez el tamaño de la población utilizada ( $n$ ) y el *p-value* ( $p$ ) en caso de análisis estadístico. El programa Microsoft Excel 365 se utilizó en los cálculos numéricos. Por otro lado, para las representaciones gráficas y los análisis estadísticos se utilizó el programa GraphPad Prism 8. Los análisis estadísticos consistieron en la comparación de medias para evaluar si existía diferencia significativa entre grupos de muestras. Para ello, se aplicó ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Se estableció un límite de confianza ( $\alpha$ ) de 0,05.

## 4. Resultados

### 4.1. Caracterización genotípica de plantas editadas

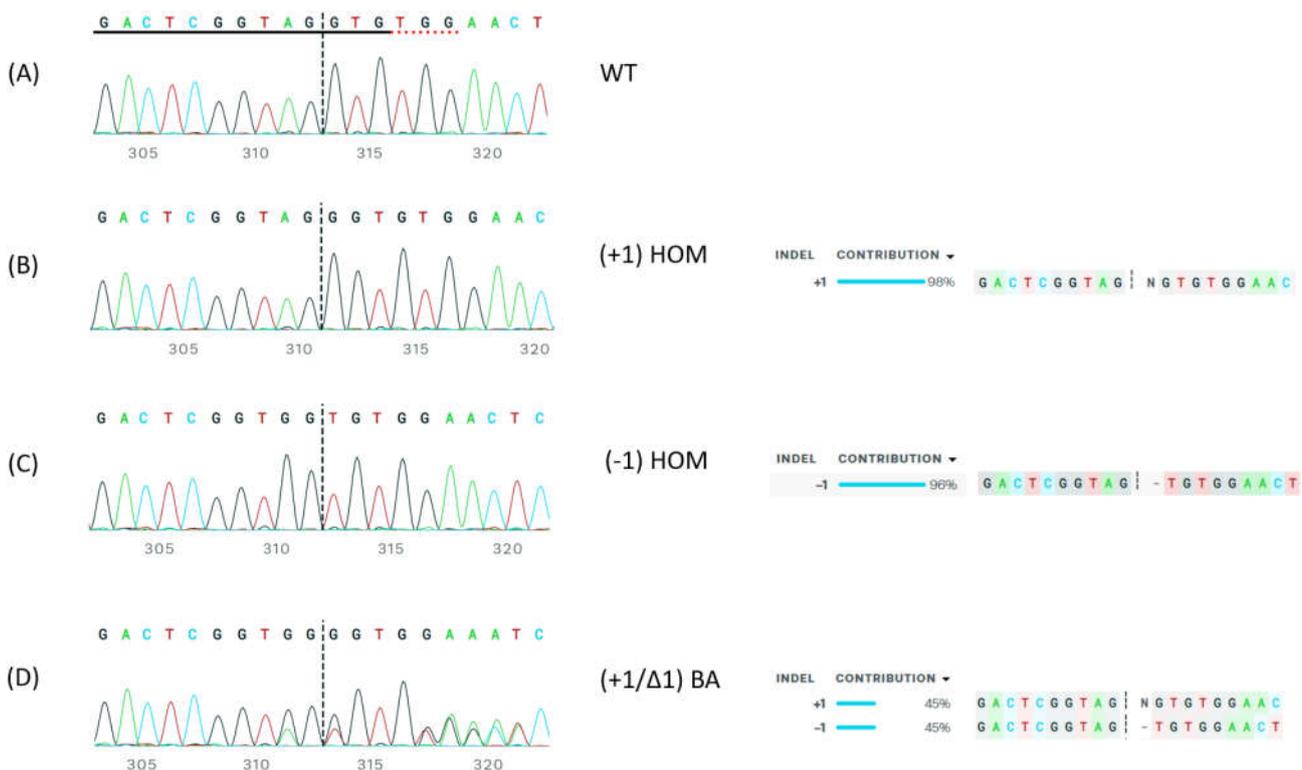
De una progenie de plantas de *N. benthamiana* editadas con guías para los genes *NbPYL1a* y *NbPYL1b*, se seleccionaron las plantas más vigorosas y que daban más semillas para su caracterización genotípica (Tabla 1). Las secuencias de DNA resultantes del protocolo de secuenciación fueron analizadas usando el software ICE de Synthego. Al programa se le aportan como *inputs* los cromatogramas de secuenciación de un DNA WT como control, y de una planta editada. Se incluye también la secuencia del RNA guía utilizado (sin la secuencia PAM), que en todos los casos referidos aquí es CTGAGTTGACTCGGTAGGTG. El software es capaz de interpretar cromatogramas complejos y, teniendo en cuenta la secuencia de la guía de RNA, identificar las mutaciones de las plantas editadas. Como *outputs*, el programa devuelve un gráfico en forma de cromatograma que muestra la región de nucleótidos en torno a la secuencia guía tanto para las muestras WT como editadas. De esta forma, es sencillo hacer una comparativa de ambas secuencias en la región en que se espera la edición génica. Cada diagrama muestra la posición de la secuencia en el eje X y la frecuencia de detección de cada base en cada posición en el eje Y, de forma que el pico de color más alto representa la base nitrogenada más probable en dicha posición. Además, el software sugiere automáticamente una estimación de la distribución de inserciones/deleciones (*Indel distribution*) a lo largo de la secuencia y calcula el valor de correlación ( $R^2$ ), que en todos los casos fue igual o mayor a 95 %.



**Figura 6. Cromatogramas representativos de la secuencia génica de *NbPYL1a*.** (A) Secuencia de *NbPYL1a* cercana al sitio de corte en una planta WT. La secuencia PAM se muestra subrayada. (B) Secuencia de *NbPYL1a* cercana al sitio de corte en una planta editada con CRISPR/Cas9. Los sitios de corte predichos son mostrados como líneas discontinuas verticales. A la derecha del panel se muestra la distribución de inserciones/deleciones detectadas en la secuencia.

Todos los diagramas de Synthego para el gen *NbPYL1a* se mostraron similares, con una inserción (+1) presente en todas las líneas editadas secuenciadas (Fig. 6B). La comparación de las secuencias de plantas editadas con el control indicó que las plantas editadas tienen una inserción correspondiente a guanina (G). Además, ya que la distribución de esta inserción era igual o mayor a 95 % en todos los casos, se consideró que todas las líneas eran homocigotas para la mutación en el gen *NbPYL1a*.

En cuanto al gen *NbPYL1b*, la distribución de inserciones/delecciones en las secuencias era más variada y se puede dividir en líneas con una inserción (+1) (Fig. 7B), líneas con una delección ( $\Delta$ 1) (Fig. 7C) y líneas que presentaban tanto inserciones como delecciones (Fig. 7D). Así, las líneas mutantes fueron clasificadas en homocigotas con inserción de una base, homocigotas con delección de una base, o bialélicas (un alelo con una inserción y otro alelo con una delección) para el gen *NbPYL1b*. En total, 1 de las 10 líneas estudiadas contenía una inserción (+G) (10K2.7\_6), 4 de las líneas contenían una



**Figura 7. Cromatogramas representativos de la secuencia génica de *NbPYL1b*.** (A) Secuencia de *NbPYL1b* cercana al sitio de corte en una planta WT. La secuencia PAM se muestra subrayada. (B) (C) (D) Secuencias de *NbPYL1b* cercanas al sitio de corte en una planta editada con CRISPR/Cas9, homocigota con inserción, homocigota con delección o bialélica para el gen, respectivamente. Los sitios de corte predichos son mostrados como líneas discontinuas verticales. A la derecha del panel se muestra la distribución de inserciones/delecciones detectadas en la secuencia.

delección (-G) (10K2.7\_3, 4, 9 y 12) y las otras 5 eran bialélicas (10K2.7\_2, 8, 11, 14 y 15), es decir, tenían los dos alelos mutados para el gen. Tanto las inserciones como las delecciones fueron detectadas como una guanina. Posteriormente y para corroborar los resultados, la línea madre (10K2.7) también fue analizada, y se comprobó que era bialélica para el gen *NbPYL1b*.

En la Tabla 1 se recoge un resumen del análisis de las secuencias editadas, centrado en los genes *NbPYL1a* y *NbPYL1b*. Para cada gen, se incluyen los porcentajes de distribución de inserciones y delecciones mayoritarias, así como la conclusión sobre la naturaleza de las mutaciones detectadas.

**Tabla 1. Detalle de los genes mutados en cada línea de *N. benthamiana* secuenciada.** Se recogen, para cada línea y gen, la distribución de inserciones/delecciones, indicando los porcentajes, y la conclusión sobre la naturaleza de la mutación. HOM: homocigoto; BA: bialélico. En la *Indel distribution*, los valores menores o iguales a 5 % fueron descartados por considerarse ruido de fondo del proceso de secuenciación.

| Línea     | <i>NbPYL1a</i>            |            | <i>NbPYL1b</i>            |                |
|-----------|---------------------------|------------|---------------------------|----------------|
|           | <i>Indel distribution</i> | Conclusión | <i>Indel distribution</i> | Conclusión     |
| 10K2.7_2  | (+1) 97 %                 | HOM +1 (G) | (+1) 49 %<br>(Δ1) 39 %    | BA +1/Δ1 (G/G) |
| 10K2.7_3  | (+1) 98 %                 | HOM +1 (G) | (Δ1) 96 %                 | HOM -1 (G)     |
| 10K2.7_4  | (+1) 97 %                 | HOM +1 (G) | (Δ1) 96 %                 | HOM -1 (G)     |
| 10K2.7_6  | (+1) 98 %                 | HOM +1 (G) | (+1) 98 %                 | HOM +1 (G)     |
| 10K2.7_8  | (+1) 98 %                 | HOM +1 (G) | (+1) 45 %<br>(Δ1) 45 %    | BA +1/Δ1 (G/G) |
| 10K2.7_9  | (+1) 95 %                 | HOM +1 (G) | (Δ1) 96 %                 | HOM -1 (G)     |
| 10K2.7_11 | (+1) 96 %                 | HOM +1 (G) | (+1) 48 %<br>(Δ1) 40 %    | BA +1/Δ1 (G/G) |
| 10K2.7_12 | (+1) 95 %                 | HOM +1 (G) | (Δ1) 95 %                 | HOM -1 (G)     |
| 10K2.7_14 | (+1) 96 %                 | HOM +1 (G) | (+1) 49 %<br>(Δ1) 39 %    | BA +1/Δ1 (G/G) |
| 10K2.7_15 | (+1) 97 %                 | HOM +1 (G) | (+1) 48 %<br>(Δ1) 41 %    | BA +1/Δ1 (G/G) |

Teniendo en cuenta que todas las líneas derivadas de 10K2.7 tienen mutados los genes *NbPYL8a*, *NbPYL8b* y *NbPYL8c*, se puede decir que todas aquellas que presenten *NbPYL1a* y *NbPYL1b* editados son mutantes péntuples para los genes *PYL*. En consecuencia, la línea 10K2.7\_8, analizada en mayor profundidad en los apartados siguientes, fue denominada *pent3* siguiendo la nomenclatura previa (apartado 1.5).

#### **4.2. Germinación de plantas editadas**

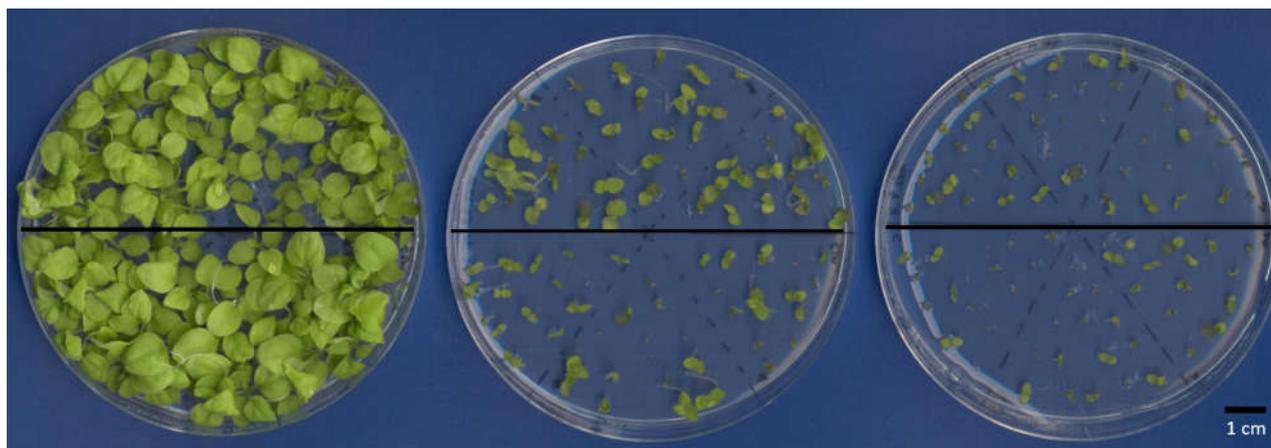
Dado que las semillas de la línea 10K2.7\_8/*pent3* de *N. benthamiana* mostraron los mejores resultados de viabilidad en el ensayo inicial (detallado en el apartado 3.5), esta fue escogida como objeto de estudio. Así, se sembraron semillas de la línea editada *pent3* en medio con distintas concentraciones de ABA, y su germinación fue evaluada en comparación con la línea silvestre WT5. Una semilla se consideraba germinada una vez que rompía la testa. Las medidas se realizaron varias veces en el periodo entre 4 y 21 días tras la siembra (DAS), ya que antes de los 4 DAS no había semillas germinadas bajo ninguna condición, y después de 21 DAS se consideró que aquellas que quedaban sin germinar no lo harían (Fig. 8). Las medidas fueron recogidas como porcentaje de semillas germinadas respecto al total de semillas sembradas.

En ningún caso, la diferencia entre las líneas *pent3* y WT5 fue estadísticamente significativa en semillas crecidas en medio MS sin ABA. Sin embargo, cuando el medio era suplementado con ABA las semillas de las líneas *pent3* mostraban una reducida sensibilidad por ABA. A una concentración de 2  $\mu$ M, el porcentaje de germinación de la línea editada fue significativamente mayor que el de las semillas WT, tanto a los 6 como a los 8 DAS. La mayor diferencia se dio a los 8 DAS, cuando la germinación en la línea WT5 era del  $62,22 \pm 2,22$  % (n=3) y en la línea 10K2.7\_8/*pent3* era del  $93,33 \pm 0$  % (n=3) (ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey para comparaciones múltiples,  $p < 0,0005$ ) (Fig. 9). Cuando el ABA estaba a una concentración mayor, de 4  $\mu$ M, la diferencia entre ambas líneas era menos apreciable y solo se mostró significativa a los 8 DAS. El experimento fue repetido dos veces más en las mismas condiciones, mostrando resultados similares.

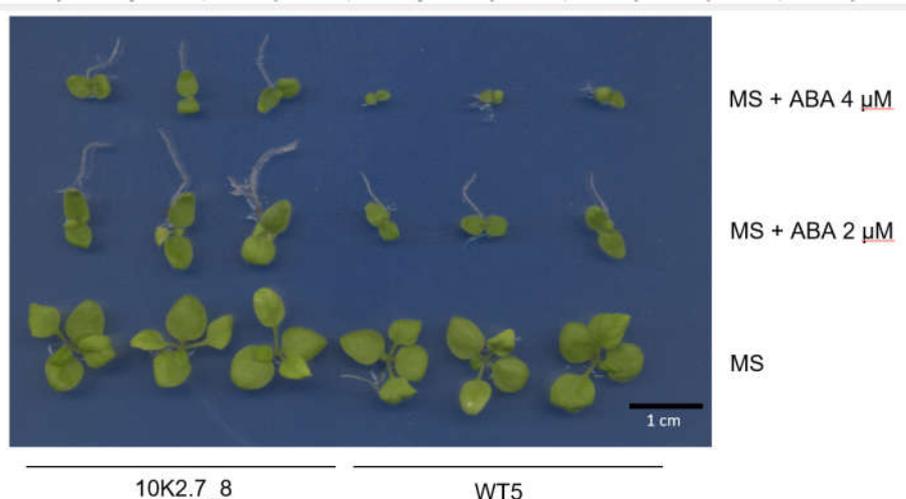
#### **4.3. Establecimiento de plantas editadas**

Para los experimentos de establecimiento de plántula, la línea editada escogida (*pent3*) fue sembrada en presencia de distintas concentraciones de ABA, y su establecimiento fue evaluado en comparación con la línea silvestre WT5. Una plántula se

(A)



(B)

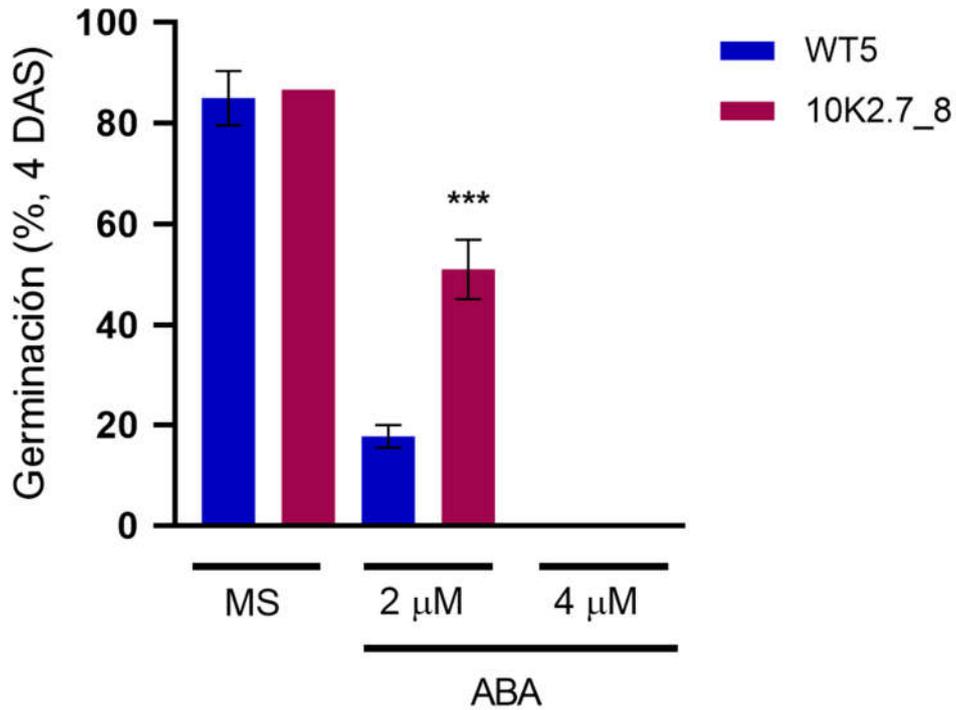


**Figura 8. Germinación/establecimiento de líneas WT5 y 10K2.7\_8/pent3 de *N. benthamiana* en presencia de ABA.** (A) Imágenes representativas de plántulas crecidas durante 21 días en medio MS sin ABA (izquierda), suplementado con ABA 2  $\mu$ M (centro) y suplementado con ABA 4  $\mu$ M (derecha). La línea negra continua sobre las placas indica la separación entre la línea WT5 (abajo) y la línea 10K2.7\_8 (arriba). (B) Detalle de algunas plántulas crecidas en las mismas condiciones que las mostradas en (A), separadas manualmente.

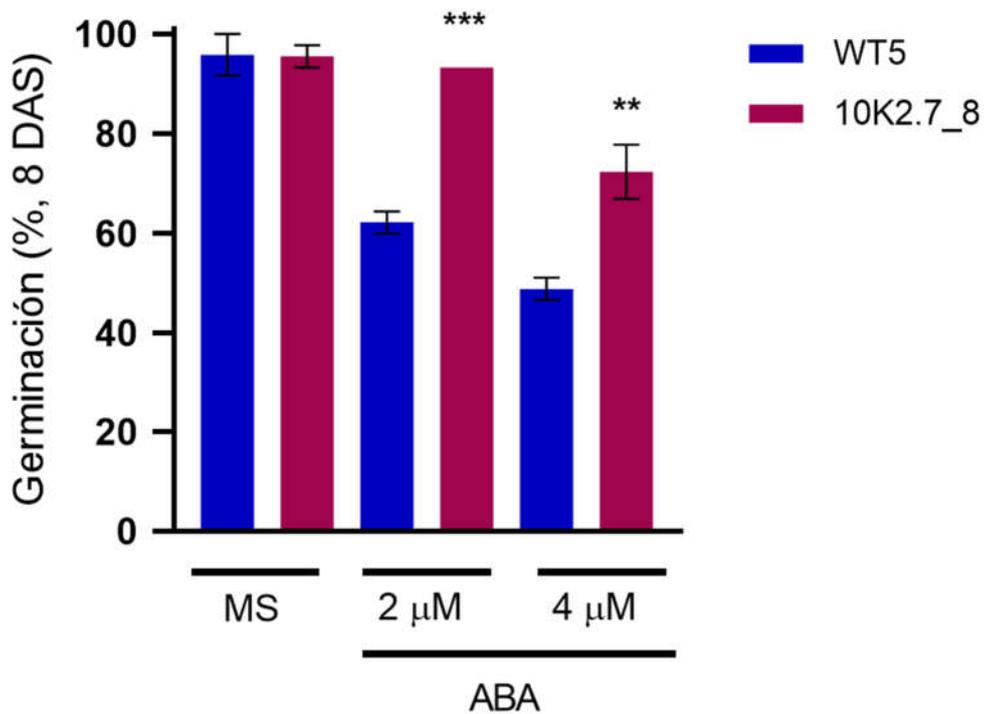
consideraba establecida una vez que sus dos cotiledones se encontraban completamente expandidos. Las medidas se realizaron varias veces en el periodo entre 4 y 21 días tras la siembra (DAS). Las medidas fueron recogidas como porcentaje de plántulas establecidas respecto al total de semillas sembradas.

En ningún caso, la diferencia entre las líneas *pent3* y WT5 fue estadísticamente significativa en semillas crecidas en medio MS sin ABA. Sin embargo, cuando el medio era suplementado con ABA a una concentración de 2  $\mu$ M, el porcentaje de establecimiento se mantuvo significativamente diferente entre los 13 y los 15 DAS, siendo siempre mayor en la línea mutante. La mayor diferencia se dio a los 13 DAS, cuando el

(A)



(B)



**Figura 9. Efecto del ABA en la germinación de líneas WT5 y 10K2.7\_8/pent3 de *N. benthamiana*.**

Se muestra el porcentaje de semillas germinadas en placa a los 4 DAS (A) y a los 8 DAS (B), en medio MS o medio MS suplementado con ABA (2  $\mu$ M o 4  $\mu$ M). Se representan valores promedio  $\pm$  SEM (cámbialo en el resto de la memoria). Los asteriscos indican diferencia significativa según ANOVA de una vía seguido de test de Tukey para comparaciones múltiples: \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  con respecto a las plantas control.

establecimiento en la línea WT5 era del  $37,78 \pm 8,01$  % (n=3) y en la línea *pent3* era del  $82,22 \pm 4,44$  % (n=3) (ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey para comparaciones múltiples,  $p < 0,001$ ) (Fig. 10). Cuando el ABA estaba a una concentración mayor, de  $4 \mu\text{M}$ , la diferencia entre ambas líneas era menos apreciable y no se mostró significativa a ningún tiempo. El experimento fue repetido dos veces más en las mismas condiciones, mostrando resultados similares.

#### **4.4. Crecimiento de plantas editadas**

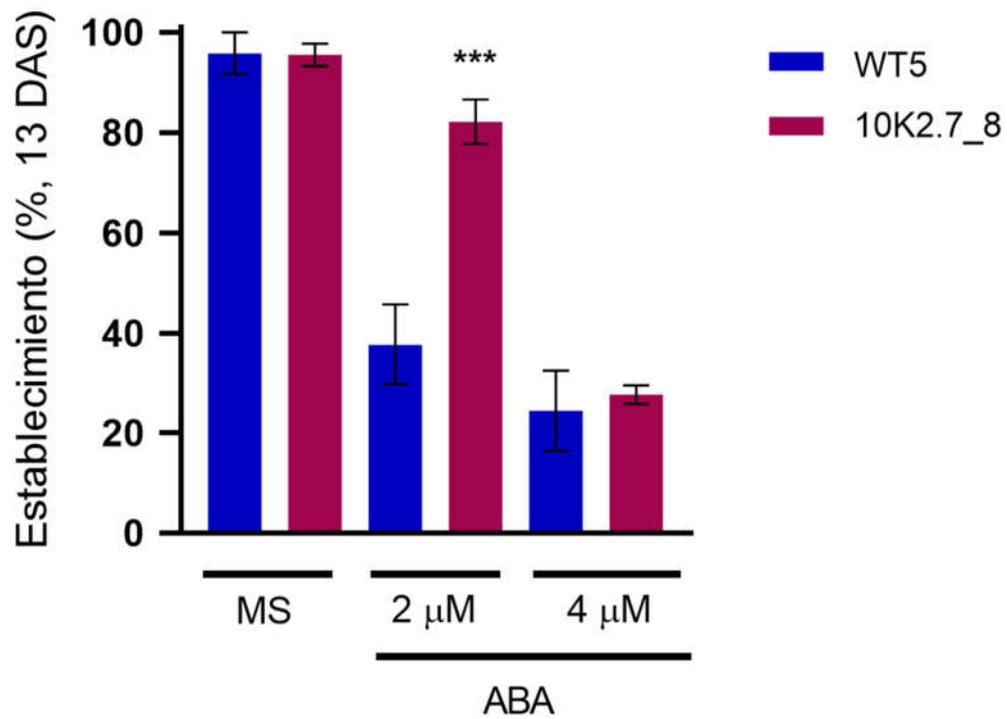
Para caracterizar el crecimiento de las líneas editadas, se realizaron diferentes medidas en plántulas que crecieron en posición vertical en placas con medio MS0 durante 6 días, y fueron transferidas a medio MS0 o a medio suplementado con el agonista X por 13 días más.

La longitud de las raíces de plántulas de *N. benthamiana*, medida con el software ImageJ a partir de fotografías tomadas a los 19 DAS en medio MS0 + agonista X  $5 \mu\text{M}$ , mostró una diferencia significativa entre las líneas silvestre (WT5) y mutante (*pent3*), siendo esta última en torno a 2 cm mayor (ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey para comparaciones múltiples,  $p < 0,0001$ ). La longitud de la raíz primaria en las placas suplementadas con agonista era de  $5,25 \pm 0,18$  cm (n=12) de media en WT5, frente a  $7,22 \pm 0,19$  cm (n=12) en *pent3* (Fig. 11A-C). Cuando fueron crecidas en medio MS0 sin agonista de los receptores, no se observaron diferencias de longitud destacables entre las líneas, midiendo las raíces  $7,57 \pm 0,24$  cm (n=12) de media en WT5 y  $8,23 \pm 0,30$  cm (n=11) de media en *pent3*.

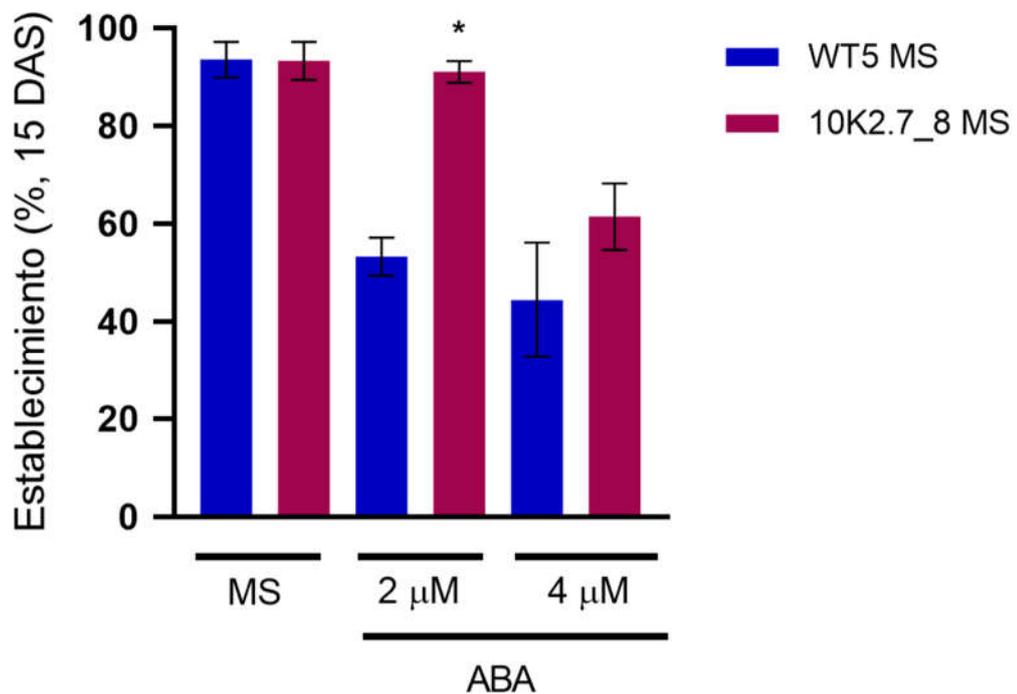
Por otra parte, se midió el peso fresco tanto de las raíces como de la parte aérea en las plántulas crecidas en ambas condiciones. Para las plantas crecidas en medio MS0, el peso medio de la raíz fue de  $19,03 \pm 2,97$  mg (n=12) en la línea silvestre, y de  $19,33 \pm 1,96$  mg (n=11) en la línea mutante. En medio MS0 + agonista X  $5 \mu\text{M}$ , la media fue de  $9,41 \pm 0,86$  mg (n=12) en WT5 y de  $8,69 \pm 0,68$  mg (n=12) en *pent3* (Fig. 11E). Los análisis estadísticos no mostraron una diferencia significativa entre el peso de ambas líneas en medio MS0, pero tampoco lo hicieron en medio con agonista X (ANOVA de una vía,  $p > 0,05$ ).

Se obtuvieron diferencias significativas al medir el peso fresco de la parte aérea de las plántulas. En medio MS0, la media fue de  $36,72 \pm 1,20$  mg (n=12) en WT5 y de  $34,14 \pm 1,96$  mg (n=11) en *pent3*. Para las plantas crecidas en medio MS0 + agonista X  $5 \mu\text{M}$ , el peso medio de la raíz fue de  $22,22 \pm 0,84$  mg (n=12) en la línea silvestre, y de

(A)



(B)



**Figura 10. Efecto del ABA en el establecimiento de líneas WT5 y 10K2.7\_8/pent3 de *N. benthamiana*.** Se muestra el porcentaje de semillas establecidas en placa a los 13 DAS (A) y a los 15 DAS (B), en medio MS o medio MS suplementado con ABA (2  $\mu$ M o 4  $\mu$ M). Se representan valores medios y SEM. Los asteriscos indican diferencia significativa según ANOVA de una vía seguido de test de Tukey para comparaciones múltiples: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  con respecto al control.

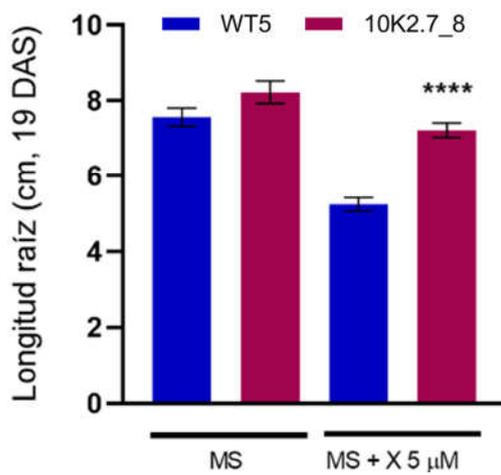
(A)



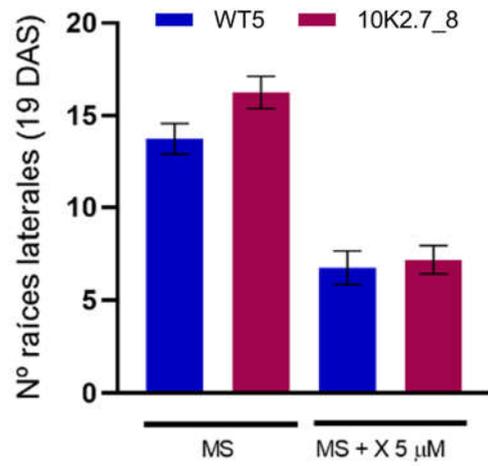
(B)



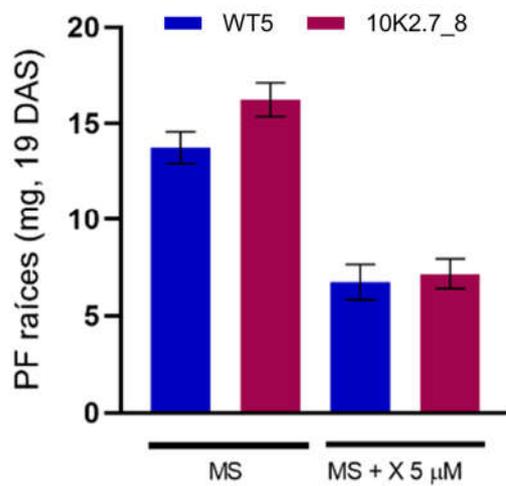
(C)



(D)



(E)



(F)

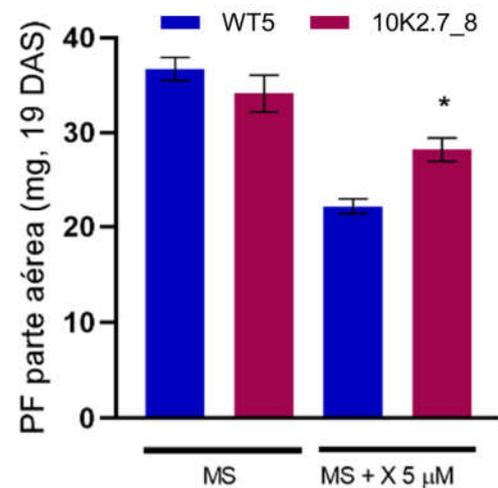


Figura 11. Crecimiento de líneas WT5 y 10K2.7\_8/pent3 de *N. benthamiana* en presencia de agonista X (continúa en la página siguiente).

28,23 ± 1,23 mg (n=12) en la línea mutante (Fig. 11F). Al contrario que con la raíz, los análisis estadísticos mostraron una diferencia significativa entre el peso de la parte aérea en una y otra línea al aportar agonista X (ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey para comparaciones múltiples,  $p < 0,02$ ); no obstante, la diferencia entre ambas líneas crecidas solo con MS0 no resultó significativa (ANOVA de una vía,  $p > 0,05$ ), lo cual sugiere cierta insensibilidad al agonista X por parte de la línea mutante.

Otro parámetro medido fue el número de raíces laterales desarrolladas por cada línea de *N. benthamiana* en ambas condiciones de crecimiento. En este caso, en medio con agonista X (5  $\mu$ M) la media es muy similar entre las dos líneas: 6,75 ± 0,91 raíces laterales (n=12) de media en WT5 y 7,18 ± 0,76 raíces laterales (n=12) en *pent3* (ANOVA de una vía,  $p > 0,05$ ) (Fig. 11D). En medio sin agonista X (MS0), aunque se observa una pequeña diferencia entre ambas líneas, esta no se probó significativa: 13,75 ± 0,82 raíces laterales (n=12) de media en WT5 y 16,25 ± 0,88 raíces laterales (n=11) en *pent3* (ANOVA de una vía,  $p > 0,05$ ).

#### **4.5. Cultivo in vitro para generar plantas transgénicas de *Nicotiana benthamiana***

El proceso descrito de regeneración de callos se llevó a cabo durante varias semanas en las que los explantes eran transferidos en condiciones axénicas a nuevas placas con medio MS3 cada 12 días como máximo. En varias ocasiones se localizaron contaminaciones, en cuyo caso el callo o el brote afectado era eliminado inmediatamente de la placa para que no se extendiese al resto.

En general, de cada callo surgían uno o varios brotes (excepto cuando se daba una contaminación). Cuando un brote alcanzaba un tamaño adecuado para su

---

**Figura 11 (cont.).** (A) (B) Imágenes representativas de plántulas crecidas en vertical durante 6 días en medio MS y transferidas luego a medio sin agonista X (A) o con agonista X 5  $\mu$ M (B) hasta los 19 DAS (total). (C) (D) (E) (F). Efecto de la presencia del agonista X sobre la longitud de la raíz primaria (C), el número de raíces laterales (D), el peso fresco (PF) de la parte radicular (E) y de la parte aérea (F) de las líneas WT5 y 10K2.7\_8/*pent3* de *N. benthamiana*. Las plantas fueron crecidas en las condiciones indicadas en (A) y (B). Se representan valores medios y SEM. Los asteriscos indican diferencia significativa según ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey para comparaciones múltiples: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  con respecto a las plantas control.

manipulación (aproximadamente, 1 cm) era cortado por la base y transferido a un bote de cristal con medio de enraizamiento gelificado en condiciones axénicas.

Transcurridas 4 semanas desde el inicio del proceso de cultivo *in vitro*, ninguno de los brotes obtenidos de callos había desarrollado raíces bien formadas. Se probó a pasar los brotes a medio MS1, por si la razón era que MS3 suponía un estrés osmótico demasiado intenso para las plantas. De forma simultánea a este proceso, en nuestro laboratorio se estaba llevando a cabo otro proyecto en el cual se usaba el mismo *stock* de sales MS. Los investigadores al cargo también observaron dificultades en el enraizamiento similares en sus plántulas de *Arabidopsis thaliana*, lo cual llevó a pensar, tras descartar otras posibilidades, que el origen del problema estaba en las sales MS empleadas en ambos proyectos.

Aun así, algunos de los brotes crecidos *in vitro* en medio de enraizamiento fueron transferidos a tierra. Las macetas se cubrieron con vasos de plástico durante 3 días para la aclimatación de los brotes a condiciones de invernadero (menor humedad que *in vitro*). Solo los brotes control, es decir, provenientes de discos de hoja que no habían sido transformados, sobrevivieron.

**Tabla 2. Resumen de indicadores de crecimiento y desarrollo en las líneas WT5 y 10K2.7\_8/pent3 de *N. benthamiana*.** Se incluyen los datos más representativos. Las condiciones de crecimiento están descritas en el texto para cada ensayo. El *p-value* corresponde a ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey para comparaciones múltiples.

|                                     | Condiciones                             | WT5              | 10K2.7_8/pent3   | <i>p-value</i> | ¿Significativo? |
|-------------------------------------|---|------------------|------------------|----------------|-----------------|
| <b>Germinación (%)</b>              | MS + ABA 2 $\mu$ M<br>8 DAS             | 62,22 $\pm$ 2,22 | 93,33 $\pm$ 0    | 0,0002         | Sí              |
| <b>Establecimiento (%)</b>          | MS + ABA 2 $\mu$ M<br>13 DAS            | 37,78 $\pm$ 8,01 | 82,22 $\pm$ 4,44 | 0,0009         | Sí              |
| <b>Peso fresco parte aérea (mg)</b> | MS0 + agonista<br>X 5 $\mu$ M<br>19 DAS | 22,22 $\pm$ 0,84 | 28,23 $\pm$ 1,23 | 0,0211         | Sí              |
| <b>Peso fresco raíz (mg)</b>        | MS0 + agonista<br>X 5 $\mu$ M<br>19 DAS | 9,41 $\pm$ 0,86  | 8,69 $\pm$ 0,68  | 0,9935         | No              |
| <b>Número raíces laterales</b>      | MS0 + agonista<br>X 5 $\mu$ M<br>19 DAS | 6,75 $\pm$ 0,91  | 7,18 $\pm$ 0,76  | 0,9844         | No              |
| <b>Longitud raíz primaria (cm)</b>  | MS0 + agonista<br>X 5 $\mu$ M<br>19 DAS | 5,25 $\pm$ 0,18  | 7,22 $\pm$ 0,19  | <0,0001        | Sí              |

## 5. Discusión

A pesar de los grandes avances realizados en los últimos años, son muchos los elementos que aún se desconocen sobre los mecanismos de resistencia a estrés abiótico de las células vegetales, dentro de los cuales la vía de señalización de ABA ha mostrado tener un papel clave. Una manera válida de arrojar luz sobre estas vías es mediante la caracterización de variedades con alteraciones genéticas en los sistemas que se quieren analizar.

En la Tabla 1 se recoge un resumen del análisis de las secuencias editadas, centrado en los genes *NbPYL1a* y *NbPYL1b*. De las 10 líneas estudiadas en primera instancia, 8 presentaban una mutación en homocigosis en el gen *NbPYL1b* (datos no mostrados), y todas presentaban una inserción en homocigosis en el gen *NbPYL1a*. Tras una primera ronda de secuenciación, se consideró conveniente repetir el experimento usando otro cebador *forward*, debido a que, durante el transcurso del trabajo experimental, se comprobó que este otro era más específico que el primero para el gen *NbPYL1b*. Esto se debe a que el primer cebador podía amplificar parcialmente la secuencia del gen *NbPYL1c*, generando algo de ruido en el genotipado. Así, en el nuevo análisis de secuencias de DNA se comprobó que 1 de las 10 líneas editadas estudiadas contenían una inserción en *NbPYL1b*, 4 contenían una delección en dicho gen, y las otras 5 eran bialélicas. Posteriormente y para corroborar los resultados, la línea madre (10K2.7) también fue analizada, y se comprobó que era bialélica para el gen *NbPYL1b* (y homocigota para *NbPYL1a*, como se deduce de la Tabla 1).

La redundancia funcional de los receptores PYR/PYL normalmente interfiere con el análisis de su función biológica en la vía de ABA cuando se trabaja con mutantes simples (Park *et al.*, 2009). Una manera adecuada de abordar este problema es la obtención de líneas con mutaciones en varios receptores de la familia. A pesar de las limitaciones iniciales, los productos obtenidos del programa de edición génica resultan satisfactorios, ya que los mutantes mostraron ciertos fenotipos marcados en los ensayos realizados.

Inicialmente, para la edición mediada por CRISPR/Cas9 se diseñó una construcción con 10 gRNA con las que se pretendía editar 7 receptores de ABA diferentes. No obstante, en la práctica solo consiguieron editarse 5 de los genes objetivo, ya que la eficiencia del sistema multiplex se reducía en gran medida desde la última posición de los gRNA policistrónicos (Pizzio *et al.*, 2022). Aun así, los mutantes

generados habían mostrado distintos grados de insensibilidad a ABA en varios procesos evaluados como la germinación, el establecimiento, el crecimiento de la raíz o el desarrollo de raíces laterales.

Los diferentes experimentos llevados a cabo en el presente trabajo han constatado algunas de las diferencias, tanto a nivel molecular como de organismo, de los mutantes péntuples denominados *pent3* de la línea 10K2.7\_8, que incorporan mutaciones de pérdida de función en cinco receptores PYR/PYL, con respecto a la línea silvestre de *Nicotiana benthamiana*. Estas proteínas inducen la expresión de genes de respuesta a ABA, teniendo funciones diversas y redundantes en la respuesta a estrés por sequía (Lim y Lee, 2020). En concreto, se ha descrito que los receptores de la familia de PYL8 están implicados en la señalización de ABA que ocurre en la raíz, teniendo además un papel no redundante (Belda-Palazón *et al.*, 2018). En cuanto a los receptores de la familia de PYL1, se ha observado su papel en el control transcripcional de procesos como la transpiración (González-Guzmán *et al.*, 2012; Vaidya *et al.*, 2017).

Para desmenuzar estas observaciones, se pueden analizar en primer lugar los efectos que produce la presencia de ABA en el desarrollo de semillas de los mutantes *pent3* y contrastarlos con la línea silvestre de *N. benthamiana*. Los resultados de los ensayos tanto de germinación como de establecimiento apuntan a que la combinación de mutaciones en *pent3* provoca una importante insensibilidad a la presencia de ABA que afecta al desarrollo temprano de estas plantas. En ambos casos, se observa una clara diferencia en el porcentaje de semillas que germinan o se establecen entre las líneas estudiadas (Tabla 2).

Cierto es que las diferencias significativas se dan a una concentración concreta de ABA en el medio, suficiente para que se dé una inhibición del crecimiento en la línea silvestre, pero no tan alta como para que su presencia impida por completo el crecimiento de ambas. Es posible que el ABA a 4  $\mu\text{M}$  constituya una dosis demasiado potente como para poder obtener diferencias medibles entre la germinación de la línea silvestre y la mutante. Por ello, la concentración de 2  $\mu\text{M}$  se puede considerar adecuada en el contexto de este estudio, donde se pretende caracterizar a los mutantes péntuples obtenidos.

La aplicación de agonistas sintéticos de receptores puede ser más útil que la del propio ABA para determinar las funciones biológicas de los receptores editados y, de hecho, existen agonistas cuya selectividad es mayor que el compuesto que mimetizan, como la pirabactina (Park *et al.*, 2009). El agonista X es específico de los receptores de

la familia de PYL8; además, al tratarse las ediciones de delecciones/inserciones de un solo nucleótido, se espera que la mutación en la proteína sea de pérdida de función. Así, lo esperable es que los mutantes péntuples estudiados en este trabajo muestren un fenotipo evidente, presumiblemente relacionado con procesos fisiológicos como el desarrollo de la raíz, donde PYL8 se encuentra altamente expresado. Por ejemplo, en el trabajo de Antoni *et al.* (2013), la pérdida de función de PYL3/PYL8 redujo la sensibilidad a la inhibición del desarrollo de la raíz dependiente de ABA.

En efecto, los datos recopilados indican que las plántulas *pent3* alcanzan una longitud mayor de raíz primaria que las plántulas WT5 en medio MS al que se añade agonista X de los receptores de ABA, llegando a una media de 7,22 a los 19 DAS, frente a los 5,25 de la variedad silvestre (Fig. 11C; Tabla 2). Sin embargo, análisis previos sobre mutantes de *Arabidopsis* muy similares y crecidos en las mismas condiciones, pero tratados con altas concentraciones de ABA, no arrojaron diferencias significativas entre línea editada y silvestre (Pizzio *et al.*, 2022).

Siguiendo la misma línea, la parte aérea también mostró una inhibición reducida del crecimiento en *pent3*, con 12 mg más de media en las plantas mutantes que en las silvestres después de 13 días en contacto con el agonista X (Fig. 11B; Tabla 2). Estos datos sí se asemejan a los recogidos anteriormente con mutantes cuádruples de los receptores PYL1 y PYL8, en los que se vio una menor inhibición mediada por ABA del crecimiento de la parte aérea que en la línea silvestre (Pizzio *et al.*, 2022). En conjunto con lo anterior, estos resultados apuntan a que el mutante analizado presenta cierto grado de insensibilidad a dicho agonista, específico de los receptores PYL8.

En la Introducción se ha comentado la importancia de las características estructurales de los receptores PYR/PYL para la activación de la vía de señalización mediada por ABA. El *gate loop* y el *latch loop*, localizados entre las regiones  $\beta$ 3- $\beta$ 4 y  $\beta$ 5- $\beta$ 6 de la secuencia aminoacídica de los receptores PYR/PYL, son una parte crucial de dicha estructura. En efecto, los residuos correspondientes a ambos *loops* están completamente conservados en los genes *NbPYL1a-b* y *NbPYL8a-c* (Pizzio *et al.*, 2022). No es de extrañar, por tanto, que los fenotipos de insensibilidad conocidos en los mutantes de alto orden de *A. thaliana* con los genes ortólogos alterados, obtenidos anteriormente, sean observables también en los péntuples de *N. benthamiana* estudiados aquí.

Los datos hasta aquí discutidos concuerdan con los resultados de caracterización genotípica recogidos en la Tabla 1. El mutante péntuple *pent3* de *N. benthamiana* utilizado en el presente estudio incorpora mutaciones de pérdida de función en cinco de los receptores PYR/PYL. La activación de los receptores PYR/PYL por ABA desencadena la cascada de señalización al desactivar la inhibición de las kinasas SnRK2 por las fosfatasa. Las SnRK2 disparan respuestas genómicas y no genómicas; por tanto, es esperable que los mutantes *pent3* se vean afectados tanto en eventos regulados por canales iónicos como en aquellos controlados por genes de respuesta a ABA.

Los mutantes con tres y cuatro receptores editados obtenidos anteriormente por el grupo del Dr. Pedro Rodríguez presentaron fenotipos de insensibilidad a ABA marcados en los ensayos (Pizzio *et al.*, 2022); no obstante, cuando se midió la transpiración, se observó una respuesta evidente al tratamiento con ABA. Este hecho refleja que la transpiración en *N. benthamiana* está regulada de manera redundante por múltiples receptores PYR/PYL, lo cual puede constituir una ventaja evolutiva teniendo en cuenta que se trata de una especie cuyo origen está en los ambientes extremos de Australia central (Bally *et al.*, 2015). Estos hábitats de condiciones extremas han ejercido una fuerte presión evolutiva sobre la especie. No obstante, se observaron fenotipos en los estadios de semilla y plántula, y en el crecimiento de la parte aérea y de la raíz primaria, lo cual puede atribuirse a que los receptores editados son algunos de los principales de entre los 23 PYR/PYL de *N. benthamiana*. Así, los cinco receptores seleccionados para su edición eran los más expresados en hoja, y probablemente estén muy presentes también en las raíces y en las fases iniciales del desarrollo (Pizzio *et al.*, 2022).

Por otro lado, a pesar de las diferencias observadas entre ambas líneas en la longitud de la raíz primaria, no debe ignorarse que la presencia del agonista en el medio no tuviera un efecto claro en el crecimiento de la parte radicular en su conjunto, como muestran las medidas de peso fresco realizadas (Fig. 11E; Tabla 2). Adicionalmente, los análisis estadísticos no revelaron diferencias significativas en el desarrollo de raíces laterales en condiciones similares (Tabla 2), aunque Pizzio *et al.* (2022) sí que observaron una reducción notable de la inhibición del crecimiento y número de raíces laterales en los mutantes en presencia de altas concentraciones de ABA.

El hecho de que los mutantes no sean completamente insensibles a ABA o a agonistas de los receptores PYR/PYL puede estar relacionado con la redundancia funcional ya comentada, aunque no se debe descartar la posibilidad de que la

combinación de alteraciones que posee *pent3* en los PYR/PYL afecte menos a estos caracteres de la planta, y en cambio esté más relacionada con la longitud de raíz primaria o el crecimiento de la parte aérea. Sin perjuicio de lo anterior, los ensayos han de ser optimizados en cuanto a dosis de ABA o agonista, número de réplicas, etc.

Además de esto, existen otras dificultades y **limitaciones** que deben comentarse de cara a futuros experimentos que partan de este estudio y antes de proponer las conclusiones finales. Entre ellas, es destacable la variabilidad inherente a cada individuo de la línea mutante *pent3*, que dificulta en gran medida los cálculos estadísticos y la interpretación de los resultados. Este fenómeno fue especialmente evidente en las mediciones de peso fresco del ensayo de crecimiento con agonista X, donde la desviación estándar resultó mayor que en otros experimentos.

A la hora de poner a punto los ensayos, es importante saber interpretar los resultados de acuerdo con el rango de días después de la siembra (DAS) en que se han tomado las medidas. Por ejemplo, en este trabajo, es en una ventana determinada de DAS donde es más apreciable la diferencia en la germinación de WT5 y *pent3*. Antes de ese periodo, el estadio de crecimiento es demasiado temprano como para que el carácter sea medible; por otro lado, las etapas posteriores donde prácticamente todas las semillas han tenido tiempo para germinar tampoco son adecuadas, pues los valores ya se encuentran estabilizados y la diferencia tampoco es apreciable. Por tanto, es necesario determinar el rango adecuado de DAS, que puede cambiar según las condiciones de crecimiento (por ejemplo, la dosis de ABA en el medio) o según el propio tipo de ensayo (germinación, establecimiento, longitud de la raíz, etc.), para lograr resultados confiables y replicables.

Como su manipulación genética es relativamente sencilla, *Nicotiana benthamiana* fue escogida como punto de partida para identificar los receptores principales que median la señalización de ABA en plantas poliploides. Esta especie, además de ser un *crop* biotecnológico, sirve como paso intermedio entre *A. thaliana* y plantas de cosecha con mayor interés agronómico pero que son más difíciles de manipular para obtener mutantes de alto orden. En continuación con la caracterización de la familia de receptores PYR/PYL en cultivos económicamente relevantes, el grupo liderado por el Dr. Pedro Rodríguez está realizando los primeros ensayos en plantas editadas de trigo, replicando los pasos seguidos anteriormente con *A. thaliana* y *N. benthamiana*.

### 5.1. Líneas futuras

Actualmente, la agricultura se enfrenta a grandes desafíos debido al cambio climático. Ante la previsión de que las sequías sean cada vez más frecuentes en los próximos años y muchos cultivos se vean afectados, varios grupos de investigación han tomado diferentes perspectivas para conseguir una mejor eficiencia en el uso de agua en plantas de cosecha. Se trata de estrategias genéticas que mejoran la señalización de ABA para este fin: la inactivación constitutiva de fosfatasa PP2C (Saez *et al.*, 2006), la inhibición de PP2C por parte de receptores de ABA generados en laboratorio (Pizzio *et al.*, 2013), o la sobreexpresión de receptores monoméricos de ABA (González-Guzmán *et al.*, 2014).

En relación con el estudio de los receptores de ABA, un área de investigación con gran interés en la actualidad es el desarrollo de pequeñas moléculas capaces de regular la transpiración. Los receptores PYR/PYL son una diana muy importante en esta línea, pues la transpiración depende en gran medida de la conductancia estomática, a su vez controlada por la presencia o ausencia de ABA. El campo de la búsqueda de agonistas y antagonistas de los receptores de ABA seguirá su curso por sus importantes aplicaciones y la creciente necesidad de soluciones a los efectos del cambio climático, sobre todo el aumento de las sequías y la disponibilidad cada vez más reducida de agua dulce.

Los análisis cuantitativos de longitud de raíz primaria, número de raíces laterales y peso fresco de raíz y parte aérea son buenos indicadores del crecimiento de las plántulas en diferentes condiciones. Aun así, existen otros tipos de ensayos, propuestos a continuación, que ayudarían a completar la caracterización fenotípica de *pent3*, así como de otros mutantes de interés que se analicen en futuros trabajos experimentales.

El primer paso a seguir sería hacer pruebas adicionales con agonistas de los receptores de ABA, tanto el agonista X como otras pequeñas moléculas capaces de regular la vía. Por ejemplo, la cianabactina es específica de los PYL1, que también están editados en el mutante *pent3*. Los resultados de estas pruebas, realizadas con diferentes agonistas probados en varias concentraciones, deberían compararse entre sí y con el propio ABA, para examinar las diferencias de actividad entre ellos.

Para analizar la respuesta a condiciones de déficit hídrico de los mutantes, se pueden llevar a cabo ensayos de resistencia a sequía, no aportando agua a las plantas durante varios días, para después regarlas de nuevo y examinar los efectos producidos por el tratamiento. Otra posibilidad es realizar un ensayo de hidrotropismo, colocando las

plántulas en una placa en vertical con sorbitol en el fondo en la que se consigue un gradiente de potencial hídrico (Miao *et al.*, 2021). La aplicación de PEG constituye una alternativa para inducir estrés hídrico, ya que se ha observado que simula el estrés por sequía y disminuye el potencial hídrico de las plantas debido al estrés osmótico (Ahmad *et al.*, 2020).

Un componente esencial para completar la caracterización del fenotipo de una planta son los parámetros de intercambio gaseoso, como la transpiración y la conductancia estomática, medibles con sistemas de análisis infrarrojo de gases (IRGA). Por ejemplo, evaluar la capacidad de ABA y/o agonistas para controlar el cierre estomático, tras aplicar dichos compuestos sobre plantas tanto de la línea mutante como de la silvestre (Kollist *et al.*, 2007). Estas medidas se podrían complementar con termografía infrarroja de las plantas usando una cámara especializada.

Otra manera de comprobar la sensibilidad a ABA en los mutantes de receptores PYR/PYL son los ensayos de inhibición de la fosfatasa tipo PP2C. Por otra parte, el estado de activación de las SnRK2, aguas abajo de las PP2C en la vía de señalización, se puede detectar mediante ensayos de actividad kinasa en gel. Por último, experimentos de RT-qPCR servirían para evaluar la regulación diferencial de genes por parte de ABA en plantas con distintos genotipos.

Un complemento muy interesante al estudio fenotípico de estos mutantes sería realizar análisis electrofisiológicos. La electrofisiología como herramienta experimental permite estudiar procesos fisiológicos a los que subyacen flujos eléctricos entre membranas celulares. En este sentido, el potencial de membrana en reposo es un parámetro útil para determinar qué movimientos de iones se producen en los sujetos de estudio. Una de las funciones principales de la vía de señalización de ABA es el control del cierre estomático, que pasa por la activación de la H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática de las células oclusivas y la consecuente movilización de aniones al exterior, además de la apertura de canales de K<sup>+</sup> activados por pH. La H<sup>+</sup>-ATPasa, al bombear protones fuera de la célula, dispara hiperpolarizaciones que son fácilmente observables a tiempo real cuando se está midiendo el potencial de membrana de forma continua. El flujo de H<sup>+</sup> puede medirse con la técnica denominada SIET según lo descrito en Sun *et al.* (2009). Además, la H<sup>+</sup>-ATPasa activa aumenta el pH intracelular, lo cual también puede medirse (en este caso, con electrodos ion-selectivos).

Asimismo, el aumento de la concentración de ABA externo por déficit hídrico desencadena un flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior celular que también es medible por métodos de electrofisiología, como el uso de microelectrodos ion-selectivos (Shabala *et al.*, 2006). Con respecto a los cambios de concentración citosólica de  $\text{K}^+$ , se podrían evaluar directamente utilizando microelectrodos dobles  $\text{K}^+$ -selectivos sobre las células oclusivas, o midiendo el valor de potencial de difusión en respuesta a concentraciones crecientes de  $\text{K}^+$  externo. El potencial de difusión es el componente del potencial de membrana debido al flujo de iones, sin tener en cuenta la actividad de la  $\text{H}^+$ -ATPasa (Felle, 1981). Los valores de potencial de difusión son, en gran medida, dependientes de la concentración externa de  $\text{K}^+$ , ya que este es el ion más permeable de las membranas celulares vegetales (Leidi *et al.*, 2010).

Por tanto, análisis electrofisiológicos en esta línea podrían darnos más detalles sobre el grado de respuesta que tienen los mutantes al ABA, y en qué medida la edición de los receptores PYR/PYL ha afectado a su sensibilidad a esta hormona y sus agonistas. Para evaluar el efecto de un agonista, simplemente se añadiría el compuesto deseado en lugar de ABA en los medios de ensayo, y se darían pulsos controlados del agonista a diferentes concentraciones al tiempo que se registran las medidas de potencial de membrana. Si las medidas se tomaran en las mismas condiciones, los experimentos con ABA y con agonistas serían fácilmente comparables.

Todos los experimentos descritos y los que han sido propuestos aquí pueden replicarse en otras líneas derivadas de 10K2.7 que fueron secuenciadas en este trabajo y que de hecho resultaron ser mutantes péntuples de los receptores PYR/PYL, así como de aquellas que se incluyeron en la librería de semillas pero no fueron genotipadas. Más allá de *N. benthamiana*, el alcance de estos estudios debería ampliarse a plantas de cosecha; de hecho, en este laboratorio ya se ha empezado a probar plantas de trigo con varios receptores editados. En cuanto a las plantas *5m*, los mutantes de *Arabidopsis* que habían sido obtenidos anteriormente por el grupo están siendo caracterizados, y se planea tratar de conseguir las plantas *5m* de *N. benthamiana* en el futuro, así como plantas *5m* de trigo.

Pizzio *et al.* (2022) sugieren que es necesario actualizar la información sobre el perfil de expresión de los receptores PYR/PYL de *N. benthamiana* en diferentes tejidos. La ampliación de los datos de RNA-seq que se poseen hasta el momento podría ser crucial para tomar otros receptores como dianas de edición adicionales, y soslayar así la

redundancia funcional que se da al mutar solo 5 de los 23 PYR/PYL de la familia en esta especie. La redundancia funcional es especialmente relevante en especies poliploides, dado que poseen un mayor número de receptores PYR/PYL. No obstante, la edición de un número considerable de genes podría llevar a limitaciones en la caracterización del fenotipo de los mutantes si las alteraciones tienen un efecto demasiado potente sobre la viabilidad de las plantas editadas. Por ello, en futuros trabajos será crucial buscar un equilibrio en este sentido a la hora de obtener mutantes de alto orden.

Dada la suma importancia de la vía de señalización de ABA para controlar la transpiración y el desarrollo, así como tantos otros procesos fisiológicos de las plantas, las conclusiones del presente trabajo deberían tomarse como punto de partida para futuras investigaciones que implicasen un estudio más detallado del mutante péntuple *pent3/10K2.7\_8*, modelo de estudio muy interesante de los receptores de ABA en el *crop* biotecnológico *Nicotiana benthamiana*.

## 6. Conclusiones

1. Se habían generado mutantes péntuples de los receptores PYL en la mutagénesis por CRISPR/Cas9. Además de *NbPYL8a-c*, todas las líneas genotipadas presentan mutaciones tanto en *NbPYL1a* como en *NbPYL1b*. En concreto, todas son homocigotas para *NbPYL1a*, puesto que la línea madre 10K2.7 también lo era; en cuanto a *NbPYL1b*, 5 líneas (10K2.7\_3/4/6/9/12) son homocigotas y 5 líneas (10K2.7\_2/8/11/14/15) son bialélicas para el gen.
2. Tras 19 días desde la siembra, las plántulas de la línea 10K2.7\_8/*pent3* presentan una longitud de raíz primaria mayor que la línea silvestre de *N. benthamiana* WT5 en presencia de 5  $\mu\text{M}$  de agonista X; esto refleja una insensibilidad parcial de los receptores editados al agonista X, que por extensión indica también sensibilidad reducida al propio ABA.
3. El peso fresco de la parte aérea es mayor en las plántulas de la línea 10K2.7\_8/*pent3* cuando crecen en presencia de 5  $\mu\text{M}$  de agonista X. De nuevo, se trata de un fenotipo de insensibilidad parcial de los receptores PYR/PYL al agonista.
4. El peso fresco de la parte radicular, así como el número de raíces laterales, no son significativamente diferentes en 10K2.7\_8/*pent3* comparado con la línea silvestre cuando las plantas son crecidas en presencia de 5  $\mu\text{M}$  de agonista X. Esto puede ser debido a que los experimentos necesitan ser optimizados, o bien a que los receptores editados no están tan relacionados con el control de estos caracteres como de los anteriores.
5. En condiciones de presencia moderada de ABA (2  $\mu\text{M}$ ), el porcentaje de germinación y de establecimiento es mayor en 10K2.7\_8/*pent3*, lo que refleja una menor inhibición de estos procesos fisiológicos en el mutante que en la línea silvestre WT5. Así, se sugiere que los receptores editados están implicados en la respuesta a ABA en las primeras fases del desarrollo. Con concentraciones más altas de ABA (4  $\mu\text{M}$ ), las diferencias en la inhibición tanto de la germinación como del establecimiento no son significativas entre ambas líneas, aunque esto puede ser debido a la propia naturaleza del ensayo.

6. Los fenotipos observados indican una insensibilidad solamente parcial a ABA, lo cual probablemente refleja el control redundante que ejercen los receptores PYR/PYL sobre la vía de señalización de ABA en *Nicotiana benthamiana*.

## 7. Bibliografía

- Ahmad, M. A., Javed, R., Adeel, M., Rizwan, M., & Yang, Y. (2020). Peg 6000-stimulated drought stress improves the attributes of in vitro growth, steviol glycosides production, and antioxidant activities in *Stevia rebaudiana bertonii*. *Plants*, 9(11), 1552. <https://doi.org/10.3390/plants9111552>
- Bally, J., Jung, H., Mortimer, C., Naim, F., Philips, J., & Hellens, R. et al. (2018). The Rise and Rise of *Nicotiana benthamiana*: A Plant for All Reasons. *Annual Review Of Phytopathology*, 56(1), 405-426. doi: 10.1146/annurev-phyto-080417-050141
- Bally, J., Nakasugi, K., Jia, F., Jung, H., Ho, S., & Wong, M. et al. (2015). The extremophile *Nicotiana benthamiana* has traded viral defence for early vigour. *Nature Plants*, 1(11). doi: 10.1038/nplants.2015.165
- Belda-Palazon, B., Gonzalez-Garcia, M., Lozano-Juste, J., Coego, A., Antoni, R., & Julian, J. et al. (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). doi: 10.1073/pnas.1815410115
- Benthamania. (2022). Retrieved 3 October 2022, from <https://benthgenome.qut.edu.au>
- Cao, M., Zhang, Y., Liu, X., Huang, H., Zhou, X., & Wang, W. et al. (2017). Combining chemical and genetic approaches to increase drought resistance in plants. *Nature Communications*, 8(1). doi: 10.1038/s41467-017-01239-3
- Cutler, S., Rodriguez, P., Finkelstein, R., & Abrams, S. (2010). Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. *Annual Review Of Plant Biology*, 61(1), 651-679. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112122
- Dittrich, M., Mueller, H., Bauer, H., Peirats-Llobet, M., Rodriguez, P., & Geilfus, C. et al. (2019). The role of *Arabidopsis* ABA receptors from the PYR/PYL/RCAR family in stomatal acclimation and closure signal integration. *Nature Plants*, 5(9), 1002-1011. doi: 10.1038/s41477-019-0490-0
- Dupeux, F., Antoni, R., Betz, K., Santiago, J., Gonzalez-Guzman, M., & Rodriguez, L. et al. (2011). Modulation of Abscisic Acid Signaling in Vivo by an Engineered Receptor-Insensitive Protein Phosphatase Type 2C Allele. *Plant Physiology*, 156(1), 106-116. doi: 10.1104/pp.110.170894
- Fan, W., Li, J., Jia, J., Wang, F., Cao, C., Hu, J., & Mu, Z. (2015). Pyrabactin regulates root hydraulic properties in maize seedlings by affecting PIP aquaporins in a phosphorylation-dependent manner. *Plant Physiology And Biochemistry*, 94, 28-34. doi: 10.1016/j.plaphy.2015.05.005
- Felle, H. (1981). A study of the current-voltage relationships of electrogenic active and passive membrane elements in *Riccia fluitans*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 646, 151-160.
- Finkelstein, R., & Rock, C. (2002). Abscisic Acid Biosynthesis and Response. *The Arabidopsis Book*, 1, e0058. doi: 10.1199/tab.0058

- Fujii, H., Chinnusamy, V., Rodrigues, A., Rubio, S., Antoni, R., Park, S., Cutler, S., Sheen, J., Rodriguez, P., & Zhu, J. (2009). *In vitro* Reconstitution of an ABA Signaling Pathway. *Nature*, 462(7273), 660-664. doi: 10.1038/nature08599
- García-Maquilon, I., Coego, A., Lozano-Juste, J., Messerer, M., de Ollas, C., & Julian, J. et al. (2020). PYL8 ABA receptors of *Phoenix dactylifera* play a crucial role in response to abiotic stress and are stabilized by ABA. *Journal Of Experimental Botany*, 72(2), 757-774. doi: 10.1093/jxb/eraa476
- González-Guzmán, 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., & Rodriguez, 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., Sarrion-Perdigones, A., & Fernández, M. et al. (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. doi: 10.1093/jxb/eru219
- Hewage, K., 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), 2001265. doi: 10.1002/advs.202001265
- Kollist, T., Moldau, H., Rasulov, B., Oja, V., Rämama, H., Hüve, K., Jaspers, P., Kangasjärvi, J., & Kollist, H. (2007). A novel device detects a rapid ozone-induced transient stomatal closure in intact Arabidopsis and its absence in ABI2 mutant. *Physiologia Plantarum*, 129(4), 796–803. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00851.x>
- Leidi, E., Barragán, V., Rubio, L., El-Hamdaoui, A., Ruiz, M., & Cubero, B. et al. (2010). The AtNHX1 exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato. *The Plant Journal*, 61(3), 495-506. doi: 10.1111/j.1365-313x.2009.04073.x
- Lim, C., & Lee, S. (2020). ABA-dependent and ABA-independent functions of RCAR5/pyl11 in response to cold stress. *Frontiers in Plant Science*, 11. doi: 10.3389/fpls.2020.587620
- Lim, J., Lim, C., & Lee, S. (2022). Core Components of Abscisic Acid Signaling and Their Post-translational Modification. *Frontiers In Plant Science*, 13. doi: 10.3389/fpls.2022.895698
- Liu, Y., Chen, S., Wei, P., Guo, S., & Wu, J. (2022). A briefly overview of the research progress for the abscisic acid analogues. *Frontiers In Chemistry*, 10. doi: 10.3389/fchem.2022.967404
- Lozano-Juste, J., García-Maquilon, I., Brea, J., Piña, R., Albert, A., Rodríguez, P., & Loza, M. (2021). Identification of ABA Receptor Agonists Using a Multiplexed High-Thoroughput Chemical Screening. En Hicks, G., & Zhang, C. (Eds.), *Plant chemical genomics: Methods and Protocols* (pp. 99-111). doi: 10.1007/978-1-0716-0954-5\_9

- Lozano-Juste, J., García-Maquilón, I., Ruiz-Partida, R., & Rodríguez, P. (2020). Drug Discovery for Thirsty Crops. *Trends In Plant Science*, 25(9), 844-846. doi: 10.1016/j.tplants.2020.07.001
- Miao, R., Yuan, W., Wang, Y., Garcia-Maquilon, I., Dang, X., Li, Y., Zhang, J., Zhu, Y., Rodriguez, P. L., & Xu, W. (2021). Low ABA concentration promotes root growth and hydrotropism through relief of ABA insensitive 1-mediated inhibition of plasma membrane H<sup>+</sup> -atpase 2. *Science Advances*, 7(12). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd4113>
- Murray, M., & Thompson, W. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(19), 4321-4326. doi: 10.1093/nar/8.19.4321
- Park, S., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D., Fujii, H., & Zhao, Y. et al. (2009). Abscisic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins. *Science*, 324(5930), 1068-1071. doi: 10.1126/science.1173041
- Pizzio, G., Mayordomo, C., Lozano-Juste, J., Garcia-Carpintero, V., Vazquez-Vilar, M., & Nebauer, S. et al. (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. doi: 10.3390/cells11050795
- Pizzio, G., Rodriguez, L., Antoni, R., Gonzalez-Guzman, M., Yunta, C., & Merilo, E. et al. (2013). The PYL4 A194T Mutant Uncovers a Key Role of PYR1-LIKE4/PROTEIN PHOSPHATASE 2CA Interaction for Abscisic Acid Signaling and Plant Drought Resistance. *Plant Physiology*, 163(1), 441-455. doi: 10.1104/pp.113.224162
- Saez, A., Robert, N., Maktabi, M., Schroeder, J., Serrano, R., & Rodriguez, P. (2006). Enhancement of Abscisic Acid Sensitivity and Reduction of Water Consumption in Arabidopsis by Combined Inactivation of the Protein Phosphatases Type 2C ABI1 and HAB1. *Plant Physiology*, 141(4), 1389-1399. doi: 10.1104/pp.106.081018
- Schneider, C., Rasband, W., & Eliceiri, K. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671-675. doi: 10.1038/nmeth.2089
- Shabala, S., Demidchik, V., Shabala, L., Cuin, T., Smith, S., Miller, A., Davies, J., & Newman, I. (2006). Extracellular Ca<sup>2+</sup> ameliorates NaCl-induced K<sup>+</sup> loss from *Arabidopsis* root and leaf cells by controlling plasma membrane K<sup>+</sup>-permeable channels. *Plant Physiol*, 141(4), 1653–1665. doi:10.1104/pp.106.082388
- Soon, F., Ng, L., Zhou, X., West, G., Kovach, A., & Tan, M. et al. (2012). Molecular Mimicry Regulates ABA Signaling by SnRK2 Kinases and PP2C Phosphatases. *Science*, 335(6064), 85-88. doi: 10.1126/science.1215106
- Sun J., Chen S., Dai S., Wang, R., Li, N., Shen, X., Zhou, X., Lu, C., Zheng, X., Hu, Z., Zhang, Z., Song, J., & Xu, Y. (2009). NaCl-induced alternations of cellular and tissue ion fluxes in roots of salt-resistant and salt-sensitive poplar species. *Plant Physiology*, 149(2), 1141–1153. doi: 10.1104/pp.108.129494

- Sun, Z., Li, S., Chen, W., Zhang, J., Zhang, L., Sun, W., & Wang, Z. (2021). Plant Dehydrins: Expression, Regulatory Networks, and Protective Roles in Plants Challenged by Abiotic Stress. *International Journal Of Molecular Sciences*, 22(23), 12619. doi: 10.3390/ijms222312619
- Synthego, (2022). Synthego Performance Analysis, ICE Analysis. 2019. v3.0. Retrieved 3 October 2022, from <https://ice.synthego.com/#/>
- Vaidya, A., Peterson, F., Yarmolinsky, D., Merilo, E., Verstraeten, I., & Park, S. et al. (2017). A Rationally Designed Agonist Defines Subfamily IIIA Abscisic Acid Receptors As Critical Targets for Manipulating Transpiration. *ACS Chemical Biology*, 12(11), 2842-2848. doi: 10.1021/acscchembio.7b00650
- Vazquez-Vilar, M., Bernabé-Orts, J., Fernandez-del-Carmen, A., Ziarolo, P., Blanca, J., Granell, A., & Orzaez, D. (2016). A modular toolbox for gRNA–Cas9 genome engineering in plants based on the GoldenBraid standard. *Plant Methods*, 12(1). doi: 10.1186/s13007-016-0101-2
- Yang, Z., Liu, J., Poree, F., Schaeufele, R., Helmke, H., & Frackenpohl, J. et al. (2019). Abscisic Acid Receptors and Coreceptors Modulate Plant Water Use Efficiency and Water Productivity. *Plant Physiology*, 180(2), 1066-1080. doi: 10.1104/pp.18.01238

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Esquema simplificado de la vía de señalización de ABA .....   | 2  |
| <b>Figura 2.</b> Formación y estructura del complejo ternario ABA-PYL-PP2C.....  | 4  |
| <b>Figura 3.</b> Clasificación de los receptores de ABA en <i>A. thaliana</i> y <i>N. benthamiana</i> .....                                      | 5  |
| <b>Figura 4.</b> Estructuras 2D y 3D del ABA y algunos agonistas de receptores de ABA.....   | 7  |
| <b>Figura 5.</b> Protocolo de generación de plantas transgénicas de <i>N. benthamiana</i><br>mediante cultivo <i>in vitro</i> .....              | 17 |
| <b>Figura 6.</b> Cromatogramas representativos de la secuencia génica de <i>NbPYL1a</i> .....  | 19 |
| <b>Figura 7.</b> Cromatogramas representativos de la secuencia génica de <i>NbPYL1b</i> .....  | 20 |
| <b>Figura 8.</b> Germinación/establecimiento de líneas WT5 y 10K2.7_8/ <i>pent3</i> de <i>N.</i><br><i>Benthamiana</i> en presencia de ABA ..... | 23 |
| <b>Figura 9.</b> Efecto del ABA sobre la germinación de líneas WT5 y 10K2.7_8/ <i>pent3</i> de<br><i>N. benthamiana</i> .....                    | 24 |
| <b>Figura 10.</b> Efecto del ABA sobre el establecimiento de líneas WT5 y 10K2.7_8/ <i>pent3</i><br>De <i>N. benthamiana</i> .....               | 26 |
| <b>Figura 11.</b> Crecimiento de líneas WT5 y 10K2.7_8/ <i>pent3</i> de <i>N. benthamiana</i> en<br>Presencia de agonista X .....                | 27 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1.</b> Detalle de los genes mutados en cada línea de <i>N. benthamiana</i> secuenciada.  | 21 |
| <b>Tabla 2.</b> Resumen de indicadores de crecimiento y desarrollo en las líneas WT5 y<br>10K2.7_8/ <i>pent3</i> de <i>N. benthamiana</i> ..... | 30 |

## ANEXO I

### RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030

**Relación del TFM “Caracterización genotípica y fenotípica de mutantes de receptores de ABA de *Nicotiana benthamiana* obtenidos por mutagénesis con CRISPR/Cas9” 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>                        |             |              | X           |                   |
| ODS 2. <b>Hambre cero.</b>                              | X           |              |             |                   |
| ODS 3. <b>Salud y bienestar.</b>                        |             | X            |             |                   |
| ODS 4. <b>Educación de calidad.</b>                     |             |              |             | X                 |
| ODS 5. <b>Igualdad de género.</b>                       |             |              |             | X                 |
| ODS 6. <b>Agua limpia y saneamiento.</b>                |             |              |             | X                 |
| ODS 7. <b>Energía asequible y no contaminante.</b>      |             |              |             | X                 |
| ODS 8. <b>Trabajo decente y crecimiento económico.</b>  |             |              |             | X                 |
| ODS 9. <b>Industria, innovación e infraestructuras.</b> |             |              |             | X                 |
| ODS 10. <b>Reducción de las desigualdades.</b>          |             |              |             | X                 |
| ODS 11. <b>Ciudades y comunidades sostenibles.</b>      |             |              |             | X                 |
| ODS 12. <b>Producción y consumo responsables.</b>       |             | X            |             |                   |
| ODS 13. <b>Acción por el clima.</b>                     | X           |              |             |                   |
| ODS 14. <b>Vida submarina.</b>                          |             |              |             | X                 |
| ODS 15. <b>Vida de ecosistemas terrestres.</b>          |             |              | X           |                   |
| ODS 16. <b>Paz, justicia e instituciones sólidas.</b>   |             |              |             | X                 |
| ODS 17. <b>Alianzas para lograr objetivos.</b>          |             |              |             | X                 |

### Descripción de la alineación del TFM con los ODS con un grado de relación más alto.

Los ODS más relacionados con este TFM son “Hambre cero” y “Acción por el clima”. De cara a los problemas actuales de la agricultura como el aumento de las sequías, la contaminación del agua dulce y el deterioro del suelo fértil, la biotecnología y la ingeniería son claves para encontrar soluciones innovadoras, en un contexto donde además la población mundial sufre un aumento exponencial. En relación con el objetivo “Hambre cero”, este trabajo puede ser de utilidad en la búsqueda de soluciones al descenso en la producción de alimentos provocado por el cambio climático. Por extensión, el trabajo también se relaciona con “Producción y consumo responsables”, ya que el objetivo es producir más y con menos recursos, y con “Salud y bienestar”, que va muy ligado a acabar con el hambre.

Por otro lado, la relación del TFM con el objetivo “Acción por el clima” se refiere al intento de las Naciones Unidas para aumentar la capacidad de los países para lidiar con los efectos del cambio climático, incluyendo la integración de un nuevo marco tecnológico que permita hacer frente a ellos.