



Metabolisme de poliamines en Arabidopsis i implicació en la resposta a l'estrès

Joan Planas Portell

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Universitat de Barcelona. Facultat de Farmàcia. Departament de
Productes Naturals, Biologia Vegetal i Edafologia.

Metabolisme de poliamines en Arabidopsis i implicació en la resposta a l'estrès

Joan Planas Portell

2013

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

Departament de Productes Naturals, Biologia Vegetal i Edafologia

PROGRAMA DE DOCTORAT: BIOTECNOLOGIA

Metabolisme de poliamines en Arabidopsis i
implicació en la resposta a l'estrès

Memòria presentada per Joan Planas Portell per optar al títol de doctor per la
Universitat de Barcelona

Directora:

Doctorand:

Dra. Teresa Altabella Artigas

Joan Planas Portell

Professora Titular

Universitat de Barcelona

A la Clara, en Joan i en Pau

Molts diuen que l'èxit és qüestió de sort, pocs diuen que la sort és qüestió d'esforç.

Agraïments

Són moltes les persones que m'han ajudat i amb les que he compartit en aquesta etapa de la meua vida i em farien falta tantes pàgines com té la tesi per citar-les a totes i agrair-les com es mereixen. Però intentaré ser una mica més breu ...

Primer de tot gràcies a la Teresa per l'assignatura de Transformació genètica vegetal, per la direcció de dos "treballs dirigits", dos "col·laboració en departament", dos màsters, per poder comptar sempre amb la seva ajuda, tenir sempre tanta paciència, i finalment gràcies per dirigir-me en aquesta tesi doctoral.

Gràcies a la Marta per ser primer una gran alumna, i després una gran companya. Gràcies per el suport constant i per ensenyar-me a treballar en equip, doncs quan treballàvem junts sumàvem molt més que sols.

Gràcies al Dr. Joan Vallès per deixar-me fer servir el seu microscopi, que ha sigut imprescindible per realitzar els estudis d'obertura estomàtica.

Gràcies a la Dra. Teresa Lafuente i a tot el seu grup, només hi vaig passar dues setmanes al seu laboratori, però ja em sentia com un més.

Gràcies als companys del Departament de Fisiologia Vegetal de la UB, l'Ana, la Miriam, l'Oscar, l'Albert, la Yaiza, la Karla, en Rafa, la Laura, en Jean, la Natalia i l'Estrahil. També gràcies al professorat d'aquest mateix departament, ja que em varen ensenyar a donar practiques i em varen encomanar el seu esperit docent.

Gràcies als serveis científicotècnics de la UB, sobretot a en Ramon i la Viky.

Gràcies als serveis d'hivernacles del CRAG per aquestes magnífiques plantes de tabac, als de seqüenciació per ser tan ràpids i atents, a la Cristina per les poliamines, als de real time i als de proteòmica per respondre les preguntes més complicades i retorcides.

Gràcies a Patrícia per cuidar les meves plantes amb tanta atenció i procurar que no els faltés de res.

Gràcies a tots els companys del laboratori 203 Karel, Carmen, Julio, Cairo, Irini, Monse, Ferran, Jordi, Enrique, Nobahor, Idalia i especialment a en Francesc per treure'm sempre les castanyes del foc quan l'ordinador no vol fer el que vull o alhora de fer westerns. Ha sigut un plaer compartir laboratori amb tots vosaltres.

Gràcies a toooooooooots els companys de CRAG, per aquesta família tan gran i tan maca. Per estar sempre disposats a ajudar, a compartir recursos i experiència; ser tan aplicats al laboratori, i cal dir-ho també, tan divertits a fora. En aquest centre hi he estat els dos últims anys i ha estat com si hi hagués estat sempre, doncs hi he fet molts amics i hi he compartit moltes experiències.

Gràcies a tots els amics empordanesos, especialment als del "Paller" i als de la colla del 85, ja que sempre han esperat la meva tornada de bcn el cap de setmana.

Gràcies a tots els companys de pis que he tingut en tots aquest anys i especialment als últims, amb els que he compartit més temps, en Pere, la Marta, la Nuria i en Pep.

També voldria agrair tot el suport rebut per part de la meva família i especialment els més petits la Clara, en Joan i en Pau.

Gràcies a tots!!!!!!!

Índex

Índex

Abreviacions	1
1 Introducció	5
1.1 L'estrès en plantes superiors	5
1.1.1 Resposta de les plantes a l'estrès ambiental	7
1.1.2 L'ABA i la seva implicació en les respostes a estrès abiòtic	9
1.1.3 Estrès per fred	11
1.1.4 Estrès per deshidratació	14
1.1.4.1 Taxa de transpiració: regulació del moviment estomàtic	15
1.1.4.2 Manteniment de l'equilibri osmòtic: acumulació d'osmolits	18
1.2 Poliamines en vegetals	19
1.2.1 Biosíntesis de les PAs	22
1.2.2 Implicació de les PAs en la resposta de les plantes a estrès	24
1.2.2.1 Perfil transcripcional dels gens de la síntesis de PAs en resposta a estrès ..	26
1.2.2.2 Efectes de la modificació dels nivells de poliamines en resposta a l'estrès	28
1.2.3 Degradació de PAs	32
1.2.3.1 Amino oxidases dependents de flavinnucleòtids (PAOs)	32
1.2.3.2 Amino oxidases dependents de coure (CuAOs)	33
1.2.3.3 Funció de les amino oxidases	35
2 Objectius	41
3 Materials i mètodes	45
3.1 Material vegetal	45
3.2 Cultiu i tractaments del material vegetal	46
3.2.1 Creixement <i>in vitro</i> d'Arabidopsis	46
3.2.1.1 Tractaments amb hormones i elicitors	46
3.2.2 Creixement en terra d'Arabidopsis	47
3.2.2.1 Deshidratació.	48
3.2.2.2 Congelació.	49

3.3	Determinació de paràmetres relacionats amb l'estrès hídric.....	50
3.3.1	Determinació de la quantitat d'aigua retinguda pel substrat	50
3.3.2	Determinació del contingut relatiu d'aigua en les fulles.....	50
3.3.3	Determinació del potencial de soluts.....	51
3.3.4	Mesures de transpiració.	51
3.3.5	Determinació del nombre d'estomes i del grau d'obertura estomàtica.	52
3.4	Determinació de parametres relacionats amb la resposta a ABA	52
3.4.1	Obertura estomàtica en resposta a ABA.....	52
3.4.2	Creixement d'arrels amb aplicació exògena d'ABA	53
3.4.3	Germinació de les llavors en presència d'ABA exogen	53
3.5	Anàlisi dels nivells de poliamines per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC)	54
3.5.1	Extracció de PAs a partir de teixit vegetal.....	54
3.5.2	Dansilació de PAs.....	54
3.5.3	Preparació dels estàndards de PAs	55
3.5.4	Separació de PAs per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC)	55
3.5.5	Quantificació dels nivells de PAs.....	56
3.6	Anàlisi dels nivells ABA pel mètode ELISA.....	56
3.6.1	Extracció i purificació de les mostres per a la determinació d'ABA.	56
3.6.2	Quantificació dels nivells d'ABA	56
3.7	Mètodes bacterians	58
3.7.1	Soques bacterianes.....	58
3.7.2	Medis de cultiu	59
3.7.3	Antibiòtics.....	59
3.7.4	Preparació de cèl·lules competents pel mètode del CaCl ₂	59
3.7.5	Transformació de bacteris competents per xoc tèrmic	60
3.7.6	Extracció de DNA plasmídic d' <i>E.coli</i>	60
3.8	Mètodes de manipulació, extracció i quantificació d'àcids nucleics.	61
3.8.1	Adquisició de plàsmids.....	61
3.8.2	Oligonucleòtids.....	61
3.8.3	Obtenció dels plasmidis portadors dels gens d'interès	65
3.8.3.1	Generació dels <i>entry clones</i>	65

3.8.3.2	Generació dels <i>expression clones</i>	66
3.8.4	Amplificació per PCR.....	68
3.8.5	Seqüenciació del DNA	68
3.8.6	Purificació de fragments de DNA.....	69
3.8.7	Extracció de RNA del teixit vegetal	69
3.8.8	Obtenció de cDNA	70
3.8.9	RT-PCR quantitativa	70
3.9	Producció i anàlisi de proteïnes.....	71
3.9.1	Producció de proteïnes de fusió en <i>N.benthamiana</i>	71
3.9.2	Purificació de les proteïnes recombinants AtCuAO1, AtCuAO2 i AtCuAO3 fusionades a TAP.	72
3.9.3	Anàlisi immunològic de les proteïnes.....	73
3.9.4	Activitat enzimàtica de les proteïnes purificades	74
3.9.5	Localització de proteïnes	75
4	Resultats	79
4.1	Estudi de la possible funció protectora de la Put en resposta al estrés per fred	79
4.1.1	Caracterització de línies transgèniques <i>35S::ADC1</i>	79
4.1.2	Tolerància a congelació de les plantes transgèniques <i>35S::ADC1</i>	81
4.1.3	Tolerància a congelació de les plantes transgèniques <i>35S::ADC2</i>	82
4.2	Anàlisi de la tolerància a deshidratació	84
4.2.1	Tolerància a deshidratació de les plantes sobreexpressores d' <i>ADC1</i> i <i>ADC2</i> . ..	84
4.2.2	Efecte de l'aplicació de gibberel·lines en la tolerància a deshidratació de les plantes sobreexpressores d' <i>ADC2</i>	87
4.2.3	Contingut d'aigua i potencial de soluts de les línies transgèniques <i>35S::ADC1</i> i <i>35S::ADC2</i>	88
4.2.4	Taxa de transpiració i obertura estomàtica en les línies transgèniques <i>35S::ADC2</i>	90
4.2.5	Nivells de poliamines de les línies transgèniques <i>35S::ADC2</i> en resposta a deshidratació.	92
4.2.6	Nivells d'ABA en les línies transgèniques <i>35S::ADC2</i>	95
4.2.7	Tancament estomàtic de les plantes transgèniques <i>35S::ADC2</i> en resposta a ABA	97

4.2.8	Obtenció de plantes híbrides <i>aba2-3</i> x <i>35S::ADC2</i> i estudi de la tolerància a deshidratació	98
4.2.9	Efecte de l'aplicació exògena d'ABA en el creixement d'arrels.....	100
4.2.10	Efecte de l'aplicació exògena d'ABA en la germinació de les llavors.....	102
4.2.11	Perfil transcripcional de gens de resposta a ABA.	103
4.2.12	Localització de les proteïnes ADC1 i ADC2.....	105
4.3	Caracterització de tres amino oxidases d' <i>Arabidopsis</i> dependents de coure	108
4.3.1	Comparació de les seqüències d' <i>AtCuAO1</i> , <i>AtCuAO2</i> i <i>AtCuAO3</i> amb altres CuAOs	109
4.3.2	Expressió d' <i>AtCuAO1</i> , <i>AtCuAO2</i> i <i>AtCuAO3</i> en <i>Nicotinana benthamiana</i> i caracterització de les proteïnes recombinants fusionades a TAP.....	112
4.3.3	Perfil d'expressió d' <i>AtCuAO1</i> , <i>AtCuAO2</i> i <i>AtCuAO3</i> durant el desenvolupament i en diferents òrgans vegetals.	115
4.3.4	Perfil d'expressió d' <i>AtCuAO1-3</i> en resposta a diferents estímuls externs	116
4.3.5	Localització subcel·lular d' <i>AtCuAO1</i> , <i>AtCuAO2</i> i <i>AtCuAO3</i>	117
5	Discussió	123
5.1	En <i>Arabidopsis</i> l'acumulació de Put per sobreexpressió d' <i>ADC1</i> o <i>ADC2</i> indueix tolerància a congelació	123
5.2	En <i>Arabidopsis</i> l'acumulació de Put per sobreexpressió d' <i>ADC2</i> indueix tolerància a deshidratació	125
5.3	La tolerància a deshidratació de les plantes sobreexpressores d' <i>ADC2</i> podria ser deguda en part a una deficiència en GAs.....	127
5.4	L'acumulació de putrescina per sobreexpressió d' <i>ADC2</i> regula l'obertura estomàtica i la pèrdua d'aigua per transpiració	128
5.5	L'acumulació de Put per sobreexpressió d' <i>ADC2</i> no altera els nivells d'ABA en plantes d' <i>Arabidopsis</i>	130
5.6	La sobreexpressió d' <i>ADC2</i> en <i>Arabidopsis</i> indueix hipersensibilitat a ABA.....	131
5.7	Les proteïnes ADC1 i ADC2 presenten diferent localització subcel·lular	133
5.8	Caracterització funcional de tres gens d' <i>Arabidopsis</i> (<i>AtCuAO1-3</i>) que codifiquen amino oxidases dependents de coures	134
5.9	<i>AtCuAO2</i> i <i>AtCuAO3</i> es localitzen als peroxisomes on podrien cooperar amb les PAOs en el catabolisme de les PAS,.....	136

5.10 En l'apoplast d'Arabidopsis l'oxidació de les PAs es porta a terme principalment per CuAOs.....	138
5.11 Possible especialització cel·lular d'AtCuAO1, AtCuAO2 i AtCuAO3	138
5.12 Integració de les dos rutes catabòliques de PAs en Arabidopsis.....	140
6 Conclusions	145
7 Bibliografia	149

Abreviacions

ABA	Àcid abscísic	mM	Milimolar
Abs	Absorbància	Mpa	Milipascals
ADC	Arginina descarboxilasa	MS	Murashige i Skoog
Agm	Agmatina	N	Normal (concentració)
AIH	Agmatina iminohidrolasa	N-cput	N-carbamoilputrescina
Arg	Arginina	nmol	nanomols
ATAO	<i>Arabidopsis thaliana</i>	O.N	Tota la nit
	Amino Oxidasa	°C	Graus centígrads
BSA	Albúmina sèrica bovina	ODC	Ornitina descarboxilasa
Cad	Cadaverina	Orn	Ornitina
CaMV	Cauliflower mosaic virus	PA	Poliamina
CuAO	Aminoxidasa dependent de coure	PAs	Poliamines
		PCA	Àcid perclòric
DAO	Diaminooxidasa	PF	Pes fresc
DAP	Diaminopropa	pg	Picograms
DNA	Àcid desoxiribonucleic	PS	Pes sec
EDTA	Etilendiaminotetraacetat	Put	Putrescina
g	gram	q.s.p	Quantitat suficient per
G	Constant gravitacional	ROS	Espècies reactives d'oxigen
GAs	Gibberel·lines	s	Siemens
h	Hores	SA	Àcid salicílic
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució	SAM	S-adenosilmetionina
		SAMdC	S-adenosilmetionina descarboxilada
HTD	1, 7-diaminoheptano		
K	Graus Kelvin	SAMDC	S-adenosilmetionina descarboxilasa
Kg	Kilogram		
Km	Kanamicina	SDS	Dodecilsulfat sòdic
l	Litres	Spd	Espermidina
mmol	Milimols	SPDS	Espermina sintasa

Spm	Espermina	Wt	Tipus silvestre
St	Estàndards	μ l	Microlitre
T ^a	Temperatura	μ M	Micromolar
v/v	volum/volum	μ mol	Micromols
Vol	Volum	ψ_s	Potencial de soluts

1 Introducció

1 Introducció

1.1 L'estrès en plantes superiors

Les plantes, a diferència dels animals, estan necessàriament lligades al seu ambient i per tant, freqüentment exposades a condicions adverses, com l'atac per patògens o herbívors, temperatures extremes, sequera, salinitat, o contaminants ambientals, els quals no poden evitar fent us de la seva capacitat motriu com passa en el cas dels animals. En conseqüència, les plantes han evolucionat com a sistemes biològics de gran plasticitat fenotípica i són capaces de modificar els seus patrons de creixement i desenvolupament, o tot el seu metabolisme i fisiologia d'acord a les exigències de l'entorn.

Lichtenthaler (1998) va definir l'estrès en els vegetals com “qualsevol condició desfavorable per al creixement i desenvolupament dels vegetals”, indicant que en la major part dels casos “les plantes es poden recuperar quant desapareixen els agents estressants”. Així, quan una planta està sotmesa a unes condicions significativament diferents de les òptimes per a la vida es diu que està sotmesa a estrès, si bé les diferents espècies o varietats difereixen en els requeriments òptims i per tant en la seva susceptibilitat a un estrès determinat (Valladares i Niinemets, 2008). A més, hi ha períodes o etapes del desenvolupament on les plantes poden ser particularment sensibles o insensibles a un determinat estrès. Les plantes responen a l'aparició d'una situació d'estrès segons un model seqüencial de quatre fases. Quan es presenta l'estrès les plantes reaccionen alentint o aturant les seves funcions biològiques bàsiques (ex.: la fotosíntesi, el transport o acumulació de metabòlits i l'absorció o recirculació d'ions) i reduint el seu vigor. Aquesta reacció s'anomena fase d'alarma i és concomitant amb l'activació dels mecanismes per a fer front a l'estrès. Si les plantes no tenen mecanismes adequats de defensa o de resposta, o si la situació d'estrès és molt intensa, experimenten danys irreversibles i moren. Però si aquests mecanismes existeixen, s'activen i fan que el metabolisme cel·lular s'adapti a les noves condicions, activant processos de reparació de la maquinària malmesa. Aquesta fase s'anomena de resistència, i els canvis que es produeixen permeten a la planta assolir un nou estat fisiològic òptim. Quan la situació d'estrès es manté durant un temps excessiu, la capacitat de resistència s'esgota i la planta atura de nou les seves funcions. Aquesta fase

d'esgotament de la resistència culmina amb la mort de la planta si la situació d'estrès no desapareix a temps. Si l'estrès desapareix, les funcions fisiològiques es poden regenerar assolint, per tant, la fase de regeneració (Azcón-Bieto i Talón, 2008).

Segons el tipus de factor mediambiental advers, l'estrès en vegetals es pot classificar com biòtic o abiòtic. L'estrès biòtic el causen els éssers vius, com animals, altres plantes i agents patògens (bactèries, fongs, virus). L'estrès abiòtic, depenent de la natura de l'agent causant, pot ser físic (dèficit hídric, salinitat en la seva component osmòtica, temperatures extremes, radiació, inundació i estrès mecànic) o químic (salinitat en la seva component iònica, carència de nutrients i agents contaminants ambientals) (Orcutt i Nielsen, 2000). L'exposició de les plantes a tots aquests estressos mediambientals es tradueix en una pèrdua de productivitat i en alteracions del desenvolupament, tant de les plantes silvestres com de les conreades.

Segons les previsions dels experts en medi ambient, durant el segle XXI els efectes globals de la desertització, salinitat elevada del sòl i l'acumulació de CO₂ atmosfèric produiran canvis dràstics en les condicions climatològiques, però no totes les regions patiran el mateix tipus de canvi. Algunes d'elles podrien tornar-se més caloroses i esdevenir deserts, mentre que altres podrien tornar-se molt fredes (IPCC, 2007). Gran part dels impactes del canvi climàtic sobre els recursos forestals i agrícoles, tant a nivell global com a nivell regional ja han estat identificats (IPCC, 2007). Pel que fa als recursos forestals, s'està produint un alentiment del creixement i productivitat a causa d'un clar augment de l'estrès hídric, un augment del perill d'incendis forestals per la major temperatura i sequedat de l'aire, i un desplaçament altitudinal de les zones de vegetació, que pot comportar tant la destrucció dels endemismes de les zones més altes sense vegetació, com la conversió en estepa d'algunes zones baixes actualment de tipus bosc. D'altra banda, a nivell agrícola, el canvi climàtic està produint un descens de la productivitat dels secans i pastures per l'augment de l'estrès hídric i la sequera, un augment de la vulnerabilitat dels fruiters per l'avançament de la floració, a causa de les gelades tardanes, una major vulnerabilitat dels sòls degut a la salinització, i una major incidència de diverses plagues agrícoles (Peñuelas, 2004; Iglesias, 1995).

Segons el Programa de les Nacions Unides per al Medi Ambient, la desertificació amenaça a la quarta part de les terres del planeta, així com a 250 milions de persones i el manteniment de més de 1000 milions d'habitants de 100 països a causa de la

disminució de la productivitat agrícola (http://www.cinu.org.mx/temas/des_sost/desert.htm). Mentre que la població mundial incrementa en una proporció alarmant, arribant al voltant de 50.000 milions l'any 2050, per contra, la productivitat agrícola decreix progressivament com a conseqüència dels efectes negatius derivats dels estressos de tipus ambiental. Doncs és clar que la reducció de les pèrdues de productivitat agrícola ha de ser un objectiu prioritari de cara a sostenir la demanda d'aliment a nivell global. L'estudi de les respostes de les plantes a l'estrès és un aspecte fonamental per comprendre i millorar l'adaptació de les plantes a la creixent pressió ambiental. El coneixement dels mecanismes de resistència a estrès permet comprendre els processos evolutius implicats en l'adaptació de les plantes a un ambient advers i predir, fins a cert punt, la resposta vegetal a l'increment de l'adversitat, associada en molts casos al canvi climàtic. Aquests coneixements es poden aplicar a millorar les característiques de les plantes, tant pel que fa a les seves fases de cultiu, com a la selecció de varietats que s'ajustin a uns requeriments ambientals determinats o, simplement, per millorar la productivitat d'una espècie (Valladares i Niinemets, 2008).

1.1.1 Resposta de les plantes a l'estrès ambiental

Les plantes responen i s'adapten als diferents estressos ambientals a nivell molecular, cel·lular, fisiològic i bioquímic (Yamaguchi-Shinozaki i Shinozaki, 2006). En les últimes dècades, els avenços tecnològics en el camp de la biologia molecular i genètica de plantes han permès estudiar les respostes a estrès d'una manera global, utilitzant tècniques de genòmica, proteòmica i metabolòmica. Aquests estudis s'han dut a terme principalment amb la planta model *Arabidopsis thaliana*, en la qual es centra aquest treball, i posen de manifest que les respostes de les plantes davant diferents tipus d'estrès ambientals estan mediades per rutes reguladores ben definides, conservades i estretament interconnectades (Hirt i Shinozaki, 2004). Aquestes respostes permeten mantenir l'homeòstasi osmòtica regulant la síntesi i degradació de proteïnes i altres compostos amb funció protectora (ex: dehidrines, xaperones, prolina, glicina-betaïna, poliamines, etc.), i controlant etapes claus en diferents vies de transducció de senyals (metabòlica, hormonal i de desenvolupament) (Figura I.1).

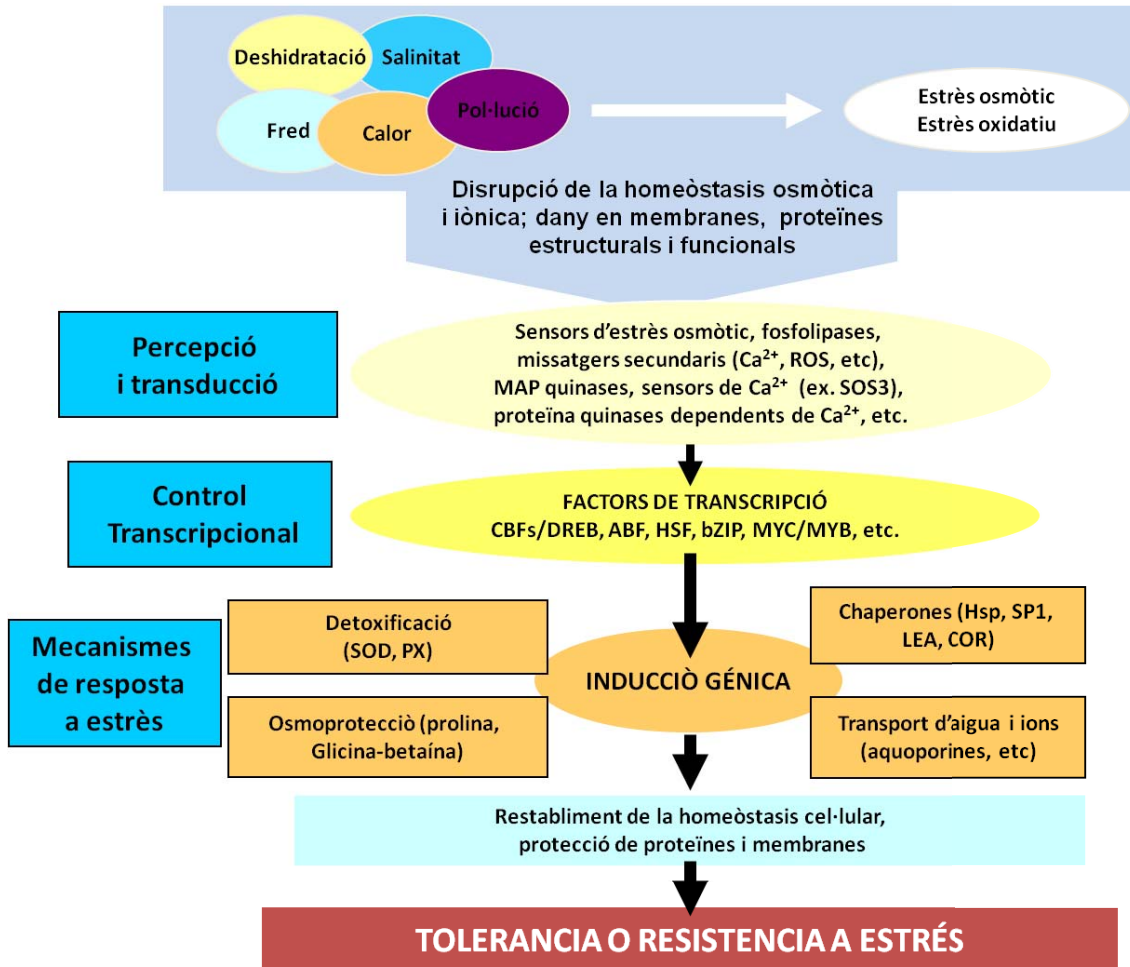


Figura I.1. Resposta de les plantes a estrès abiòtic. ABF, factor d'unió a elements ABRE; AtHK1, *Arabidopsis thaliana* histidina quinasa-1, bzip, cremallera bàsica de leucines; CBF / DREB, C-repeat-binding factor / proteïna d'unió que respon a deshidratació, CDPK, proteïna quinasa dependent de calci, COR, proteïnes de resposta al fred, HSP, proteïnes heat-shock, LEA, abundant en embriogènesi tardana, MAP, proteïnes activades per mitògens, PLP, fosfolipasa d, PtdOH, àcid fosfatídic, PX, peroxidasa, ROS, espècies reactives d'oxigen, SOD, superòxid dismutasa, SP1, proteïna estable 1. Adaptat de Vinocur i Altman (2005).

La senyal d'estrès posa en marxa una sèrie d'accions fins que es manifesten les respostes en les plantes. Aquestes accions comprenen la percepció per part de la planta de l'estímul estressant, el processament de la senyal, i la regulació de l'expressió gènica. Els estressos primaris (sequera, sal, fred, calor, pol·lució) estan interconnectats i produeixen dany cel·lular, alhora que indueixen altres estressos secundaris (osmòtic, oxidatiu). Quan les senyals inicials d'estrès són percebudes per la cèl·lula vegetal, s'activen processos de senyalització i controls transcripcionals que, alhora, activen mecanismes de resposta a estrès per restablir l'homeòstasi, protegint i reparant proteïnes

o membranes danyades (Figura I.1). Respostes inadequades en una o diverses etapes de la senyalització i del procés d'activació gènica poden donar lloc a canvis irreversibles en l'homeòstasi cel·lular i a la destrucció de membranes i/o proteïnes estructurals i funcionals, produint com a conseqüència la mort cel·lular (Vinocur i Altman, 2005). La tolerància de les plantes davant de l'estrès es pot incrementar manipulant els gens i proteïnes associats amb l'estrès o els nivells de metabòlits relacionats amb el mateix (Figura I.2).

En el treball descrit en aquesta memòria s'estudien els efectes de l'acumulació de poliamines en la resposta de les plantes a estrès per fred i sequera.

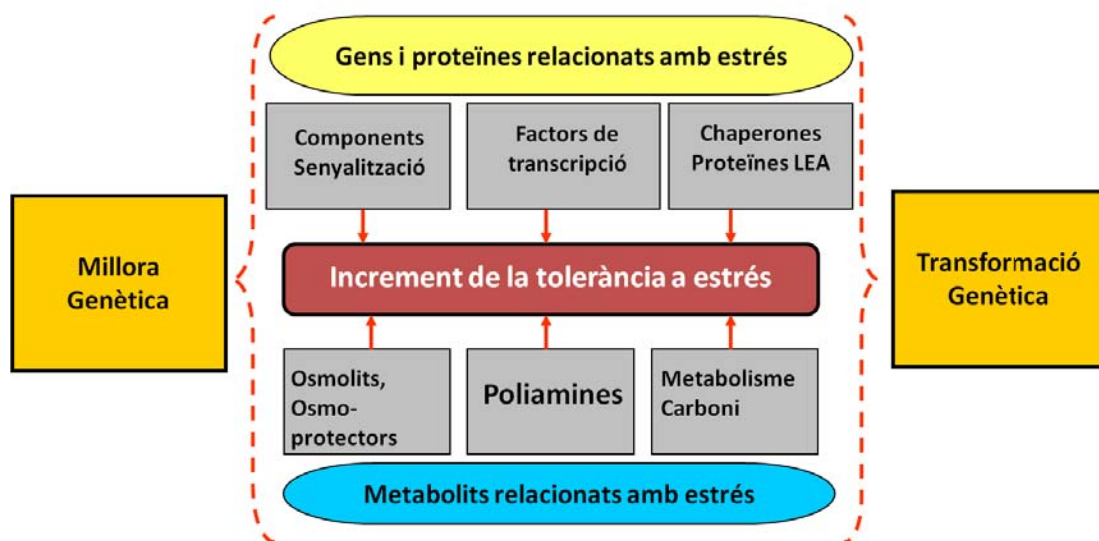


Figura I.2. La resistència de les plantes a l'estrès es pot augmentar manipulant gens o proteïnes, i sobreacumulant metabòlits associats amb aquest. La resistència de les plantes a l'estrès abiòtic és un caràcter multigènic que depèn de la coordinació de diferents gens, proteïnes i vies metabòliques. L'obtenció de plantes més resistents es pot aconseguir per enginyeria genètica, per millora genètica convencional, o per una combinació d'ambdues.

1.1.2 L'ABA i la seva implicació en les respostes a estrès abiòtic

El paper de l'ABA en resposta a estrès per fred, deshidratació i estrès salí ha portat a considerar-lo com l'hormona de l'estrès (Zeevaart i Creelman, 1988). Les plantes responen a molts estímuls ambientals amb canvis en la disponibilitat d'ABA, produïts per la seva redistribució o per un increment de la seva biosíntesi i, possiblement, per una modificació en la sensibilitat a l'hormona (Christmann i col., 2004). No obstant això, l'ABA no és únicament una hormona de l'estrès, sinó també una senyal endògena

requerida per al correcte desenvolupament vegetal (Cheng i col., 2002). Aquesta hormona es troba en totes les plantes superiors i en tots els teixits vegetals, regulant etapes molt importants del desenvolupament vegetal tals com el desenvolupament de l'embrió i la llavor, la tolerància a la dessecació de les llavors i la seva dormició, la germinació, l'heterofilia, el creixement cel·lular i la reproducció (Cutler i col., 2010).

Un dèficit hídric comporta immediatament l'activació d'una senyal que desencadena un augment de la biosíntesis d'ABA (Raghavendra i col., 2010), això comporta una "reprogramació" de la planta per tal de sobreviure a condicions adverses. Aquests canvis inclouen el tancament estomàtic, la síntesis d'osmoprotectors i la regulació transcripcional d'un gran nombre de gens. En *Arabidopsis*, l'ABA regula prop del 10% dels gens, un percentatge molt més elevat que les altres fitohormones. L'ABA regula gens que codifiquen proteïnes associades amb la resposta i tolerància a estrès, incloent proteïnes involucrades en l'embriogènesi, factors de transcripció, kinases i fosfatases, transportadors, enzims responsables de la producció d'osmoprotectors, senyalització fosfolipídica, metabolisme dels àcids grassos, metabolismes cel·lular, metabolisme de carbohidrats, i metabolisme secundari. Per contra, l'ABA disminueix l'expressió de gens involucrats en el creixement i el desenvolupament (Fujita i col., 2011). Quan els nivells d'ABA sobrepassen un determinat límit, s'indueixen efectes relacionats amb l'estrès, com són el tancament estomàtic i l'alteració en l'expressió d'un elevat nombre de gens (Hoth i col., 2002; Seki i col., 2002; Rock, 2000). El fet que molts estressos abiòtics resultin en últim terme en una deshidratació cel·lular i estrès osmòtic, i que l'aplicació d'ABA mimetitzi l'efecte d'una situació d'estrès, indica que existeix un solapament en el patró d'expressió gènica després de situacions d'estrès per fred, hídric, i salinitat, o per aplicació exògena d'ABA (Mahajan i Tuteja, 2005). Això suggereix que certs estressos (fred, hídric, salinitat) i l'ABA comparteixen elements comuns en les seves vies de senyalització i que es produeix un "cross-talk" entre elles per mantenir l'homeòstasi cel·lular (Mahajan i Tuteja, 2005).

En *Arabidopsis* hi ha almenys 3 vies de transducció del senyal en resposta a estrès abiòtic (Yamaguchi-Shinozaki i Shinozaki, 2006). Dues d'elles són dependents d'ABA i la tercera és independent. Molts gens que s'indueixen per aplicació d'ABA contenen un element *cis* de resposta conservat en els seus promotors anomenat ABRE ("ABA-responsive element", C/GACGTGGC). Tot i que l'element ABRE és el més representat

en els gens de resposta a estrès dependent d'ABA, una sola còpia en el promotor no és suficient per induir la resposta, sinó que també són necessàries seqüències acoplants o còpies addicionals del element ABRE (Yamaguchi-Shinozaki i Shinozaki, 2006). Els factors de transcripció de tipus bZIP, denominats AREB o ABFs, s'uneixen als elements ABRE induint l'expressió dels gens que els contenen. L'expressió d'alguns gens que s'indueixen per estrès és també induïda per ABA, però per una via independent d'ABRE. Els promotors d'aquests gens contenen elements *cis* de tipus MYB i MYC, on s'enganxen factors de transcripció com AtMYC2 i AtMYB2, activant l'expressió gènica (Yamaguchi-Shinozaki i Shinozaki, 2006). La via ABA-independent regula la resposta a l'estrès a través de l'element *cis* anomenats DRE (drought responsive element). Els factors de transcripció que interaccionen amb aquests element són membres de la família de factors AP2/EREBP (Mahajan i Tuteja, 2005; Shinozaki i col., 2003).

1.1.3 Estrès per fred

Les baixes temperatures són el principal factor que condiciona la distribució de les plantes al planeta. Els danys ocasionats pel fred a les plantes depenen de l'espècie, la susceptibilitat del genotip, l'estadi del desenvolupament, el nivell mínim de temperatura, la intensitat del fred, el temps d'exposició i el pre-condicionament (Barrales Domínguez i col., 2002).

Quan la temperatura no és tan baixa com perquè es formi gel en els teixits, té lloc el que s'anomena dany per fred (*chilling injury*), que produeix alteracions en les membranes, acompanyades per canvis en la seva permeabilitat (Tognetti i Salerno, 1998). A temperatures molt baixes, es forma gel als líquids intra- o extracel·lulars i es produeix l'anomenat dany per congelació (*freezing injury*), que és gairebé sempre letal, presumiblement perquè els cristalls de gel lesionen les membranes internes de les cèl·lules. Les plantes exhibeixen una gran diversitat en les seves respostes a les temperatures baixes, i algunes han desenvolupat mecanismes adaptatius naturals per sobreviure tant a temperatures baixes pròpiament dites (0-4 °C), com a temperatures de congelació (<0 °C). A les regions temperades, la major part de les espècies són capaces d'augmentar la seva tolerància a la congelació després d'un període d'exposició a temperatures entre 0°C i 10°C. Aquest procés adaptatiu és conegut com aclimatació a temperatures baixes (Levitt, 1980).

El procés d'aclimatació és molt complex i comporta nombrosos canvis fisiològics i bioquímics. Entre els més importants podem assenyalar els canvis en la composició lipídica de les membranes (Uemura i Steponkus, 1999), els nivells de Ca^{2+} citosòlic (Knight, 1999), i la concentració d'hormones i soluts compatibles (Garg i col., 2002; Gilmour i col., 2000; Wanner i Juntila, 1999; Xin i Browse, 1998; Sauter i col., 1996; Ristic i Ashworth, 1994), així com la disminució de l'activitat fotosintètica (Christie i col., 1994) i l'augment en l'activitat antioxidant (Llorente i col., 2002). La majoria d'aquests canvis estan regulats a nivell d'expressió gènica (Vogel i col., 2005; Hannah i col., 2005; Lee i col., 2005; Fowler i Thomashow, 2002). Els gens regulats per fred presenten en el seu promotor un element *cis*, denominat CRT / DRE, essencial per induir l'expressió gènica (Yamaguchi-Shinozaki i Shinozaki 1994, Baker i col., 1994), al que s'uneixen els factors transcripcionals anomenats CBFs/DREB1s (Thomashow, 1999; Medina i col., 1999b). A més, molts dels gens induïbles per fred també són regulats per deshidratació, altes concentracions de sal i ABA, suggerint l'existència de vies de senyalització comunes que s'activen en resposta a diferents estressos (Hannah i col., 2005; Shinozaki i col., 2003; Kreps i col., 2002; Seki i col., 2002; Seki i col., 2001; Thomashow, 1999). L'estabilitat dels missatgers i el rendiment de la traducció també són importants per a la correcta activació de la resposta d'aclimatació a les temperatures baixes, ja que alguns gens, els transcrits dels quals s'acumulen en resposta a fred, estan regulats post-transcripcionalment (Dunn i col., 1994; Wolfrain i col., 1993; Hajela i col., 1990).

Algunes hormones vegetals i els soluts compatibles també juguen un paper important en la resposta d'aclimatació. La principal hormona implicada en la resposta de les plantes a fred, tant en la congelació com en l'aclimatació, igual que en la majoria de estressos abiòtics, és l'ABA. S'ha demostrat que els nivells d'ABA augmenten transitòriament en resposta a temperatures baixes en *Solanum commersonii*, una espècie capaç d'aclimatar, però no a *S. tuberosum* que no s'aclimata (Chen i Gusta, 1983). A més, l'aplicació exògena d'ABA a plantes no aclimatades de *S. commersonii* pot augmentar la seva tolerància a la congelació (Lang i col., 1994), així com induir l'expressió de gens regulats per temperatures baixes (Gilmour i Thomashow, 1991). D'altra banda, s'ha descrit que mutants d'*Arabidopsis* deficientes en la biosíntesi d'ABA tenen disminuïda la seva capacitat d'aclimatar, i aquesta deficiència pot ser recuperada

per aplicació d'ABA exogen (Xiong i col., 2001; Llorente i col., 2000). Encara que la majoria dels gens induïbles per temperatures baixes també s'indueixen per ABA (Thomashow, 1999), els gens *CBFs/DREB1s* no estan regulats per aquesta fitohormona (Medina i col., 1999; Gilmour i col., 1998; Liu i col., 1998), fet que suggereix que l'ABA regularia la resposta d'aclimatació a través d'una via de senyalització independent a la dels factors *CBFs/DREB1s* (Llorente i col., 2000). Tanmateix, s'ha observat que, en condicions específiques, l'ABA pot induir l'expressió dels gens *CBFs/DREB1s* (Li i col., 2006; Knight i col., 2004).

Altres molècules que s'acumulen durant el procés d'aclimatació i estan implicades en la tolerància a diferents estressos ambientals, incloses les temperatures de congelació, són els soluts compatibles (Gilmour i col., 2000; Wanner i Juntila, 1999). Els soluts compatibles són molècules hidrosolubles de baix pes molecular, que no pertorben la bioquímica intracel·lular, tot i que s'acumulen a nivells elevats, i contribueixen a mantenir l'equilibri osmòtic de la cèl·lula (Yancey i col., 1982). Aquestes molècules també poden protegir les cèl·lules estabilitzant membranes i biomolècules, quan els seus nivells són massa baixos per actuar com osmoprotectors pròpiament dits (Garg i col., 2002). En aquest sentit, s'ha vist que l'expressió d'alguns dels gens que codifiquen les proteïnes responsables de la síntesi d'aquests compostos s'indueix en resposta a temperatures baixes. Tal és el cas dels gens que codifiquen els dos enzims que controlen els nivells de sacarosa en *Arabidopsis*, la sacarosa fosfat sintasa (SPS) i la sacarosa sintasa (SuSy) (Dejardin i col., 1999; Strand i col., 1997) i col., 1999), del gen *UGP* d'*Arabidopsis*, que codifica una UDP-glucosa fosforilasa, implicada en la síntesi de glucosa i cel·lulosa (Ciereszko i col., 2001), o el gen pirrolin-5-carboxilasa sintasa, *P5CS*, que codifica l'enzim responsable de la síntesi de prolina en plantes (*P5CS*) (Xin i Browse, 1998). A més, l'addició de sucre (glucosa, sacarosa o fructosa) en concentracions elevades a cultius cel·lulars d'ordi mimetitzava el procés d'aclimatació a temperatures baixes, aconseguint una major tolerància a la congelació (Tabaei-Aghdaei i col., 2003). D'altra banda, el gen d'arròs *OsP5CS2*, que codifica per un enzim productor de prolina, induïble per fred, sal, deshidratació i ABA, és essencial per a la tolerància d'aquesta espècie a fred i salinitat (Hur i col., 2004). Un altre solut compatible implicat en el procés d'aclimatació és la betaïna. L'aplicació exògena d'aquest compost en ordi i blat de moro (Chen i col., 2000; Kishitani i col., 1994), així

com l'expressió constitutiva del gen que codifica la colina monooxigenasa (CMO), enzim implicat en la síntesi de betaïna en tabac, *Arabidopsis* i arròs (Nuccio i col., 1998; Sakamoto i Murata, 1998; Hayashi i col., 1997), incrementa la tolerància a la congelació de les plantes tractades o transformades, respectivament. Tanmateix, la importància dels sucres no radica únicament en el seu paper com a osmoprotectors, ja que s'ha demostrat que tenen també un paper com a molècules implicades en processos de senyalització (Jang i Sheen, 1994; Krapp i col., 1993; Sheen, 1990), i el mateix es pot dir dels altres soluts compatibles, ja que alguns d'ells s'acumulen en baixes quantitats (Alia i col., 1999; Iyer i Caplan, 1998).

Diversos estudis de metabolòmica global assenyalen la putrescina (Put) com un dels metabòlits que s'acumulen en plantes d'*Arabidopsis* sotmeses a temperatures baixes (Kaplan i col., 2004; Cook i col., 2004). Ja que el perfil dels canvis de Put és similar a l'observat en el cas d'altres osmolits, s'ha suggerit que les poliamines (PAs) podrien actuar com a soluts compatibles en condicions d'estrès per temperatures baixes (Kaplan i col., 2004). Les dades obtingudes amb mutants biosintètics de PAs, deficientes en Put, demostren que aquesta diamina té també un paper en la ruta de senyalització de fred dependent d'ABA (Cuevas i col., 2008).

En properes seccions, es tractarà en profunditat el metabolisme PAs en plantes i la seva implicació en les respostes a estrès abiòtic.

1.1.4 Estrès per deshidratació

Actualment, l'escassetat d'aigua constitueix un dels problemes més greus als quals les plantes s'han d'afrontar. La seva condició sèssil les ha portat a desenvolupar diversos mecanismes per adaptar-se i sobreviure a les contínues fluctuacions en la disponibilitat hídrica de l'entorn. Aquests mecanismes abarquen tant aspectes morfològics, dirigits a reduir la pèrdua d'aigua o incrementar l'absorció d'aquesta (mecanismes d'evasió de l'estrès), com aspectes fisiològics i bioquímics, associats a canvis a nivell cel·lular i molecular, que permeten tolerar la deshidratació causada per la sequera i altres situacions que comprometen l'equilibri osmòtic de les plantes, com una concentració elevada de sal al sòl o les temperatures extremes (Shao i col., 2008; Seki i col., 2007). La deshidratació provoca la disminució del potencial hídric cel·lular, això condueix a la pèrdua o reducció de la turgència. Sota aquestes condicions s'activen les

cascades de senyalització de l'estrès osmòtic, dependents i independents d'ABA, comentades en els apartats anteriors, que permeten a les plantes donar les respostes adequades per sobreviure (Zhu, 2002; Shinozaki i Yamaguchi-Shinozaki, 1999; Bray, 1993).

Les plantes són especialment sensibles a l'estrès hídric durant la fase vegetativa del cicle vital, i només unes quantes espècies han desenvolupat tolerància a la dessecació durant aquest estadi. La dessecació és una forma de dèficit hídric que implica la pèrdua de la major part de l'aigua protoplasmàtica i obliga a la supervivència comptant únicament amb l'aigua associada a les parets cel·lulars. Les espècies tolerants a la dessecació són les anomenades plantes de la resurrecció, entre les quals es troben *Craterosestigma plantagineum* i *Sporobolus stapfianus*, capaces de tolerar pèrdues d'aigua de més del 95% del seu contingut hídric total, i reiniciar el seu creixement i metabolisme normals unes hores després de la rehidratació (Ramanjulu i Bartels, 2002). No obstant això, totes les espècies poden tolerar pèrdues d'aigua entre el 10 i el 90% a l'estadi de llavor, després de l'acumulació d'ABA en l'embrió (West i Harada, 1993). De fet, molts dels mecanismes que es posen en marxa després de la percepció del dèficit hídric en els teixits vegetatius són comuns als que tenen lloc en els teixits embrionaris durant la maduració de la llavor.

Les respostes de les plantes al dèficit hídric es classifiquen clàssicament en respostes ràpides i respostes lentes. Les respostes ràpides són aquelles que tenen lloc en pocs minuts i que requereixen la modificació de l'activitat de proteïnes o complexes proteics com ara canals, transportadors iònics i aquaporines. Les respostes lentes es produeixen una mica més tard i comporten la modificació de l'expressió gènica i la modulació d'aquesta. Les funcions dels productes d'aquests gens són diverses, però en general, estan dirigides a minimitzar els efectes negatius del dèficit hídric tant a curt com a llarg termini.

1.1.4.1 Taxa de transpiració: regulació del moviment estomàtic

La regulació del moviment dels estomes juga un paper essencial en el manteniment de la homeòstasi hídrica vegetal. Es tracta d'un control complex, ja que ha s'ha de dur a terme alhora l'intercanvi de CO₂ i O₂ per fer la fotosíntesi i la respiració. Durant la nit, quan no hi ha demanda de CO₂, els porus estomàtics romanen tancats per tal d'evitar

pèrdues d'aigua innecessàries. Durant el dia, en canvi, la planta requereix una gran quantitat de CO₂ per dur a terme la fotosíntesi, i els estomes estan oberts. Si el subministrament d'aigua és abundant, la transpiració a través dels estomes genera un gradient de potencial hídric que permet el transport ràpid d'aigua i minerals des de les arrels a les parts aèries, aquest procés també serveix per refrigerar les fulles si fa calor o reben molta llum. Ara bé, si la disponibilitat d'aigua és escassa, la necessitat d'obtenir CO₂ entra en conflicte amb la de conservar l'aigua, i els estomes es tanquen per evitar la pèrdua d'aigua, impedit alhora la captació de CO₂.

El diàmetre del porus estomàtic està determinat per la forma de les cèl·lules oclusives, que tenen una paret amb unes propietats tals que en canvia la forma segons la pressió i turgència cel·lular. La disposició desigual de les microfibril·les de cel·lulosa a la paret de les cèl·lules oclusives confereix menor elasticitat a la part interior, pròxima al porus. Quan la pressió de turgència incrementa, la part exterior de la paret s'estén més que la interior i les cèl·lules s'arquegen deixant el porus obert, mentre que quan la pressió, i per tant la turgència, disminueix, les cèl·lules oclusives agafen una forma allargada i el porus es tanca. Els canvis en la pressió de turgència de la cèl·lula són el resultat de les fluctuacions en el seu potencial hídric. Les cèl·lules oclusives madures no tenen plasmodesmes, així que el flux de soluts es produeix únicament a través de canals i transportadors iònics presents a la membrana plasmàtica i el tonoplast (Figura I.3), l'activitat dels quals està regulada tant per senyals ambientals com per estímuls endògens, entre ells l'ABA (Pandey i col., 2007; MacRobbie, 2006) (Figura I.3).

L'obertura estomàtica es produeix a causa de la reducció del potencial hídric de les cèl·lules oclusives, que s'inicia amb el bombeig actiu de H⁺ a l'espai extracel·lular a través de les ATP hidrolases protòniques (H⁺-ATPases) de la membrana plasmàtica. El gradient electroquímic que es genera hiperpolaritza la membrana i es produeix el flux d'altres ions i soluts. D'aquesta manera s'activen els canals d'entrada de K⁺ (K⁺_{in}) regulats per voltatge, deixant pas al catió cap a l'interior cel·lular (Shimazaki i col., 1986). A més entren anions Cl⁻ i NO₃⁻ d'una manera activa (Figura I.3) (Guo i col., 2003; Van Kirk i Raschke, 1978), i aquests fluxos permeten, alhora, l'aport de sucres, fet que contribueix a la caiguda del potencial hídric de les cèl·lules oclusives i l'entrada d'aigua (Pandey i col., 2007). L'ABA, acompanyat d'un increment de la concentració intracel·lular de Ca²⁺, del pH citosòlic i la producció de ROS i NO (Figura I.3),

bloqueja l'obertura estomàtica induïda per la llum. S'inhibeixen les H^+ ATPases i s'activen els canals aniónics que intervenen la sortida de Cl^- , NO_3^- i malat²⁻ de les cèl·lules oclusives (Figura I.3). La membrana plasmàtica es despolaritza, provocant l'activació dels canals de sortida del K^+ (K^+_{out}) i la consegüent sortida dels cations (Pandey i col., 2007; Kwak i col., 2003). Els canals aniónics es classifiquen en dos grups segons la seva electrofisiologia: els 'S-type' ('slow-type') i els 'R-type' ('rapid-type'). Els primers, amb unes cinètiques lentes d'activació i desactivació i una capacitat de respondre a un ampli rang de voltatges, són els que participen en major mesura en la despolarització de la membrana plasmàtica que condueix al tancament estomàtic (Schroeder i col., 2001).

El Ca^{2+} entra a la cèl·lula a través dels canals permeables a aquest catió localitzats a la membrana plasmàtica o bé s'allibera des de la vacuola a través dels canals situats en el tonoplast. L'augment de la concentració citoplasmàtica de calci (Figura I.3) i de la producció de ROS induïts per l'ABA són els responsables de la inhibició de les H^+ -ATPases (Kwak i col., 2003; Murata i col., 2001; Kinoshita i Shimazaki, 1999). L'augment de la concentració intracel·lular de Ca^{2+} bloqueja els canals iònics K^+_{in} , mentre que els canals K^+_{out} són insensibles al Ca^{2+} . L'acidificació de l'apoplast estimula les corrents d'entrada de K^+ , mentre que la regulació dels corrents de sortida d'aquest catió pel pH no és homogènia i varia, possiblement, segons el sistema emprat per al seu estudi. Les ROS i el NO estimulen d'una banda l'alliberament de Ca^{2+} des de la vacuola i, de l'altra, inhibeixen l'activitat dels canals iònics K^+_{in} . Addicionalment, una concentració elevada de NO bloqueja els canals K^+_{out} independentment dels canvis de la concentració de Ca^{2+} citoplasmàtic i el pH del citosol (Pandey i col., 2007).

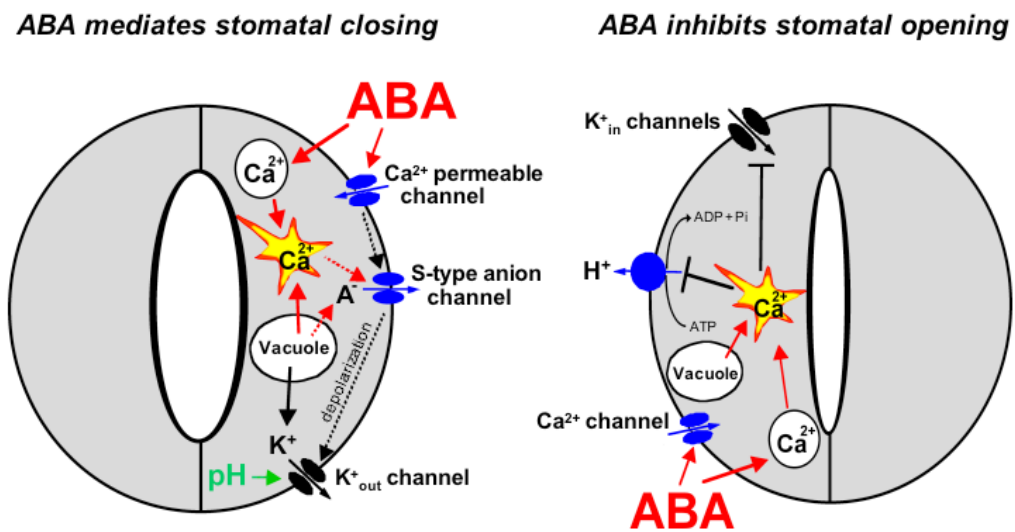


Figura I.3. Model del moviment dels ions en resposta a ABA en les cèl·lules guarda dels estomes. La imatge de l'esquerra mostra els canals iònics i els reguladors mitjans per ABA que indueixen el tancament estomàtic. La imatge de la dreta mostra l'efecte de l'augment dels nivells cel·lulars de Ca^{2+} induïts per ABA en la inhibició de l'obertura (Schroeder i col., 2001).

1.1.4.2 Manteniment de l'equilibri osmòtic: acumulació d'osmolits

L'acumulació d'osmolits permet contrarestar els efectes de la pèrdua d'aigua, ja que afavoreixen el manteniment de la turgència i estableixen les estructures cel·lulars. De manera similar al que passa en el cas d'estrès per fred (apartat 1.1.3), diversos gens involucrats en el metabolisme dels osmolits s'han relacionat amb la tolerància a estrès hídric. Entre aquests osmolits es troben sucres, sucres-alcohol, aminoàcids i amines (Seki i col., 2007).

La rafinosa i els sucres relacionats, així com el galactinol, realitzen una funció osmoprotectora en situacions de dèficit hídric en llavors i en plantes adultes. En *Arabidopsis*, la sobreexpressió de l'enzim galactinolsintasa (*AtGoIS2*) millora la tolerància a la sequera a causa d'una major acumulació de galactinol i rafinosa (Taji i col., 2002). La trehalosa també s'acumula en resposta a estrès osmòtic i ABA, i la sobreexpressió dels gens implicats en la seva biosíntesi millora la tolerància al dèficit hídric (Avonce i col., 2004; Garg i col., 2002). El paper dels fructans és possiblement protegir les membranes dels efectes de la deshidratació (Pilon-Smits i col., 1999), mentre que el dels sucres com el manitol, podria ser detoxificar les cèl·lules de les

espècies reactives d'oxigen (ROS) i estabilitzar les seves estructures moleculars (Abebe i col., 2003; Sheveleva i col., 1997).

El principal aminoàcid implicat en la promoció de la tolerància al dèficit hídric és la prolina (Pro), que participa en l'ajust osmòtic, l'estabilització d'estructures subcel·lulars i la detoxificació de ROS. En *Arabidopsis*, la sobreexpressió del gen de l'enzim Δ -pirrolina-5-carboxilat sintasa (*P5CS*) o la supressió del gen de la prolina deshidrogenasa (*ProDH*) incrementen la tolerància a l'estrès hídric. Per contra la supressió de *P5CS* comporta una deficiència de Pro que incrementa la sensibilitat de les plantes a la sequera (Nanjo i col., 2003; Nanjo i col., 1999).

La glicina-betaïna i les poliamines són les amines amb més rellevància en la promoció de la tolerància a sequera. En *Arabidopsis*, la coexpressió de les dues N-metiltransferases responsables de la biosíntesi de glicina-betaïna en el cianobacteri *Halotolerante synechococcus*, promou l'acumulació de l'amina i millora la tolerància a sequera, possiblement a causa de la seva funció en l'estabilització de l'estructura i l'activitat de macromolècules (Waditee i col., 2005).

El metabolisme de PAs en plantes i la seva implicació en les respostes a estrès abiòtic, com ja s'ha indicat, es tractarà en les properes seccions.

1.2 Poliamines en vegetals

Les poliamines (PAs) són compostos nitrogenats de baix pes molecular que es troben en tots els organismes vius (Tabor i Tabor, 1984). Tenen naturalesa policatiònica a causa del seu contingut en nitrogen, ja que aquest es troba formant grups amino primaris i secundaris. Per conveniència s'anomenen poliamines a un grup de diamines alifàtiques com el diaminopropa (DAP), la putrescina (Put) i la cadaverina (CAD); essent la triamina espermidina (Spd) i les tetramines espermina (Spm) i termoespermina (tSpm), poliamines en el seu estricte sentit químic, també conegudes com poliamines "superiors" (Figura I.4). La presència de grups amino fa que aquests compostos es trobin protonats a pH fisiològic, el que els permet unir-se a macromolècules carregades negativament, com el DNA (Pohjanpelto i Holttta, 1996), proteïnes i fosfolípids (Tassoni i col., 1996; Schuber, 1989; Apelbaum i col., 1988).

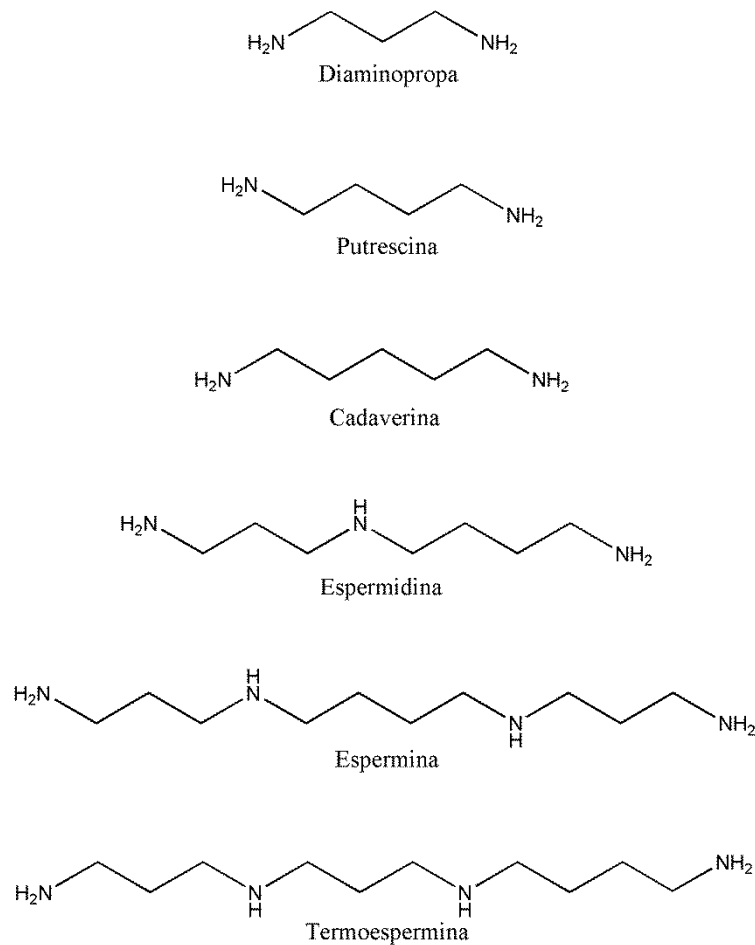


Figura I.4. Amines alifàtiques més comunment trobades en els sistemes biològics. El DAP és un producte de l'oxidació de poliamines. La Put (1,4-diaminobuta) i la CAD (1,5-diaminohepta) són productes de la descarboxilació d'aminoàcids bàsics, la primera d'ornitina i arginina i la segona de lisina. La Spd (N-3-aminopropil-1,4-diaminobuta) és producte de l'addició d'un grup aminopropil a la Put. La Spm (bis(N-3-aminopropil)-1,4-diaminobuta) i la tSpm (1-(N-3-aminopropil)-3-(N-4-aminobuta-1,3-diaminopropa) es formen per adició d'un grup aminopropil a la Spd.

Les PAs poden trobar-se en la naturalesa com a bases lliures, unides covalentment a macromolècules (principalment proteïnes), o conjugades a compostos de baix pes molecular, formant derivats acetilats en animals o cinamoil derivats en vegetals. Entre aquests últims, els més comuns són les amides d'àcids hidroxicinàmics (Flores, 1991).

La unió de PAs a proteïnes està mediada per transglutaminases (EC 2.3.2.13), una família d'enzims que catalitzen la unió covalent de substrats amb grups amino primaris, com són les PAs, a grups γ -carboxiamido de residus glutàmics de les proteïnes (Lorand i Conrad, 1984; Folk, 1980). Les PAs poden unir-se a un o dos residus glutàmics,

formant mono- o bis- γ -glutamil-PAs, que poden formar ponts intermoleculars de diferent longitud i donar lloc a complexos de major pes molecular. Les possibles funcions de les transglutaminases fan referència a la modificació estructural de proteïnes específiques. En vegetals, s'ha detectat activitat transglutaminasa en fulles, especialment localitzada en cloroplasts (Dondini i col., 2000; Del Duca i col., 1994; Falcone i col., 1993; Signorini i col., 1991; Margosiak i col., 1990), on s'ha vist que estableixen els complexos fotosintètics i la rubisco (Dondini i col., 2003). El fet que la llum estimuli la unió de PAs a proteïnes cloroplàstiques, suggereix que podrien estar implicades en processos fotosintètics (Dondini i col., 2000). També hi ha estudis que suggereixen un paper en la construcció i organització de la paret cel·lular (Della Mea i col., 2007). Altres estudis les relacionen amb la mort cel·lular per resposta hipersensible durant l'estrès abiòtic (Del Duca i col., 2007). Les transglutaminases vegetals tenen moltes característiques compartides amb les animals, que tot i tenir unes seqüències aminoacídiques força diferents, són molt semblants en el seu centre actiu. Encara que aquests enzims estan presents en poca quantitat, la seva presència en nombrosos compartiments cel·lulars suggereix una important rellevància com agents de transaminació (Serafini-Fracassini i Del Duca, 2008). Fins al moment, en vegetals s'han caracteritzat els gens que codifiquen transglutaminases en *Arabidopsis* (Della Mea i col., 2004), blat de moro (Villalobos i col., 2004) i pera (Del Duca i col., 2013).

Com s'ha indicat, en plantes, les PAs poden conjugarse també amb àcids hidroxicinàmics (cumàric, cafeic, ferúlic) (Martin-Tanguy, 2001; Martin-Tanguy, 1997). Aquestes formes conjugades regulen els nivells intracel·lulars de PAs lliures (Bagni i Pistocchi, 1990), i permeten la interacció de les PAs amb altres components cel·lulars, ja que els àcids hidroxicinàmics s'uneixen mitjançant enllaços ester a diferents polímers de la paret cel·lular, especialment hemicel·luloses i lignines (Lam i col., 1992; Markwalder i Neukom, 1976). Les proporcions relatives de PAs lliures i conjugades varien segons les espècies, essent aquestes últimes especialment abundants en Solanàcies (Smith i col., 1983). Per exemple, en tabac, les PAs conjugades a àcids cinàmics representen aproximadament el 90% de les PAs totals (Panicot i col., 2002; Masgrau i col., 1997; Torrigiani i col., 1987). En aquesta planta, s'han purificat i caracteritzat enzims implicats en la conjugació de PAs, com la putrescina hidroxicinamoil transferasa (EC 2.3.1.138) (Negrel, 1989), que utilitza com a substrats

Put, Cad, agmatina (Agm) i Spm, i les conjuga a cafeoil-, feruloil- i cinamoil-CoA, o el factor de transcripció NtMYBJS1, que és un regulador de la biosíntesis de conjugats de fenilpropanoids, dependent de metil jasmonat (Galis i col., 2006). També s'han detectat un gran nombre d'aciltransferases responsables de la formació d'amides amb àcids hidroxicinàmics en altres espècies vegetals, com l'antranilat N-hidroxicinamoil/benzoil transferasa en cultius cel·lulars de clavell (Yang i col., 1997), l'agmatina N-hidroxicinamoil transferasa d'ordi (Burhenne i col., 2003), la tiramina N-hidroxicinamoil transferasa de patata (Schmidt i col., 1999), i la spermina N-hidroxicinamoil transferasa o la espermidina N-hidroxicinamoil transferasa d'*Aphelandra tetragona* (Hedberg i col., 1996). Pel que fa a *Arabidopsis thaliana*, s'han caracteritzat diversos enzims implicats en la conjugació de PAs a àcids hidroxicinàmics, com una BAHD acil transferasa involucrada en la síntesis d'hidroxicinamoil conjugats de Spd en el tapetum de les anteres (Grienenberger i col., 2009), o una aciltransferasa responsable de l'acumulació de conjugats de Spd en les llavors (Luo i col., 2009).

Pel que fa a la funció general de les PAs en plantes, s'ha descrit que estan implicades en diferents processos del desenvolupament, tals com la divisió i diferenciació cel·lular, morfogènesi i senescència (Galston i Kaur-Sawhney, 1995; Evans i Malmberg, 1989; Tiburcio i col., 1986), així com en la resposta a diferents tipus d'estrès, tant biòtic com abiòtic (Alcazar i col., 2011; Alcazar i col., 2010; Kakkar i Sawhney, 2002; Bouchereau i col., 1999; Galston i Sawhney, 1990; Evans i Malmberg, 1989; Flores i Galston, 1984). No obstant això, els mecanismes moleculars mitjançant els quals les PAs participen en aquests processos fisiològics no estan ben definits, i tampoc s'ha establert de forma clara la funció específica de les diferents poliamines. Una part important del treball presentat en aquesta Memòria s'ha dirigit a intentar aclarir aquests aspectes.

1.2.1 Biosíntesis de les PAs

En la majoria dels organismes vius, la biosíntesi de PAs s'inicia amb la formació de Put a partir d'ornitina o arginina. Aquests dos precursors són interconvertibles (Figura I.5). En animals i en la majoria de fongs, la Put es forma per descarboxilació d'ornitina, en una reacció catalitzada per l'enzim ornitina descarboxilasa (ODC, EC 4.1.1.17). En plantes i bacteris hi ha una ruta addicional de biosíntesi de Put a partir

d'arginina, que és descarboxilada per acció de l'enzim arginina descarboxilasa (ADC, EC. 4.1.1.19) per formar agmatina, que en dos passos més de reacció, catalitzats per els enzims agmatina iminohidrolasa (AIH, EC 3.5.3.12,) i N-carbamoilputrescina amidohidrolasa (CPA, EC 3.5.1.53), dóna lloc a Put. Encara que la ruta ODC s'ha considerat com la via comuna per a la biosíntesi PAs en tots els organismes vius, la seqüenciació del genoma d'*Arabidopsis* ha posat de relleu l'absència del gen *ODC* en aquesta planta, en la que tampoc s'ha detectat activitat ODC específica (Hanfrey i col., 2001). És per això, que en *Arabidopsis* l'única ruta funcional per a la síntesi de Put és la via ADC. En les reaccions catalitzades per AIH i CPA es produeixen metabòlits intermediaris que, de moment, només s'ha descrit que portin cap a la biosíntesis de Put. Per tant, en *Arabidopsis*, les activitats enzimàtiques ADC, AIH i CPA, així com la disponibilitat del substrat Arg, podrien actuar limitant la biosíntesis d'aquesta poliamina (Figura I.5). La Arg, no només és precursora de PAs, sinó també de nombrosos alcaloides (Facchini, 2001) i d'òxid nítric, una important molècula senyal en la resposta a estrès biòtic (Zeidler i col., 2004). A més, pot representar fins a un 40 % del nitrogen en proteïnes de reserva de llavors (VanEtten i col., 1963).

La Spd es forma a partir de Put per addició d'un grup aminopropil a un dels grups amino. Aquesta reacció està catalitzada per l'enzim espermidina sintasa (SPDS, EC. 2.5.1.16), essent el donador del grup aminopropil la S-adenosilmetionina descarboxilada (SAMdc), que es forma a partir de la S-adenosilmetionina (SAM) en una reacció catalitzada per S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC, EC 4.1.1.50). Les tetraamines alifàtiques es sintetitzen mitjançant l'addició a l'espermidina d'un altre grup aminopropil que prové de SAMdc; segons si l'addició es produeix en un extrem o en un altre de l'espermidina, es formaran dos tetraamines diferents: la tetraamina simètrica espermina, la generació de la qual és catalitzada per l'espermina sintasa (SPMS, EC.2.5.1.22), o el seu isòmer asimètric, la termoespermina, reacció catalitzada per la termoespermina sintasa (tSMPS) (Figura I.5). Un tret característic dels vegetals és que la SAM, a més de participar en nombroses reaccions de transmetilació, com fa en altres organismes, actua també com precursora d'etilè via àcid 1-aminociclopropano-1-carboxílic (ACC). A més, en algunes espècies vegetals, el grup metil de la SAM pot ser transferit a Put per formar N-metilputrescina, que és el precursor de la nicotina i altres alcaloides relacionats (Tiburcio i col., 1997).

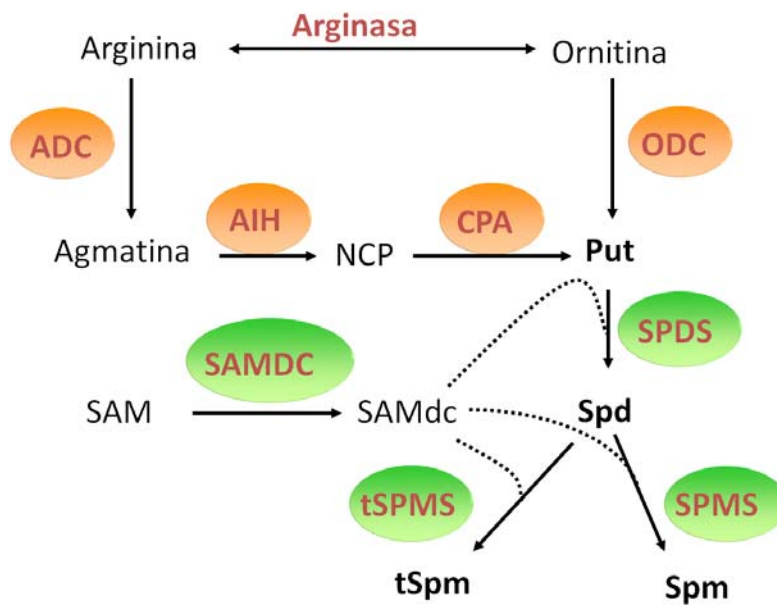


Figura I.5. Representació esquemàtica de la ruta biosintètica de les poliamines en plantes. ADC, arginina descarboxilasa; AIH, agmatina iminohidrolasa; CPA, N-carbamoilputrescina amidohidrolasa; dcSAM, S-adenosilmetionina descarboxilada; ODC, ornitina descarboxilasa; SAM, S-adenosilmetionina; SAMdc, SAM descarboxilasa; SPDS, espermidina sintasa; SPMS, espermina sintasa; tSPMS, termoespermina sintasa.

En *Arabidopsis*, s'han caracteritzat els gens que codifiquen tots els enzims implicats en la biosíntesi de poliamines, i s'ha vist que en molts casos hi ha duplicitat gènica. Així doncs, *Arabidopsis* té dues isoformes per ADC (*ADC1* i *ADC2*), un gen que codifica una proteïna amb activitat AIH (*AIH*) (Janowitz i col., 2003) i un altre (*NLP1*) que codifica la proteïna CPA (Piotrowski i col., 2003). Pel que fa a la biosíntesi de les PAs de més pes molecular, el genoma d'*Arabidopsis* conté almenys quatre isoformes que codifiquen SAMDC (*SAMDC1*, *SAMDC2*, *SAMDCA* i *SAMDCB*) (Hanfrey i col., 2002), dos que codifiquen per SPDS (*SPD1* i *SPDS2*) (Hashimoto i col., 1998), una per a la SPMS (*SPM1*) (Panicot i col., 2002) i un altra per a la tSPMS (*ACL5*) (Knott i col., 2007).

1.2.2 Implicació de les PAs en la resposta de les plantes a estrès

Les PAs s'han relacionat amb les rutes de senyalització de les plantes en resposta a l'atac per patògens (Martin-Tanguy, 1997), i amb la simbiosi de plantes amb microorganismes d'interès en nutrició vegetal (El Ghachtouli i col., 1996). No obstant

això, les alteracions més importants en el metabolisme del nitrogen i de PAs es produeixen quan les plantes estan sotmeses a estrès abiòtic com dèficit de nutrients, estrès osmòtic o contaminants atmosfèrics (Groppa i Benavides, 2008; Alcázar i col., 2006b; Bouchereau i col., 1999). Les dades obtingudes mitjançant estudis correlacionals indiquen que, en general, en plantes exposades a diferents tipus d'estrès abiòtic es produeix un ràpid augment en els nivells de PAs a través de la ruta ADC (revisat per Bouchereau i col. (1999). Així doncs, s'ha vist que en plantes d'arròs sotmeses a estrès per sequera, augmenta l'activitat ADC SAMDC i SPDS alhora que també augmenten els nivells de Put, Spd i Spm (Yang i col., 2007). No obstant això, en cultivars d'arròs tolerants a estrès salí, que presenten nivells basals de PAs superiors als cultivars sensibles, en sotmetre'ls a estrès s'observa una acumulació de Spd i Spm, per contra una disminució en els nivells de Put (Chattopadhyay i col., 1997). Resultats similars s'han obtingut amb conreus d'alfals tolerants a sequera (Kuehn GD, 1990). Aquests estudis correlacionals suggereixen un paper protector de les PAs en la resposta a estrès, encara que no demostren una relació exacta causa-efecte, i no permeten definir el paper específic de les PAs en les respostes de les plantes a estrès.

En cèl·lules animals, l'augment de PAs produït durant els processos d'estrès s'atribueix a la capacitat dual que tenen aquests compostos d'unir-se tant a anions com a cations. La unió de les PAs a anions (fosfolípids de membrana i àcids nucleics) protegiria a aquestes macromolècules davant possibles oxidacions, mentre que la unió de les PAs als cations (Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} i Cu^{2+}) evitaria la formació de radicals lliures (Løvaas, 1996). En plantes, els resultats obtinguts mitjançant aproximacions experimentals clàssiques (estudis correlacionals, aplicació exògena de PAs i inhibidors biosintètics) posen de manifest que les PAs exerceixen alguna funció en l'adaptació de les plantes a les condicions ambientals adverses (revisat per Bouchereau i col. (1999). Estudis més recents, utilitzant plantes transgèniques sobreexpresores o mutants amb pèrdua de funció per als gens involucrats en la síntesis de poliamines, donen suport a aquesta observació (Gill i Tuteja, 2010; Kusano i col., 2008; Alcázar i col., 2006a). No obstant això, la naturalesa del mecanisme i el significat fisiològic de l'augment de PAs induït per estrès abiòtic no estan clars. Les noves tecnologies de biologia molecular i genètica de plantes han permès abordar aquestes qüestions mitjançant l'estudi global del

metabolisme de PAs en resposta a estrès abiòtic. En les següents seccions es descriuen alguns dels resultats obtinguts amb aquestes metodologies.

1.2.2.1 Perfil transcripcional dels gens de la síntesis de PAs en resposta a estrès

La seqüenciació del genoma d'*Arabidopsis* ha permès identificar la totalitat de gens implicats en la biosíntesi de PAs observant-se, tal com s'ha indicat en l'apartat 1.2.1, que en la majoria dels casos hi ha duplicitat gènica. Aquesta redundància gènica podria estar relacionada amb una especificitat en la resposta davant diferents estímuls (Taula I.1).

Taula I.1. Gens de la biosíntesi de PAs induïts per diferents tipus d'estrès o diferents hormones en *Arabidopsis*. ABA: àcid abscísic; CK: citoquinines, IAA: àcid indolacètic; JA: àcid jasmònic. n.a.: no analitzat.

Gen	4°C	NaCl	Deshidratació	Biòtic	Hormones
<i>ADC1</i>	+++	++	-	-	
<i>ADC2</i>	+	+++	+++	+++	ABA, JA
<i>AIH</i>	-	n.a.	-	n.a.	
<i>CPA</i>	-	n.a.	-	n.a.	
<i>SPDS1</i>	-	-	++	-	
<i>SPDS2</i>	-	-	-	-	CK
<i>SPMS</i>	++	+++	+++	+++	ABA
<i>ACL5</i>	-	-	-	-	IAA
<i>SAMDC1</i>	-	+	-	-	
<i>SAMDC2</i>	+++	-	-	-	ABA

Les dades existents en l'actualitat indiquen que, en relació amb els gens implicats en la síntesi de Put, l'expressió d'*ADC1* s'indueix en resposta a fred i estrès salí (Cuevas i col., 2008; Urano i col., 2004; Urano i col., 2003), mentre que *ADC2* augmenta la seva expressió davant nombrosos tipus d'estrès abiòtic, incloent deshidratació, salinitat elevada, deficiència de K⁺ i, en menor grau, fred (Cuevas i col., 2008; Alcázar i col., 2006b; Armengaud i col., 2004; Urano i col., 2003; Perez-Amador i col., 2002) (Figura

I.6). Resultats obtinguts en el nostre laboratori indiquen que l'expressió de *CPA* i *AIH* s'incrementa lleugerament en resposta a fred i deshidratació. En relació amb els gens implicats en la biosíntesi de Spd i Spm, *SPDS1* s'indueix per deshidratació (Alcázar i col., 2006b) (Figura I.6), mentre que *SPDS2* no varia la seva expressió en cap tipus d'estrès assajat. El patró d'expressió de *SPMS* és similar al d'*ADC2*, incrementant de forma molt marcada en resposta a deshidratació, mentre que *ACL5* no participa en les respostes a estrès (Alcázar i col., 2006b; Urano i col., 2003). L'expressió de *SAMDC1* s'indueix en condicions de salinitat, mentre que *SAMDC2* ho fa en resposta a fred (Urano i col., 2003) (Figura I.6).

L'expressió d'*ADC2*, *SPMS* i *SAMDC2* s'indueix per l'aplicació exògena d'ABA (Taula I.1), de manera que la resposta a estrès d'aquests gens podria donar-se a través de rutes de senyalització dependents d'ABA (Urano i col., 2003). En mutants deficient en ABA (*aba2*) i insensibles a l'hormona (*abi1*) l'expressió d'*ADC2*, *SPDS1* i *SPMS* no s'incrementa en resposta a deshidratació, el que indicaria que la inducció d'aquests gens per deshidratació està regulada per ABA (Alcázar i col., 2006a). Totes aquestes dades indiquen que l'expressió de la majoria dels gens implicats en la biosíntesi de PAs està regulada per diferents tipus d'estrès abiòtic. A més, aquests gens presenten en els seus promotors diferents elements *cis* de resposta a estrès abiòtic i/o ABA (Ferrando i col., 2004).

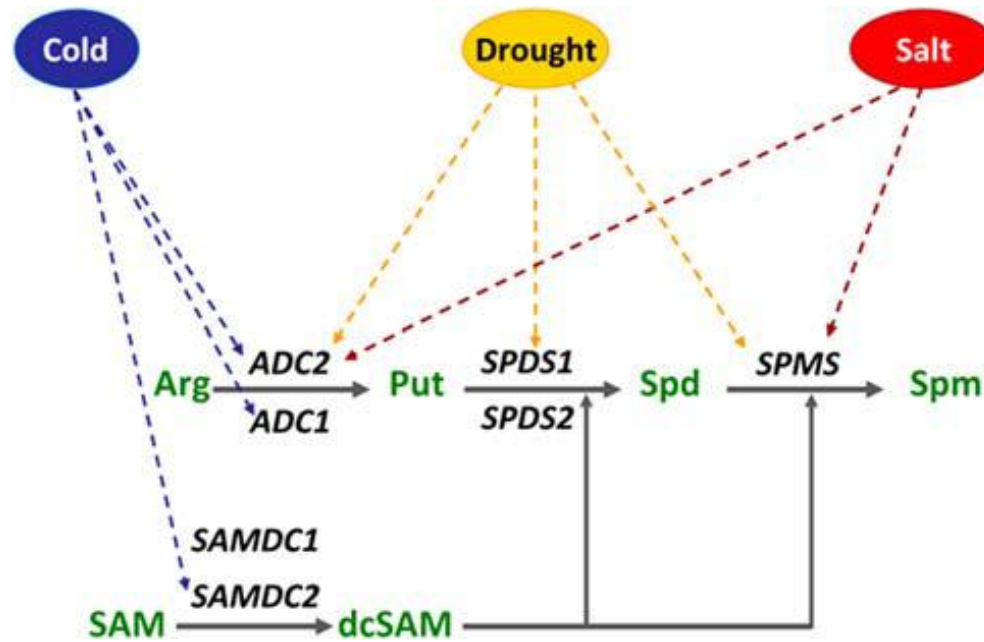


Figura I.6. Efectes de l'estrès per sequera, salinitat i fred en la biosíntesi de poliamines en Arabidopsis. La sequera induïx l'expressió dels gens *ADC2*, *SPDS1* i *SPMS*. Els nivells de Put augmenten, mentre que no ho fan els de Spd i Spm (Alcázar i col., 2006b). El tractament amb sal induïx l'expressió dels gens *ADC2* i *SPMS* amb el resultant augment de Put i Spm (Urano i col., 2003). El fred induïx l'expressió dels gens *ADC1*, *ADC2* i *SAMDC2*. Els nivells de Put augmenten amb el fred i són correlatius amb la inducció dels gens *ADC*. Els continguts de Spd i Spm romanen constants o disminueixen amb la resposta a temperatures baixes (Alcazar i col., 2010).

1.2.2.2 Efectes de la modificació dels nivells de poliamines en resposta a l'estrès

La participació de les PAs en les respostes a estrès de les plantes s'ha estudiat clàssicament modificant els seus nivells mitjançant aplicació exògena de PAs o d'inhibidors químics dels seus enzims biosintètics. No obstant això aquestes aproximacions tenen algunes limitacions, derivades principalment de la diferent capacitat d'absorció de la cèl·lula de substàncies químiques aplicades de forma exògena. A més, en el cas de les PAs, hi ha enzims de degradació que es localitzen en el apoplast, de manera que part dels compostos que arriben a l'interior de la cèl·lula poden ser els productes d'oxidació resultants d'aquest procés. Pel que fa als inhibidors, alguns no són específics i altres són interconvertibles metabòlicament. Una alternativa és l'ús de

plantes modificades genèticament amb nivells alterats de PAs, bé siguin mutants amb pèrdua de funció per als gens que codifiquen enzims implicats en el metabolisme d'aquests compostos, o plantes que sobreexpressen aquests gens. Els estudis de genòmica descrits en l'apartat anterior han permès identificar alguns gens de la biosíntesi de PAs com a candidats a modificar la resposta de les plantes a estrès abiòtic.

1.2.2.2.1 Mutants amb pèrdua de funció per a gens de la biosíntesi de PAs

Els resultats obtinguts en mutants amb pèrdua de funció donen suport a la idea de que les PAs tenen una funció protectora en situacions d'estres. Watson i col (1998) van aïllar mutants EMS d'*A. thaliana* amb activitat ADC reduïda. Aquests mutants es troben en dos grups de complementació, *spe1* i *spe2*, i en els al·lels més afectats de cada grup, *spe1-1* i *spe2-1*, l'activitat ADC es redueix en un 23 i 36%, respectivament. El doble mutant *spe1-1 spe2-1* té menor activitat que qualsevol dels mutants aïllats, però encara manté un 20% de l'activitat detectada en el tipus silvestre. Aquests mutants, que s'ha comprovat que mapegen el gen *ADC2*, no acumulen poliamines després de un període d'aclimatació a altes concentracions de sal i són més sensibles a estrès salí que els corresponents controls (Kasinathan i Wingler, 2004). El mutant *en9* es va obtenir mitjançant recerca d'insercions per *ADC2* en una població d'*Arabidopsis* mutagenitzada amb el transposó autònom En-1 de blat de moro, que provoca la disrupció del gen on es localitza, generant un mutant amb pèrdua de funció. Aquest mutant no presenta cap fenotip característic en condicions normals, però la inducció de l'expressió d'*ADC2* provocada per estrès osmòtic està inhibida (Soyka i Heyer, 1999). De manera similar, Urano i col (2004) van aïllar un altre mutant d'*ADC2* (*adc2-1*) a partir d'una població d'*Arabidopsis* mutagenitzada amb el transposó Ac/Ds, que té un contingut de Put disminuït un 75% en relació amb el control, i tampoc presenta alteracions fenotípiques en condicions normals, però és hipersensible a salinitat, i els danys causats per aquest estrès són revertits parcialment per addició de Put (Urano i col., 2004).

En el nostre grup de recerca, a partir de col·leccions de mutants obtingudes per inserció de T-DNA, s'han caracteritzat mutants d'*ADC1* (*adc1-2* i *adc1-3*) i *ADC2*: (*adc2-3* i *adc2-4*) (Cuevas i col., 2008). Aquests mutants presenten nivells de Put inferiors als controls de tipus silvestre i, com passa en els mutants *adc2* descrits anteriorment, no presenten alteracions fenotípiques en condicions normals, però són

hipersensibles a estrès per congelació i aquest fenotip es reverteix parcialment per l'addició exògena de Put. També s'ha observat que la pèrdua de funció *ADC1* i *ADC2* afecta l'expressió de factors de transcripció implicats en la ruta de senyalització a fred intervinguda per ABA (Cuevas i col., 2008).

El doble mutant *acl5/spm*, que no produeix Spm, és hipersensible a sal i sequera, i el fenotip es mitiga per l'aplicació exògena de Spm (Kusano i col., 2007).

No obstant això, els estudis funcionals mitjançant l'ús de mutants són limitats a causa dels efectes letals que s'originen en provocar fortes disminucions en els nivells de PAs mitjançant el bloqueig complet de la biosíntesi de Put o Spd. El doble mutant *adc1-adc2* és inviable, ja que és embrió letal (Urano i col., 2004), el mateix passa amb el doble mutant *spds1-spds2* (Imai i col., 2004).

1.2.2.2 Sobreexpressió de gens implicats en la biosíntesi de les PAs

Com s'ha indicat prèviament, els estudis amb plantes transgèniques per als gens implicats en la biosíntesi de PAs suporten la idea que aquests compostos estan implicats en la resposta a estrès. D'acord amb això, s'ha demostrat que la sobreexpressió de gens heteròlegs *ODC*, *ADC*, *SAMDC* i *SPDS*, de diferents orígens animals o vegetals, augmenten la tolerància a un ampli espectre d'estressos en diverses espècies vegetals (veure Taula I.2 i les seves referències). Un augment en la tolerància sempre es correspon amb nivells elevats de Put i/o Spd i Spm. Així, la sobreexpressió constitutiva de *SAMDC* humana en tabac, dona lloc a un increment dels nivells de Put i Spd, que es tradueix en una major tolerància a estrès salí i osmòtic (Waie i Rajam, 2003). Resultats similars s'han obtingut en plantes de tabac que sobreexpressen el cDNA que codifica ACC sintasa o ACC oxidasa de clavell en antisentit (Wi i Park, 2002). Aquestes plantes, que presenten un increment de l'activitat *SAMDC* i dels nivells de Put i Spd, són més tolerants a estrès oxidatiu (H_2O_2), salinitat elevada i pH àcid. D'altra banda, plantes d'arròs que sobreexpressen *SAMDC* de *Tritoderum* sota el control d'un promotor induïble per ABA presenten nivells elevats de Spd i Spm i són més tolerants a estrès salí (Roy i Wu, 2002). Capell i col (2004) han obtingut plantes d'arròs que sobreexpressen el gen *ADC* de *Datura stramonium* sota el control d'un promotor que respon a estrès (*Ubi-1* de blat de moro). Aquestes plantes són més tolerants a estrès osmòtic i, en condicions normals, presenten elevats nivells de Put, però quan s'exposen a estrès incrementa

l'expressió de *SAMDC* i els nivells de Spd i Spm, això suggereix que l'efecte protector és degut a aquestes dues PAs. No obstant això, quedaria per determinar com actuen Spd i Spm per produir aquest efecte. La sobreexpressió de la *SPDS* de *Cucurbita ficifolia* en *Arabidopsis* provoca un augment significatiu en l'activitat *SPDS* i en els nivells de Spd. Aquestes plantes presenten una major tolerància a diferents tipus d'estrès, com fred, salinitat elevada, deshidratació, estrès osmòtic i oxidatiu (Kasukabe i col., 2004). En resposta a fred, l'activitat *ADC* i els nivells de Spd conjugada a les plantes transgèniques incrementen considerablement en relació al control tipus silvestre. A més, en aquestes condicions, incrementa també l'expressió d'alguns factors de transcripció (*DREB*) i altres proteïnes (*RD29A*) implicades en les rutes de senyalització a estrès abiòtic.

Taula I.2. Tolerància a estrès abiòtic de plantes transgèniques que acumulen poliamines.

Gen	Origen	Espècie	Sobreexpressió	Sobreproducció	Tolerància	Referència
<i>ADC</i>	Civada	Arròs	Induïble	Put	Sal	(Roy i Wu, 2001)
<i>ODC</i>	Ratolí	Tabac	Constitutiva	Put	Sal	(Kumria i Rajam, 2002)
<i>SAMDC</i>	Blat	Arròs	Induïble		Sal	(Roy i Wu, 2002)
<i>ACC</i>	Clavell	Tabac	Antisentit	Put i Spd	Ampli espectre	(Wi i Park, 2002)
<i>ACC</i>	Clavell	Tabac	Antisentit	Put i Spd	Ampli espectre	(Wi i Park, 2002)
<i>SAMDC</i>	Humana	Tabac	Constitutiva	Put i Spd	Sal i Osmòtic	(Waie i Rajam, 2003)
<i>ADC</i>	<i>Datura stramonium</i>	Arròs	Induïble	Spd i Spm	Sequera	(Capell i col., 2004)
<i>SPDS</i>	<i>Cucurbita Wcifolia</i>	Arabidopsis	Constitutiva	Spd	Ampli espectre	(Kasukabe i col., 2004)
<i>SAMDC</i>	Clavell	Tabac	Constitutiva	Put, Spd i Spm	Ampli espectre	(Wi i col., 2006)
<i>SAMDC1</i>	Arabidopsis	Arabidopsis	Constitutiva	Spm	Ampli espectre	(Alcázar i col., 2006b)
<i>SAMDC</i>	Llevat	Tomatera	Constitutiva	Spd i Spm	Calor	(Cheng i col., 2009)
<i>SPDS</i>	Pomera	Perera	Constitutiva	Spd	Ampli espectre	(Wen i col., 2009)

En general, els resultats obtinguts en els estudis realitzats amb mutants i plantes transgèniques amb alteracions en la biosíntesi de PAs confirmen el paper protector d'aquests compostos en la resposta de les plantes a estrès abiòtic, i suggereixen l'existència de diferents mecanismes d'acció depenent del tipus de poliamina. Sembla

que les PAs podrien participar, ja sigui directament o indirectament, en les rutes de senyalització a estrès, o bé actuar com a substàncies osmoprotectors. Tal i com es descriu en l'apartat 1.2.3.3, s'ha de considerar que la major tolerància a estrès de les plantes que acumulen Put, Spd o Spm, també podria ser deguda als productes de la seva degradació.

1.2.3 Degradació de PAs

Els nivells de PAs en les cèl·lules es regulen a través de la biosíntesi, el transport i el catabolisme (Tiburcio i col., 1997). Les PAs (incloent a les diamines), són desaminades per oxidació a través d'amino oxidases (AOS). Aquests enzims es troben en bacteris, fongs, plantes superiors i animals, i es classifiquen en: amino oxidases dependents de flavinnucleòtids (PAO, EC 1.5.3.6) o dependents de coure (CuAO, EC 1.4.3.6) (Cona i col., 2006; Bagni i Tassoni, 2001).

Un altre tipus de classificació agrupa les amino oxidases segons si actuen sobre amines primàries (diamino oxidases, DAO), o sobre grups amino secundaris (poliamino oxidases, PAO) (Sebela i col., 2001).

Les CuAOs i PAOs abunden a l'apoplast de lleguminoses i gramínies, respectivament, i durant molt de temps s'han considerat típiques d'aquestes dos famílies, deixant sense resoldre qüestions sobre el metabolismes de les PAs en altres plantes i/o compartiments cel·lulars.

1.2.3.1 Amino oxidases dependents de flavinnucleòtids (PAOs)

Les PAOs catalitzen la desaminació oxidativa de Spm, Spd i/o els seus derivats acetilats en els grup amino secundaris (Angelini i col., 2010; Cona i col., 2006). Els productes derivats d'aquesta reacció depenen dels substrats utilitzats i de la manera que té la proteïna d'oxidar-los. Així doncs, en mamífers, les PAOs, que es troben principalment localitzades en peroxisomes, transformen Spd i Spm en Put i Spd, respectivament, alliberant en els dos casos 3-aminopropanal i peròxid d'hidrogen (Schrader i Fahimi, 2004). Aquest tipus d'oxidació de PAs és anomenat retroconversió (Figura I.7). En les plantes, fins fa relativament poc, es considerava que les PAOs només catalitzaven el catabolisme terminal de les PAs oxidant els grups amino

secundaris de Spd i Spm per produir 4-aminobutanal i N-(3-aminopropil)-4-aminobutanal, respectivament, a més de DAP i H₂O₂ (Angelini i col., 2010; Cona i col., 2006). Aquest tipus d'oxidació de PAs és anomenat catabolisme terminal (Figura I.7). Però, més recentment, s'ha vist que en la planta model *Arabidopsis thaliana*, que es una espècie dicotiledònia, les PAOs descrites fins al moment, AtPAO1 (Tavladoraki i col., 2006), AtPAO2 (Fincato i col., 2011), AtPAO3 (Moschou i col., 2008), i AtPAO4 (Kamada-Nobusada i col., 2008), tal com les PAOs animals i les Spm oxidases, oxiden els grups amino secundaris de Spd i Spm, donant lloc a un procés de retroconversió (Fincato i col., 2011; Takahashi i col., 2010; Kamada-Nobusada i col., 2008; Moschou i col., 2008; Tavladoraki i col., 2006).

Les primeres PAO estudiades van resultar tenir una localització apoplàstica, com és el cas de les PAO de blat de moro (Cervelli i col., 2000; Federico i col., 1989), però més endavant s'han trobat PAOs amb altres localitzacions subcel·lulars com és el cas de les dos PAOs d'ordi caracteritzades fins al moment, la BPAO2 localitzada al simplast (Cervelli i col., 2001) i la BPAO1 localitzada a la vacuola (Cervelli i col., 2004), o les AtPAOs citades anteriorment, per les que s'ha descrit una localització peroxisomal en el cas d'AtPAO2, AtPAO3 i AtPAO4 (Kamada-Nobusada i col., 2008; Moschou i col., 2008); mentre que AtPAO1 (Tavladoraki i col., 2006) i AtPAO5 (Fincato i col., 2010) es prediu que són proteïnes citosòliques.

1.2.3.2 Amino oxidases dependents de coure (CuAOs)

Les CuAOs catalitzen la desaminació oxidativa dels grups amino primaris de les PAs, donant els corresponents aminoaldehids, amb la consegüent producció de H₂O₂ i NH₃, però, en comparació amb les PAOs, són incapaces de produir l'oxidació de les PAs per reacció amb grups amino secundaris i terciaris (Pietrangeli i col., 2007; Seiler, 2004). Les CuAOs són proteïnes homodimèriques, que consten de dos subunitats de entre 70-90 kD, cadascuna conté un ió de coure i un cofactor unit covalentment, la 2,4,5- tri-hidroxifenilalanina quinona (TPQ), generat per una modificació autocatalítica post-traducciona d'un residu de tirosina en el lloc actiu (Medda i col., 1995). Tot i que la identitat global de la seqüència primària de les CuAOs de diferents orígens no és generalment alta (<25%) (Pietrangeli i col., 2007), hi ha trenta-tres residus d'aminoàcids prop del lloc catalític que estan completament conservats en la majoria d'elles (Møller i

McPherson, 1998; Tipping i McPherson, 1995). Les CuAOs es troben en quantitat elevada en les dicotiledònies, i són la proteïna soluble més abundant detectada en els fluids extracel·lulars de diverses fabàcies (pèsol, cigrons, lleties i soja) (Federico i Angelini, 1991). Aquests enzims han sigut purificats en diferents espècies vegetals, com *Trifolium subterraneum* (Delhaize i Webb, 1987), ordi, *Euphorbia characias*, mongeta, tabac, arròs (Smith i Barker, 1988), i pèsol (Kumar i col., 1996). En lleguminoses, s'han localitzat en l'apoplast (Smith i Barker, 1988), mentre que en tubercles de patata i fulles d'ordi, s'ha trobat activitat CuAO en el simplast, compartimentalitzada en les mitocòndries (Scoccianti i col., 1991). El genoma d'*A. thaliana* conté deu gens anotats com que codifiquen putatives amino oxidases dependents de coure, però només un (*ATAOI*) s'ha caracteritzat a nivell de proteïna (Møller i McPherson, 1998). S'ha predit que *ATAO1* és una proteïna extracel·lular associada amb el desenvolupament del teixit vascular (Møller i McPherson, 1998), i se suggereix que està implicada en la mort cel·lular programada (PCD) i en la interacció planta-nematode (Møller i McPherson, 1998; Møller i col., 1998).

Tenint en compte aquestes dades, les preguntes a respondre són, com s'oxiden les PAs a l'apoplast d'*Arabidopsis*, i si hi ha AOs capaces de dur a terme l'oxidació terminal de PAs en el mateix compartiment cel·lular que les *AtPAOs* catalitzen la retroconversió en aquesta planta model. Una part del treball realitzat en aquesta Tesi Doctoral està dirigida a intentar respondre aquestes preguntes.

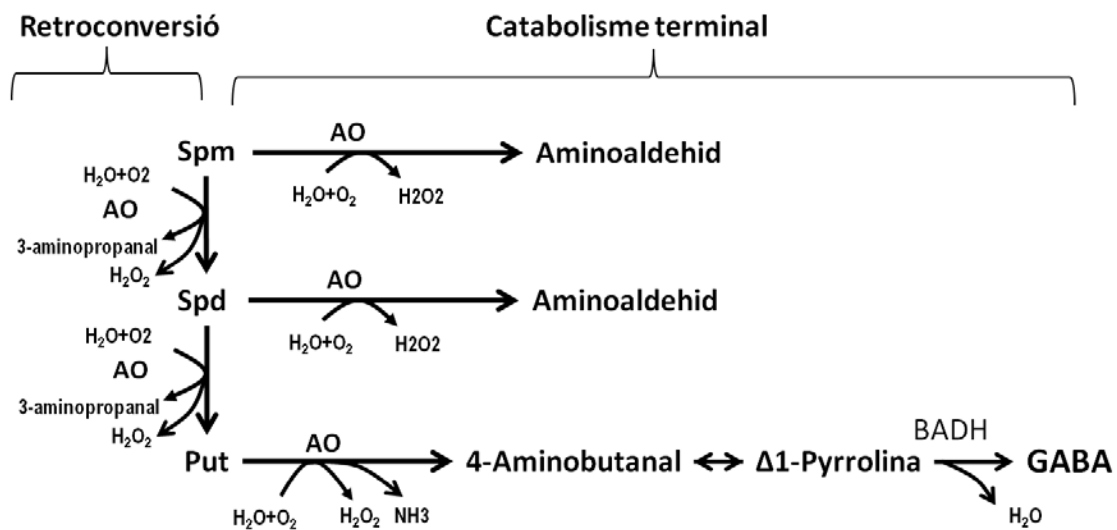


Figura I.7. Esquema general representatiu de les diferents vies de catabolisme de les poliamines en plantes. GABA (àcid γ -aminobutíric).

1.2.3.3 Funció de les amino oxidases

Lluny de ser només un mitjà de regulació dels nivells cel·lulars de PA, les AOs de les plantes tenen un paper en importants processos fisiològics, incloent el creixement vegetal i el desenvolupament, la resposta a estressos abiòtics com la sequera, la salinitat i la calor, i les respostes de defensa davant patògens (Angelini i col., 2010; Cona i col., 2006). Aquest efectes no són només mediat a través de la regulació dels nivells cel·lulars de les PAs, sinó que ho són també pels productes de reacció generats per les AO: aminoaldeids (com el 4-aminobutanal), DAP i, sobretot, H_2O_2 (Angelini i col., 2010; Cona i col., 2006; Rea i col., 2004; Walters, 2003; Bouchereau i col., 1999). El DAP pot convertir-se eventualment en β -alanina, mentre que, el 4-aminobutanal, format per oxidació de Put o Spd a través d'AOs, per acció d'una aminoaldehid deshidrogenasa, es converteix en àcid γ -aminobutíric (GABA) (Sebela i col., 2000) (Figura I.7), que és un metabòlit associat a diferents processos fisiològics (regulació del pH citosòlic, flux de C en el cicle de l'àcid cítric, protecció davant d'insectes, estrès oxidatiu i senyalització), i es produeix ràpidament i en gran quantitat en resposta a estrès, tan biòtic com abiòtic (Bouché i col., 2004). Així, en arrels de soja sotmeses a estrès salí s'ha vist que l'acumulació de GABA està correlacionada amb la degradació de PAs (Xing i col., 2007), de forma que a mesura que incrementa la concentració de sal disminueixen significativament els nivells de Put, Cad i Spd, a més d'incrementar

l'activitat CuAO i els nivells de GABA. En canvi, durant la recuperació de l'estrès salí, es produeix una disminució de l'activitat CuAO i dels nivells de GABA, i un increment dels nivells de PAs, cosa que suggereix que el GABA procedent de la degradació de PAs pot estar implicat en els mecanismes de defensa de les plantes en situacions d'estrès. Yang i col (2011) van veure que, en condicions normals, el 30% del GABA contingut en plantes de fava en germinació provenia de les CuAO, i que aquest contingut canviava proporcionalment als canvis d'activitat CuAO si es modificaven les condicions de creixement, com l'espectre de llum, el pH o el temps, i si s'hi aplicaven inhibidors de l'activitat CuAO.

D'altra banda, s'ha descrit que el H_2O_2 , l'únic compost comú a totes les reaccions catalitzades per AOs, és una molècula senyal que participa en la resposta de les plantes a diferents estímuls. El H_2O_2 està involucrat en la resistència sistèmica adquirida i actua sinèrgicament amb el NO en la inducció de la mort cel·lular en la resposta hipersensible (Delledonne i col., 1998). El H_2O_2 també actua com a cosubstrat de les reaccions dirigides per les peroxidases durant la maduració de la paret cel·lular i l'enduriment d'aquesta per estrès (Angelini i col., 2008), com a missatger secundari en l'obertura d'estomes (Pei i col., 2000) i en la mort cel·lular programada tan en mecanismes de defensa com de desenvolupament (Cona i col., 2006). Concretament, en fava, el H_2O_2 , produït per l'acció CuAO, s'ha relacionat amb el tancament dels estomes induït per ABA (An i col., 2008) i, més recentment, en Arabidopsis, s'ha descrit una possible relació entre CuAO, NO i ABA involucrada amb les respostes a estrès (Wimalasekera i col., 2011). També s'ha vist que la PAO de blat de moro contribueix a la defensa citosòlica antioxidant induïda per ABA a través de la producció de H_2O_2 a partir de Spd (Xue i col., 2009). La salinitat induïx la sortida de la Spd a l'apoplast, on és oxidada per les PAOs, produint H_2O_2 , que és el responsable de la tolerància a aquest estrès abiòtic (Tisi i col., 2011). L'Activitat CuAO i peroxidasa estan espacialment correlacionades i s'indueixen durant la cicatrització de ferides (Scalet i col., 1991; Angelini i col., 1990). En un treball de Rea i col., (1998), es va observar que, en cigrò, es produeix una ràpida acumulació de mRNA de CuAO en ferida, pel que es va relacionar amb el procés de reparació després d'una lesió. En aquest treball es va veure que el tractament amb aminoguanidina, un inhibidor específic de l'activitat CuAO, disminuïa la reparació de la ferida per lignificació-suberificació, el que indicava que les

CuAO podrien ser un factor limitant en la producció de H_2O_2 en la paret cel·lular i que la seva expressió estaria integrada en els mecanismes de reparació i remodelació de la paret cel·lular. L'activitat CuAO és més alta en cultivars de cigró resistents al fong *Ascochyta rabiei* que en els sensibles, i aquesta diferència augmenta encara més quan hi ha una infecció pel fong. A més, s'ha vist que els cultivars resistents tenen un major nombre de elements del xilema i de cèl·lules del parènquima, fet que podria relacionar el metabolisme de les PAS amb l'organització estructural de la planta (Angelini i col., 1993). En aquesta relació hoste-patogen, la resistència no està relacionada amb la resposta hipersensible, ja que en els cultivars resistents la regió necrosada (síntoma de la infecció) és menor que en els sensibles, probablement a causa de la falta, en els últims, del H_2O_2 necessari per a la reparació i remodelació de la paret cel·lular (Rea i col., 2002).

Atès el seu limitat temps de vida i la seva potencial toxicitat, el H_2O_2 ha de ser generat *in situ* i els seus nivells han de ser degudament regulats. En aquest context, les proteïnes implicades en la regulació dels nivells de H_2O_2 , com és el cas de les AOs, probablement tenen un paper crucial alhora de produir aquest H_2O_2 en el lloc i el moment adequat. A més, s'ha suggerit que l'aparent redundància d'AOs en plantes podria reflectir la necessitat de síntesi de H_2O_2 en compartiments específics durant les diferents fases del desenvolupament i la diferenciació, així com en els mecanismes de defensa de la planta (Angelini i col., 2010).

2 Objectius

2 Objectius

Com s'ha indicat en la Introducció, les PAs s'han relacionat amb la resposta de les plantes a estrès biòtic i abiòtic. De fet, un dels canvis metabòlics més notoris en la resposta de les plantes a estrès és un increment en els nivells d'aquests compostos (Alcázar i col., 2006b). Però el mecanisme d'acció i la contribució de cada PA (Put, Spd o Spm) en aquesta resposta és encara objecte d'estudi. En general es considera que l'acumulació de Spd i Spm, per activació del flux metabòlic de Put cap a aquestes PAs, permet discriminar entre varietats tolerants i no tolerants a estrès (Yang i col., 2007; Alcázar i col., 2006b; Kumria i Rajam, 2002). El paper protector de les PAs davant de l'estrès s'ha atribuït principalment a Spd i Spm, restringint el paper de Put al de precursora de les PAs de més pes molecular. No obstant això, treballs previs realitzats al nostre laboratori van demostrar que els mutants de pèrdua de funció per qualsevol dels dos gens que codifiquen ADC en *Arabidopsis thaliana* (*ADC1* i *ADC2*), els quals presenten nivells reduïts de Put en relació a les plantes de tipus silvestre, eren més sensibles a fred que aquestes últimes (Cuevas i col., 2008). Això suggeriria que la Put pot tenir un paper intrínsec en la resposta de les plantes a estrès.

L'objectiu principal d'aquest treball ha estat estudiar si l'acumulació de Put pot tenir un efecte protector en la resposta de les plantes a estrès abiòtic i intentar conèixer el seu mecanisme d'acció. Per això hem utilitzat la planta model *Arabidopsis thaliana* i ens hem centrat en la resposta a fred i deshidratació. D'altra banda, es important considerar que els nivells de Put, igual que els de les altres PAs, estan regulats per la biosíntesi, però també pel catabolisme. Per tant, els nivells endògens de PAs en plantes podran modificar-se alterant l'expressió dels gens que codifiquen enzims de la ruta biosintètica o de la catabòlica. En *Arabidopsis* tots els enzims implicats en la biosíntesis de PAs han estat ben caracteritzats, però no passa el mateix amb els del catabolisme. Com s'indica en la Introducció, aquest procés està mediat per amino oxidases, que poden ser PAOs (oxiden preferentment Spd i Spm) i CuAOs (tenen major afinitat per diamines com la Put). A la base de dades d'*Arabidopsis* (www.arabidopsis.org) hi ha 15 gens anotats com putatives AOs, de les quals 5 s'han caracteritzat recentment com a PAOs. Les 10 restants són putatives CuAOs, però fins al moment només una d'elles ha estat caracteritzada (ATAO1).

Considerant tot el que s'ha exposat els objectius específics d'aquest treball han estat:

- 1) Estudiar el possible efecte protector de la Put en la resposta d'Arabidopsis a fred, utilitzant plantes transgèniques sobreexpressores d'*ADC1* o *ADC2*.
- 2) Estudiar l'efecte de l'acumulació de Put, produïda per sobreexpressió d'*ADC1* o *ADC2*, en la resposta d'Arabidopsis a deshidratació, i intentar esbrinar el possible mecanisme d'acció de la Put en aquesta resposta.
- 3) Caracteritzar funcionalment algunes de les proteïnes anotades com amino oxidases dependents de coure en la base de dades *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR) (www.arabidopsis.org) i estudiar la seva localització subcel·lular.

3 Materials i mètodes

3 Materials i mètodes

3.1 Material vegetal

Per a la realització del treball s'han utilitzat plantes d'*Arabidopsis thaliana* varietat Columbia 0 obtingudes de la casa comercial "Lehle seeds, USA" per al tipus silvestre (WT), plantes transgèniques *35S::ADC2*, *35S::ADC1* i *35S::HAB*, mutants *aba2-3*, plantes híbrides *aba2-3* x *35S::ADC2*, i el doble mutant *hab1-1* x *abi1-2*.

- Plantes *35S::ADC2*: expressen el gen *ADC2* sota el control del promotor constitutiu 35SCaMV, i havien estat obtingudes i caracteritzades prèviament al laboratori (Alcázar i col., 2005).

- Plantes *35S::ADC1*: expressen el gen *ADC1* sota el control del promotor constitutiu 35ScaMV i s'han caracteritzat en el present treball.

- Mutants *aba2-3*: Mutants d'*Arabidopsis thaliana* Columbia 0 deficients en ABA per bloqueig en la conversió de xanthoxina a ABA-aldehid (Laby et al. 2000).

- Plantes híbrides *aba2-3* x *35S::ADC2*: obtingudes en el present treball per fecundació de mutants *aba2-3* (mare) amb pol·len de plantes *35S::ADC2* , .

- Plantes transgèniques *35S::HAB*: expressen de manera constitutiva el gen *HAB1*, que codifica la proteïna fosfatasa de tipus 2C "Hypersensitive to ABA1" (HAB1), un regulador negatiu de la resposta a ABA (Saez i col., 2004). Aquestes plantes van ser cedides pel Dr. Perdo Rodriguez (Instituto de Biologia Molecular i Cel·lular de Plantes, IMBCP, UPV-CSIC, Valencia).

- Doble mutant *hab1-1* x *abi1-2*: obtinguts per inactivació de dos reguladors negatius de la senyalització per ABA. Concretament dues proteïnes fosfatasa de tipus 2C (PP2Cs), la "ABA-insensitive 1" (ABI1) i la HAB1 (Saez i col., 2006). Aquest doble mutant és hipersensible a ABA, i també va ser cedit pel Dr. Perdo Rodriguez.

3.2 Cultiu i tractaments del material vegetal

3.2.1 Creixement *in vitro* d'Arabidopsis

Per al cultiu *in vitro* les llavors es van esterilitzar amb clor gas (Cl_2). Per això, es van introduir les llavors en tubs eppendorf oberts, i es van mantenir en contacte amb Cl_2 gas durant 3–5 h en un dessecador tancat. Per a obtenir Cl_2 es van mesclar, en un vas de precipitats, 100 ml d'hipoclorit sòdic 30% (Panreac, Barcelona) i 5 ml de HCl 9N (Panreac).

Les llavors estèrils es van sembrar en plaques de petri de 8 cm de diàmetre, que contenien el medi de cultiu adequat per cada cas, posant unes 20-30 llavors per placa i, per sincronitzar la germinació, es van estratificar incubant-les a 4°C en fosc 48-72 h.

El medi de cultiu utilitzat va ser el MS (Duchefa, Holanda), a raó de 4,3g/l, que té la següent composició: sals minerals (Murashige i Skoog, 1962), vitamis Gamborg B5 (Gamborg i col., 1968) i 0,5 g/l MES; amb o sense addició de sacarosa depenent de l'ús. El pH es va ajustar a $5,8 \pm 0,2$ amb KOH 0,5 M. Per obtenir medi sòlid es van afegir 8 g/l de Plant Agar (Duchefa, Holanda). El medi es va autoclavar durant 30 minuts a 120 °C i, en els casos que fou necessari, es va deixar refredar a 50-60°C abans de l'addició dels agents de selecció, hormones o altres compostos utilitzats per a diferents tractaments. Aquests compostos es van esterilitzar per filtració, fent servir membranes de 0,22 µm de porus (Millipore). Les plantes es van cultivar a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ en fotoperíode de dia llarg (16h de llum i 8h de fosc), o be dia curt (8h de llum i 16h de fosc), amb una intensitat de llum de 110 µmol/m²s.

Altres modificacions que es varen fer en el medi de cultiu, segons el seu ús, es descriuen en els apartats corresponents.

3.2.1.1 Tractaments amb hormones i elicitors

Plàntules de 6 dies d'edat, crescudes en plaques de Petri en posició vertical, que contenien MS sòlid complementat amb 1% de sacarosa, es varen transferir a plaques de 6 pous, que contenien 8 ml del medi MS líquid, a raó de 8 plantes per pou. Després de 10 dies de creixement, es va substituir el medi de cada pouet per medi fresc que contenia o no, en el cas del control, els següents compostos: 500 µM SA (àcid salicílic),

100 μM MeJA (metil jasmonat), 20 μM ACC (1-aminocyclopropa-1-carboxilic àcid, precursor de l'etilè), 100 μM ABA (àcid abscísic), o 1 μM flagel·lina 22. També es va afegir medi fresc a les plantes que se'ls varen fer ferides amb unes pinces de ferro prèviament esterilitzades, tal com es descriuen Rojo i col., (1998). Un cop canviat el medi, es va prendre mostres a diferents temps: 0, 3, 8 i 24 h. Les mostres es van polvoritzar en nitrogen líquid, amb l'ajuda d'un morter, i es van guardar a -80°C fins a el moment del seu ús.

Per estudiar l'expressió de diferents gens de resposta a ABA en plantes de tipus silvestre i *35S::ADC2*, es va seguir el mateix procediment, però les plàntules es van tractar només amb ABA, i es van prendre mostres a les 0 i 3 h.

3.2.2 Creixement en terra d'Arabidopsis

Per al creixement de plantes en terra, es va utilitzar com a substrat una barreja de torba:vermiculita (3:1) prèviament tamisada, per tal d'eliminar els trossos de torba grans i obtenir un substrat homogeni.

En el cas concret dels experiments de deshidratació i fred es varen utilitzar testos de 6 cm d'ample, 6 cm de llarg i 6 cm de profunditat, que es van omplir amb la mateixa quantitat de substrat (70 g), comprimint suaument. Posteriorment, es van regar amb solució nutritiva Hoagland i Arnon (1938) (Taula M.1), perquè el substrat obtingués la humitat suficient per a la germinació de les llavors. Per aquests experiments, es van sembrar unes 20-30 llavors, sense esterilitzar, directament a cadascun dels testos, que es van cobrir amb plàstic transparent, per mantenir un major grau d'humitat i es van posar a 4°C en fosc 48h-72h per estratificar-les i sincronitzar la germinació. Per tenir un nombre homogeni de plantes, 9-12 dies després de la sembra es va eliminar l'excés de plantes deixant exactament 10 plantes per test.

Per als experiments de transpiració i observació d'estomes, les plantes es van cultivar individualment, en testos rodons de 4 cm de diàmetre i 5 cm de profunditat, per tal de facilitar el maneig, i evitar al màxim el dany mecànic, durant les mesures de transpiració i presa de mostres per observar estomes. La quantitat de substrat va ser igual a tots els testos, i es va seguir el mateix protocol que en el cas anterior, però el nombre de llavors inicial es va reduir a 4-5, i un cop germinades es va deixar una única planta per test.

Taula M.1. Composició de la solució nutritiva Hoagland i Arnon (1938)

Macronutrients	NO₃⁻	NH₄⁺	PO₄^{-x}	K⁺	Ca²⁺	Mg²⁺	SO₄²⁻
mM	7.0	1.0	1.0	3.0	2.0	0.5	0.5
Micronutrients	Fe	Mn	Zn	B	Cu	Mo	Co
μM	19	15	5	9	5	0.9	0.3

pH de 6, conductivitat elèctrica 1.0 S

(Les impureses de l'aigua aporten Cl i Na)

Les plantes es van cultivar a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ en fotoperíode de dia curt (8h de llum, 16h de foscor) per als experiments de deshidratació i transpiració, i en fotoperíode de dia neutre (12h de llum, 12h de foscor) per als experiments de fred. En tots els casos la intensitat de llum utilitzada va ser de $110\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ i la humitat d'aproximadament el 70%. Les plantes es van regar 2-3 vegades per setmana amb solució de Hoagland i Arnon.

Les plantes per als experiments de deshidratació es van cultivar en condicions de dia curt per minimitzar les diferències de mida entre les plantes de tipus silvestre i les línies transgèniques *35S::ADC2*, que presenten un fenotip de nanisme (Alcázar i col., 2005), més pronunciat en condicions de dia llarg, això podria representar una variable addicional i per tan emascarar els resultats dels experiments.

3.2.2.1 Deshidratació.

Per a dur a terme els experiments de deshidratació es van fer servir plantes de 4 setmanes d'edat. Al inici del procés es van regar les plantes i, seguidament, es van posar damunt de paper de filtre per eliminar l'excés de solució de reg. Així, ja que tots els testos contenien la mateixa quantitat de substrat, s'assegurava que el procés de deshidratació començava amb aproximadament el mateix contingut d'aigua en tots els testos. Per accelerar la deshidratació es va passar de condicions d'il·luminació de dia curt (8 h de llum/16 h de foscor) a dia llarg (16 h de llum/8 h de foscor) i es va incrementar la temperatura de 22°C a 24°C . D'aquesta manera es simulaven més les condicions naturals, ja que els períodes de sequera van acompanyats normalment d'un increment de temperatura i es donen durant les estacions en què els dies són més llargs (estiu). Les plantes es van deixar de regar durant 14 dies, i es van prendre mostres a diferents temps: dia 0 (dia en què es va començar l'experiment), i dies 2, 4, 8, 11 i 15, per analitzar

diferents paràmetres: quantitat d'aigua retinguda pel substrat, contingut relatiu d'aigua en les fulles, potencial de soluts, nivells de poliamines, i nivells d'ABA. Per determinar el grau de resistència a deshidratació, en un experiment paral·lel, realitzat en les mateixes condicions, després dels 14 dies de deshidratació, es van regar de nou les plantes i, transcorreguda una setmana, es va determinar el percentatge de supervivència.

Per estudiar l'efecte de les gibberel·lines en la tolerància a deshidratació, una setmana abans de començar el procés, les plantes es van ruixar amb una solució 10^{-4} M de GA_3 + 0,1% Twen-20 cada dos dies, tal com descriu (Hsieh i col., 2002). El GA_3 provenia d'una solució mare en que es trobava dissolt en etanol, per aquest motiu, les plantes no tractades es van ruixar amb aigua destil·lada que contenia una quantitat d'etanol equivalent a la que es trobava dissolt el GA_3 i 0,1% de Twen-20.

3.2.2.2 Congelació.

La tolerància a congelació es va determinar en plantes de 3 setmanes crescudes en les condicions indicades anteriorment. Per determinar la temperatura òptima, en que hi hagués una relació supervivència/nombre total de plantes tal que permetés comparar les diferents línies entre si, inicialment es van realitzar congelacions a -7 °C, -6 °C i -5 °C, en el cas de plantes no aclimatades, i a -12 i -13 °C per a plantes aclimatades. Les temperatures òptimes van resultar ser de -5 °C i -12 °C, de manera que els estudis definitius de tolerància a congelació es van realitzar a aquestes temperatures. Tots els experiment de congelació es van realitzar en una càmera Radiber model GS-1456 ESP (Radibber, Barcelona).

L'assaig es va iniciar mantenint les plantes a 4 °C durant 30 min, i es va anar baixant la temperatura 2 °C/h fins a aconseguir la temperatura desitjada, a la qual es van mantenir les plantes durant 6 hores. Transcorregut aquest temps, es van descongelar les plantes mantenint la cambra a 4 °C. L'aclimatació es va dur a terme posant les plantes a 4 °C durant els 7 dies previs a la congelació, en les mateixes condicions de llum i humitat que els dies anteriors. En finalitzar el tractament de congelació les plantes van ser retornades a les condicions normals de creixement i, transcorreguts 14 dies, es va determinar el nombre de supervivents (Cuevas i col., 2008).

3.3 Determinació de paràmetres relacionats amb l'estrès hídric

3.3.1 Determinació de la quantitat d'aigua retinguda pel substrat

Com s'ha indicat anteriorment, tots els testos utilitzats en els experiments de deshidratació contenien la mateixa quantitat de substrat, per tal d'aconseguir que la capacitat de retenir aigua fos homogènia.

Al inici de l'experiment de deshidratació es van pesar tots els testos amb el substrat totalment hidratat, i es van tornar a pesar cada dia que es va prendre mostra (T). Al final del període de deshidratació es van deixar els testos 2 dies a 70°C per determinar el pes sec (PS). A partir de les dades obtingudes es va calcular el contingut gravimètric d'aigua al sòl (SGWC) aplicant la fórmula:

$$\text{SGWC} = (T - \text{PS}) / \text{PS}$$

Aquest valor ens dóna una idea de l'estat hídric del substrat, és a dir l'aigua retinguda en aquest (Gaxiola i col., 2001).

3.3.2 Determinació del contingut relatiu d'aigua en les fulles

Per determinar el contingut relatiu d'aigua en les fulles (RWC), un paràmetre que ens dóna idea de l'estat hídric de la planta, es van utilitzar 7 plantes de tipus silvestre i de cada línia transgènica, crescudes en diferents testos, i es va seguir el protocol descrit per Gaxiola i col (2001). De cada planta es van prendre dues fulles de la roseta basal totalment expandides i es va determinar el seu pes fresc (PF). Aquestes fulles es van deixar surant en aigua desionitzada a 4°C tota la nit i, l'endemà, després d'eliminar les gotes d'aigua de la superfície foliar amb paper absorbent, es van pesar de nou (pes rehidratat: PR), i es van deixar assecar en una estufa a 70 °C durant 24 h per determinar el pes sec (PS). A partir de les dades obtingudes es va calcular el RWC aplicant la següent fórmula:

$$\text{RWC} = (\text{PF} - \text{PS}) / (\text{PR} - \text{PS})$$

3.3.3 Determinació del potencial de soluts

Com en el cas anterior, es van utilitzar un mínim de 7 plantes de tipus silvestre i de cada línia transgènica crescudes en diferent test, i es va seguir el protocol descrit per Gaxiola i col (2001). En aquest cas es van utilitzar totes les fulles de la planta, i es van deixar surar en aigua desionitzada a 4°C tota la nit. L'endemà, després d'eliminar les gotes d'aigua de la superfície foliar, es van congelar les fulles i, a continuació, es van descongelar i es van homogeneïtzar. L'homogeneïtza't resultant es va centrifugar a 400g, i la saba resultant es va analitzar amb un osmòmetre de congelació (Fiske One-Ten, Advanced Instruments, Estats Units). A partir de les lectures obtingudes (mmol/kg) es va calcular el potencial de soluts (ψ_s) en MPa mitjançant l'equació de Van't Hoff (Taiz i Zeiger, 1998):

$$\psi_s = - \text{mols de solut}(R \cdot T)$$

$$R = 0.0083141 \text{ MPa mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$$

$$T = 295 \text{ K}$$

3.3.4 Mesures de transpiració.

Per mesurar la taxa de transpiració es van utilitzar plantes de 6-8 setmanes d'edat, evitant fer servir les fulles més velles o les més joves. Es va tenir en compte que les plantes estiguessin en condicions òptimes de creixement, és a dir ben regades i sense cap tipus d'estrès.

Les mesures es van realitzar amb un analitzador d'intercanvi de gasos LI-COR LI-6400 (LI-COR Biosciences, Estats Units), que dona els valors de transpiració en $\text{mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Aquest analitzador determina les diferències del contingut d'aigua entre dues cel·les, mitjançant fraccions molars d'aquesta en l'aire, compara una cel·la on hi ha la fulla de la planta a analitzar amb una altra en les mateixes condicions (CO_2 , T^a , flux d'aire i àrea) però sense la fulla (Caemmerer i Farquhar, 1981).

Totes les mesures es van iniciar 1 hora després de que s'encenguessin els llums de la cambra de cultiu i es van finalitzar 1 hora abans que aquestes s'apaguessin. En tots els casos la font de llum, era la de la cambra de cultiu, que tenia una intensitat de $110 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$. La concentració de CO_2 a l'aparell LI-COR LI-6400 es va fixar a $400 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol aire}^{-1}$, la T^a i la humitat van ser les de la càmera de cultiu (22°C i 70% d'humitat). Per realitzar les mesures el LI-COR LI-6400 es va mantenir dins de la

cambrà de cultiu tancada, evitant així l'entrada de CO₂ de l'exterior, que podria alterar les mesures a causa d'un major tancament estomàtic, amb la consegüent disminució dels valors de transpiració.

3.3.5 Determinació del nombre d'estomes i del grau d'obertura estomàtica.

Per determinar el nombre d'estomes i el grau d'obertura estomàtica es van utilitzar plantes de 6-8 setmanes d'edat, crescudes en les condicions descrites en l'apartat 3.2.2.

Es van utilitzar com a mínim 5 fulles de 5 plantes diferents per línia analitzada, a les quals, se'ls van arrencar acuradament fragments d'epidermis abaxial mitjançant unes pinces. Aquests fragments es van col·locar en un porta-objectes sobre una gota de solució tampó (5mm KCl, 10mm TrisMes i pH 6.15), procurant que l'epidermis quedés totalment estesa, i es van cobrir amb un cobreobjectes. Per a les observacions microscòpiques es va utilitzar un microscopi Nikon diaphot (Nikon, Japó) al qual hi havia acoblada una càmera fotogràfica Cànon EOS 450D (Canon, Japó). Les fotos es van analitzar amb el programa ImageJ 1.41 (National Institutes of Health, Estats Units). Per determinar el nombre d'estomes per unitat de superfície es van contar els que hi havia en cada fotografia, tenint en compte que totes es varen realitzar amb el mateix objectiu i que, per tant, tenien la mateixa mida, i es va calcular la mitjana. Per determinar l'obertura estomàtica es va mesurar l'ample i llarg del porus format entre les dues cèl·lules oclusives, i el valor de l'obertura es va calcular com la relació amplada/llargada, de manera que quant més gran era el valor obtingut major era l'obertura estomàtica.

3.4 Determinació de paràmetres relacionats amb la resposta a ABA

3.4.1 Obertura estomàtica en resposta a ABA.

Per observar els estomes es va seguir el protocol descrit en l'apartat anterior (3.3.5), però, abans de separar l'epidermis abaxial, les fulles van estar exposades a tractaments amb diferents concentracions d'ABA.

Abans que s'encenguessin els llums de la cambra de cultiu, es van prendre les fulles i es van posar surant, amb la cara abaxial cap baix, en una solució tampó (5mm KCl,

10mm TrisMes i pH 6.15) durant 2.5 h. Passat aquest temps, es van transferir a una altra solució tampó, igual que l'anterior, però amb diferents concentracions d'ABA: 0, 0,1, 1, 10 i 100 μM , on es van mantenir durant 3h (Gaxiola i col., 2001). Passat aquest temps, es va separar l'epidermis abaxial i es va procedir a observar els estomes al microscopi, i a mesurar la seva obertura, com s'ha descrit en l'apartat anterior.

3.4.2 Creixement d'arrels amb aplicació exògena d'ABA

Per determinar com afecte l'ABA al creixement de les arrels es va seguir el protocol descrit Rodrigues i col (2009). Es van sembrar les llavors en plaques de Petri, que contenien medi MS 0.5X, complementat amb 1% de sacarosa i solidificat amb 1% de Plant Agar. Després de dos dies d'estratificació a 4°C, es van deixar créixer les plantes en condicions de dia llarg (16h/8h fosc), a 22 °C, i mantenint les plaques en posició vertical. Transcorreguts 4-5 dies, es van passar les plàntules a plaques que contenien el mateix medi de cultiu complementat o no (control) amb ABA 10 μM . Aquestes plaques també es van mantenir en posició vertical per tal de que les arrels no penetressin en el medi i poder veure, així, el creixement de cadascuna. Per això, després de 12 dies, es van mesurar les arrels a partir de fotos que s'havien pres amb una càmera Canon EOS 450D i analitzant les imatges amb el programa Image J.

3.4.3 Germinació de les llavors en presència d'ABA exogen

Per determinar l'efecte del ABA sobre la germinació de les llavors es van realitzar dos tipus d'assajos. En un d'ells, les llavors de plantes de tipus silvestre i de les dues línies transgèniques sobreexpresores d'*ADC2* tolerants a deshidratació (2.1 i 3.6) es van sembrar en plaques de Petri que contenien medi de cultiu sòlid MS, complementat o no amb ABA 0, 5 μM , es van estratificar a 4°C durant 48 h a la foscor i, transcorregut aquest temps, es van deixar créixer en condicions de dia llarg (16h/8h fosc), a 22 °C. El percentatge de germinació es va determinar en base a l'aparició de la radícula, i es va monitoritzar cada dia durant 12 dies.

En el segon assaig, les llavors es van sembrar en medi MS sòlid, complementat amb diferents concentracions d'ABA (0, 0,5, 1, 2, 3 i 5 mM), es van estratificar igual

que en l'assaig anterior, i després de 5 dies de creixement a 22°C, en condicions de dia llarg, es va determinar el percentatge de germinació, en base a l'aparició de la radícula.

Es van utilitzar aproximadament 100 llavors de cada genotip en cada medi de cultiu, i es van realitzar 3 experiments de germinació per a cadascuna de les condicions. Els resultats són la mitjana dels 3 experiments.

3.5 Anàlisi dels nivells de poliamines per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC)

3.5.1 Extracció de PAs a partir de teixit vegetal

Les mostres de material fresc (300 mg) es van polvoritzar en nitrogen líquid i es van homogeneïtzar amb 1 ml de PCA 5% (v/v). Els homogeneïtzats es van centrifugar a 21.000 g durant 20 min per separar la fracció soluble (S) de la insoluble (P). El sobrenedant contenia les PAs lliures (S) i les conjugades solubles (SH), mentre que el residu contenia les PAs conjugades insolubles (PH). El residu es va resuspendre en 1 vol de NaOH 1N. Alíquotes de 200 µl d'aquesta suspensió i del sobrenedant es van hidrolitzar amb 1 vol de HCl 12N, durant 16 h a temperatura ambient, per separar les bases lliures dels seus conjugats. Posteriorment, els hidrolitzats es van centrifugar a 21.000 g durant 20 min per eliminar el material carbonitzat després del tractament. El sobrenedant es va transferir a vials topazi de 5 ml i es va evaporar a 65°C aplicant buit. El residu es va resuspendre en 1 vol de PCA 5% (v/v) per a posterior dansilació.

3.5.2 Dansilació de PAs

Les PAs presents en les fraccions S, SH i PH es van dansilar seguint el mètode descrit per Marce i col. (1995). Per això, a 200µl d'extracte de cadascuna de les fraccions es va afegir 1 vol de solució saturada de Na₂CO₃, 40µl de 1,7-diaminohepta (HTD) 50µM, com a estàndard intern, i 2 vol de clorur de dansil (5 mg/ml en acetona), i es va incubar durant 16 h en foscor a T^a ambient. Transcorregut aquest temps, es van afegir 100 µl de prolina (100 mg/ml en aigua), per aturar la reacció de dansilació, i es va incubar 30 min a T^a ambient. Les PAs dansilades es van extreure amb 500 µl de toluè mitjançant agitació vigorosa amb un vòrtex. Es van recuperar 500 µl de la fase orgànica

i es van evaporar aplicant buit. Finalment, els extractes dessecats es van resuspendre en 800 µl d'acetonitril i es van filtrar a través de membranes de 0,45 µm de porus per l'anàlisi per HPLC.

3.5.3 Preparació dels estàndards de PAs

Per determinar els temps de retenció de cada PA analitzada es van utilitzar patrons de concentració i composició coneguda, que es van dansilar seguint el mateix procediment descrit per les mostres. Els patrons utilitzats i els seus temps de retenció aproximats s'indiquen a la Taula M.2.

Taula M.2. Temps de retenció de les poliamines en la separació per HPLC .

Poliamina	Temps de retenció (min)
Putrescina	5,68
1,7-diaminohepta	7,17
Espermidina	7,90
Espermina	8,73

3.5.4 Separació de PAs per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC)

La identificació i quantificació de PAs es va realitzar per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC), seguint el protocol descrit per Marcé i col. (1995).

Per a la separació es va utilitzar una columna Sphereclone ODS(2) C-18 de fase reversa (250 x 4,6 mm), amb una mida de partícula d'ompliment de 5 micres, i diàmetre de porus de 80 Å (Phenomenex, Estats Units), precedida per una precolumna de 5 micres de característiques similars. El gradient es va mantenir mitjançant l'ús d'una bomba bifàsica Perkin Elmer 200. La lectura espectrofluorimètrica es va realitzar en un detector de fluorescència Applied Biosystems Kratos Spectroflow 980 (Life Technologies, Estats Units), a longituds d'ona d'excitació i emissió de 252 i 500 nm, respectivament. Les mostres es van injectar a la columna en alíquotes de 20-40 µl, i els derivats dansilats es van eluir amb un gradient d'acetonitril: aigua (70:30) durant 4 min i 100% acetonitril durant 4 min més.

3.5.5 Quantificació dels nivells de PAs

Els pics obtinguts en el cromatograma es van integrar utilitzant el programa informàtic TotalChrom II[®] (Perkin Elmer, Estats Units). Es van realitzar rectes de regressió absorbància/concentració per a cadascuna de les PAs analitzades utilitzant diferents quantitats de cada poliamina i les pendents obtingudes van ser:

$$\text{Put} = 52,083$$

$$\text{Spd} = 41,152$$

$$\text{Spm} = 32,894$$

Aquests valors es van substituir per la K en la següent fórmula per obtenir la quantitat de la PA corresponent:

$$\text{PA (nmol.g PF}^{-1}\text{)} = K \frac{\text{Area PA}}{\text{Area HTD}}$$

3.6 Anàlisi dels nivells ABA pel mètode ELISA

Els nivells d'ABA en les diferents mostres es van determinar pel mètode ELISA indirecte (Walker-Simmons, 1987).

3.6.1 Extracció i purificació de les mostres per a la determinació d'ABA.

Rosetes de diferents plantes es van polvoritzar amb nitrogen líquid. Es van pesar aproximadament 200 mg d'aquesta pols, es van homogeneïtzar amb 750 µl d'una mescla d'acetona: aigua: àcid acètic (80:19:1, v:v:v) i es van deixar a -20°C en fosc durant 16-24 h. Després de centrifugar els homogeneïtzats a 21.000 g durant 20 minuts, es va guardar el sobrenedant, i es va realitzar una nova extracció amb el sediment. Els sobrenedats obtinguts en les 2 extraccions es van ajuntar, i l'extracte total es va evaporar per arrossegament amb corrent de nitrogen. El residu sec es va conservar a -70°C fins al moment de l'anàlisi.

3.6.2 Quantificació dels nivells d'ABA

Per quantificar els nivells d'ABA, les mostres, obtingudes com s'indica en l'apartat anterior, es van diluir 1:24 (p:v) amb TBS (6 g/l Tris, 8,8 g/l NaCl, 0,2 mg/l MgCl₂, pH

7,8). D'altra banda, es va elaborar una recta patró amb 6 concentracions diferents d'ABA: 15, 30, 75, 100, 150 i 250 pg ABA/100µl TBS i un control negatiu sense ABA (Std 0). Les mostres i els patrons es van barrejar amb anticòs monoclonal anti-ABA (Mab) (2 mg Mab/135 ml TBS que contenia BSA al 0,2% p/v) en la proporció 1:1 i es van incubar a 4°C tota la nit.

Com antigen per al anàlisi tipus Elisa es van utilitzar conjugats ABA-BSA cedits per la Dra Teresa Lafuente (IATA, CSIC, València), que havien estat preparats segons descriu Weiler (1980) amb algunes modificacions (Norman i col., 1988).

En cada pouet de la placa Elisa (multiwell plate, Sigma) es van carregar 200 µl del conjugat ABA-BSA, es va tapar la placa amb paper d'alumini, i es va incubar tota la nit a 4°C. Al dia següent, es va rentar la placa dues vegades amb la solució de rentat (TBS, 0,5% Tween-20, 0,1% p/v BSA), i es va fer un tercer rentat amb aquesta solució, però incubant la placa a la foscor, durant 10 minuts a T^a ambient. Una vegada eliminat l'excés d'antigen, es van afegir a cada pouet 200 µl de les mostres o patrons d'ABA units a Mab (dos pouets per mostra, Figura M.1). Es va tapar la placa amb paper d'alumini i es va incubar 2 hores a T^a ambient.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	St 0	St 100	M 2	...								
B	"	"	"									
C	St 15	St 150	M 3									
D	"	"	"									
E	St 30	St 250	M 4									
F	"	"	"									
G	St 75	M 1	M 5									
H	"	"	"									

Figura M.1. Esquema del muntaje d'un placa ELISA amb les mostres (M) i els patrons (St).

Passat aquest temps, es van fer 3 rentats amb tampó de rentat i es van carregar 200 µl per pouet d'una dilució 1:1000 d'anticòs secundari (anticòs anti-ratolí unit a fosfatasa alcalina) en TBS. Es va tapar la placa amb paper d'alumini i es va incubar 2 hores a T^a ambient. A continuació, es va rentar 3 vegades amb la solució de rentat i es va carregar cada pouet amb 200 µl de substrat (1 mg p-nitrofenol fosfat disòdic/ ml bicarbonat sòdic

0.05 M). Després d'incubar durant aproximadament 1 h, es van realitzar lectures d'absorbància, amb un lector de plaques ELISA SpectraMax M3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, Estats Units), cada 5 min a 405 nm fins que l'absorbància del St 0 va ser propera a 1. Aquests valors es van utilitzar per realitzar els càlculs corresponents i calcular la concentració d'ABA en les mostres analitzades. També es va considerar indicativa una lectura del patró de 15 pg ABA/100 µl TBS propera a 0,75. L'absorbància de les mostres es inversament proporcional a la quantitat d'ABA present en les mostres originals incubades amb Mab

A partir dels resultats d'absorbància obtinguts per als estàndards d'ABA, es va realitzar una recta de regressió absorbància/concentració ($i = Ax + B$). Cal tenir en compte que en totes les plaques ELISA es van posar estàndards, cosa que va permetre realitzar una recta per placa. Els valors d'absorbància de les mostres es van substituir en l'equació de la recta corresponent, obtenint així la quantitat (pg) d'ABA que contenia cada pouet (100 µl) (valor L). Aquest valor es va substituir a l'equació següent per obtenir el contingut d'ABA en cada mostra:

$$\text{Contingut ABA (pg/g PF)} = L \frac{VMt \cdot VE}{100 \cdot Va \cdot P}$$

VE = volum de TBS en què s'ha suspès l'extracte sec inicial = 500 µl

VMt = volum de la mescla de reacció (Va + 230µl de TBS + 250µl de MAB) = 500 µl

Va = alíquota de l'extracte sec inicial resuspès amb TBS = 20 µl

P = pes fresc de la mostra \cong 0,2 g

3.7 Mètodes bacterians

3.7.1 Soques bacterianes

Per a obtenir les construccions genètiques utilitzades en aquest treball es va utilitzar la soca DH5α d'*Escherichia coli*. Per a l'agroinfiltració de fulles de *Nicotiana benthamiana* es va utilitzar la soca d'*Agrobacterium tumefaciens* EHA-105.

3.7.2 Medis de cultiu

Per al cultiu de bacteris es van utilitzar els següents medis:

LB (Luria-Bertani): 10 g/l triptona, 5 g/l extracte de llevat i 10 g/l de NaCl en aigua, ajustant el pH a 7,0 amb NaOH. En el cas del medi sòlid, es van addicionar 10 g/l de bactoagar. El medi es va autoclavar 30 min a 121°C i, en cas necessari, es va deixar refredar fins a 50°C abans d'addicionar els antibiòtics corresponents. Aquest medi es va fer servir per al cultiu de *E. coli*.

YEB: 5 g/l d'extracte de carn, 1 g/l d'extracte de llevat, 5 g/l bacto-peptona, 5 g/l sacarosa i 0,5 g/l de MgSO₄·7 H₂O en aigua. El pH es va ajustar a 7,0 amb NaOH i es va procedir com en el cas anterior. Aquest medi es va fer servir per al cultiu d'*A. tumefaciens*.

3.7.3 Antibiòtics

Es van preparar solucions mare concentrades que es van esterilitzar per filtració, utilitzant membranes de 0,22 µm de porus (Millipore Corporation, Estats Units), i es van conservar a -20°C en alíquotes d'1 ml. Els antibiòtics i les concentracions utilitzades es mostren en la Taula M.3.

Taula M.3. Antibiotics utilitzats.

<u>Antibiòtic</u>	<u>Solució stock</u>	<u>Concentració de treball</u>
Ampicil·lina	100 mg/ml en aigua	100 µg/ml
Kanamicina	100 mg/ml en aigua	25 µg/ml
Rifampicina	25 mg/ml en DMSO	100 µg/ml
Carbenicil·lina	100 mg/ml en aigua	100 µg/ml
Cloramfenicol	34 mg/ml en EtOH	10 µg/ml

3.7.4 Preparació de cèl·lules competents pel mètode del CaCl₂

A partir d'un glicerinat de la soca DH5α d'*E. coli* es va realitzar una sembra per esgotament en medi LB sòlid. Després de 12 h a 37°C, es va inocular una colònia aïllada en 3 ml de medi LB líquid i es va mantenir 12 h en agitació a 250 rpm i 37°C.

Aquest cultiu es va diluir 1:500 en medi LB i es va deixar créixer en les mateixes condicions. Quant la OD₆₀₀ es va trobar entre 0,5 i 0,6 es va centrifugar a 1600 g durant 10 min a 4°C. El sediment es va resuspendre en 1 ml d'una solució de CaCl₂ 20 mM i es van fer alíquotes de 50 µl, que es van mantenir a -80°C fins la seva utilització.

Per la preparació de cèl·lules competents d'*A. tumefaciens* EHA es va seguir el mateix protocol, però substituint el medi LB pel medi YEB, al que es van afegir 100 µg/ml de rifampicina.

3.7.5 Transformació de bacteris competents per xoc tèrmic

Per a *E. coli*, alíquotes de 50 µl de cèl·lules competents es van incubar amb 2 µl del plasmidi d'interès, obtingut com s'indica en l'apartat 3.7.4, durant 5-30 min en gel. Seguidament es va fer un xoc tèrmic de 45 seg a 42°C i, immediatament, es van transferir els tubs a gel, on es van mantenir durant 2 min. Passat aquest temps, s'hi van addicionar 250 µl de medi LB, prèviament escalfat a 37°C, i es van mantenir una hora en agitació a 250 rpm i 37°C. Aliquotes de 150-250 µl del cultiu líquid es van sembrar en plaques de LB sòlid, amb els antibiòtics de selecció, i es van incubar a 37°C fins que van aparèixer colònies (aproximadament 16 h).

Per a *A. tumefaciens*, a una alíquota de 50 µl de cèl·lules competents s'hi van afegir 1-3 µg del plasmidi d'interès i es va congelar immediatament en nitrogen líquid. A continuació es va posar en un bany Marí a 37 °C durant 5 min i, passat aquest temps, s'hi va addicionar 1 ml de medi YEB i es va mantenir a 28 °C, entre 3 i 5 hores, en agitació a 250 rpm. Passat aquest temps, es van sembrar 150-250 µl del cultiu líquid en plaques de medi YEB sòlid amb els antibiòtics de selecció i es van incubar a 28°C fins que van aparèixer colònies (aproximadament 36 h).

3.7.6 Extracció de DNA plasmídic d'*E.coli*

El DNA plasmídic es va extreure a partir de 5 ml de cultiu bacterià crescut a saturació fent servir el DNA Miniprep Kit® (Qiagen, Anglaterra). Una vegada extret, el DNA es va purificar amb les columnes incloses en el kit i es va quantificar en un NanoDrop (Thermo Scientific, Estats Units).

3.8 Mètodes de manipulació, extracció i quantificació d'àcids nucleics.

3.8.1 Adquisició de plàsmids

Els vectors de utilitzats per a l'expressió de proteïnes en plantes de tabac per la seva posterior purificació o localització varen ser: pYL436 (pC-TAPa, Gene Bank Accession no. AY737283) (Rubio i col., 2005), pEarleyGate101 (per fusionar YFP a C-terminal), pEarleyGate102 (per fusionar CFP a C-terminal), pEarleyGate103 (per fusionar GFP a C-terminal) i pEarleyGate104 (per fusionar YFP a N-terminal) (Earley i col., 2006). Aquests plasmidis, igual que el que contenia la regió codificant d'*AtCuAO1* fusionada a TAP (DKLAT1G62810), es van obtenir a partir de l'Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) (<http://www.arabidopsis.org>) (estocs: CD3-679, CD3-683, CD3-684, CD3-685, CD3-686 i DKLAT1G62810, respectivament). El marcador peroxisomal CFP-SKL (Nelson i col., 2007) també va ser obtingut a través d'ABRC (Estoc CD3-977), mentre que el marcador de secreció extracel·lular SPG-DsRed (Torrent i col., 2009) va ser proporcionat per la Dra. Dolors Ludevid (Centre de Recerca en Agricultura Genòmica, Barcelona).

3.8.2 Oligonucleòtids

Els oligonucleòtids, o encebadors, per a les reaccions de PCR, es van dissenyar utilitzant el programa informàtic PrimerExpress® (Applied Biosystems, Anglaterra). En general, es van seleccionar encebadors amb una temperatura d'aparellament de 50-65°C, i una longitud de 18-22 pb, sense estructures secundàries que facilitessin la formació de homo i heterodímers. Els oligonucleòtids van ser sintetitzats per Sigma oligos (<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/customoligos.html>).

En la Taula M.4 es mostren tots els encebadors utilitzats en aquest treball.

Taula M.4. Encebadors utilitzats.

Encebadors per a la generació dels *entry clone*

Nom	Seqüència	Ús	Referència
<i>ADC1</i> ORF GAT FW	<u>CACCATG</u> CCCTGCTCTAGCT	Reacció TOPO Gateway, cua CACC, per a clonar <i>ADC1</i>	Aquest treball
<i>ADC1</i> ORF GAT RV	ACCGAAATAAGACCAATTCATC	Reacció TOPO Gateway, per a clonar <i>ADC1</i>	Aquest treball
<i>AtCuAO2</i> -FWD	<u>CACCATG</u> GCTCCACTTCAC	Reacció TOPO Gateway, cua CACC, per a clonar <i>AtCuAO2</i>	Aquest treball
<i>AtCuAO2</i> -REV	AAGATCGTTTTTAGGAGTGCAC	Reacció TOPO Gateway, per a clonar <i>AtCuAO2</i>	Aquest treball
<i>AtCuAO3</i> -FWD	<u>CACCATG</u> GCCTCAGCTTCGAA	Reacció TOPO Gateway, cua CACC, per a clonar <i>AtCuAO3</i>	Aquest treball
<i>AtCuAO3</i> -REV	GCGAAGCTTTGAAAAGTAAACCAGTCT	Reacció TOPO Gateway, per a clonar <i>AtCuAO3</i>	Aquest treball
<i>AtCuAO3</i> -REV-stop	AAGCTTTGAAAGTAAACCAGTCTGA	Reacció TOPO Gateway, per a clonar <i>AtCuAO3</i> amb codó de STOP	Aquest treball

Encebadors per a la seqüenciació de plàsmids

Nom	Seqüència	Ús	Referència
<i>AtCuAO1</i> FWD Seq 2	CAGAAATGTCGCCAGCTGATA	Seqüenciació dels plàsmids que contenen <i>AtCuAO1</i>	Aquest treball
<i>AtCuAO2</i> FWD Seq 1	ACGTTTCGGAGATCGTGTTTC	Seqüenciació dels plàsmids que contenen <i>AtCuAO2</i>	Aquest treball
<i>AtCuAO2</i> FWD Seq 2	TGGCATCGTCATATCTCTCG	Seqüenciació dels plàsmids que contenen <i>AtCuAO2</i>	Aquest treball
<i>AtCuAO2</i> FWD Seq 3	GACGACCGTGGGAAACTATG	Seqüenciació dels plàsmids que contenen <i>AtCuAO2</i>	Aquest treball
<i>AtCuAO3</i> FWD Seq 1	ACCGTCCAGCCATCACTAC	Seqüenciació dels plàsmids que contenen <i>AtCuAO3</i>	Aquest treball
<i>AtCuAO3</i> FWD Seq 2	TCACAGTGAGGCTGACGCTCCT	Seqüenciació dels plàsmids que contenen <i>AtCuAO3</i>	Aquest treball
<i>AtCuAO3</i> FWD Seq 3	GTGCCTTATGGCGATCCTAA	Seqüenciació dels plàsmids que contenen <i>AtCuAO3</i>	Aquest treball
<i>AtCuAO3</i> FWD Seq 4	ATTGCTCCTGGGTTGTATGC	Seqüenciació dels plàsmids que contenen <i>AtCuAO3</i>	Aquest treball
<i>ADC1</i> .Seq 1 Primer de 35S	GGTGGAGCACGACACACT	Seqüenciació dels plàsmids que contenen el promotor 35S::	Aquest treball
<i>ADC1</i> Seq 2	TCCCATCGATACCTTTTCC	Seqüenciació dels plàsmids que contenen <i>ADC1</i>	Aquest treball
<i>ADC1</i> Seq 3	TAGAAAGCTGGTTCCAAGCC	Seqüenciació dels plàsmids que contenen <i>ADC1</i>	Aquest treball
<i>ADC1</i> Seq 4	AGCTGTTGTGGCTTCGG	Seqüenciació dels plàsmids que contenen <i>ADC1</i>	Aquest treball
<i>ADC1</i> Seq 5	TCGGATTTGACGTGTGACA	Seqüenciació dels plàsmids que contenen <i>ADC1</i>	Aquest treball

<i>ADC1</i> Seq 6	ACGTCAACAAAGGCTCTCA	Seqüenciació dels plàsmids que contenen <i>ADC1</i>	Aquest treball
<i>ADC1</i> . Seq 7 Primer CFP	ACCCTGGTGAACCGCAT	Seqüenciació dels plàsmids que contenen <i>CFP</i> , <i>GFP</i> o <i>YFP</i>	Aquest treball
<i>ADC2</i> Seq 1 Primer de 35S	AAGACCCTTCCTCTATATAAGG	Seqüenciació dels plàsmids que contenen el promotor 35S	Aquest treball
<i>ADC2</i> Seq 2	TTCGTTTCCCTGATGTGT	Seqüenciació dels plàsmids que contenen <i>ADC2</i>	Aquest treball
<i>ADC2</i> Seq 3	GAATGTGAGGCCGTGTCAT	Seqüenciació dels plàsmids que contenen <i>ADC2</i>	Aquest treball
<i>ADC2</i> Seq 4	CGGAGCTCAGTGAAACAT	Seqüenciació dels plàsmids que contenen <i>ADC2</i>	Aquest treball
<i>ADC2</i> Seq 5	CAGCTGTTCCCTATAGTTCC	Seqüenciació dels plàsmids que contenen <i>ADC2</i>	Aquest treball
<i>ADC2</i> Seq 6	GATGATGAGTTCAACAAATGTG	Seqüenciació dels plàsmids que contenen <i>ADC2</i>	Aquest treball
<i>ADC2</i> Seq 7 Primer GFP	CCACTGACAGAAAATTTGTG	Seqüenciació dels plàsmids que contenen <i>CFP</i> , <i>GFP</i> o <i>YFP</i>	Aquest treball
attB2 RV	GGGGACCACTTTGTACAAGAA	Seqüenciació dels plàsmids que contenen attB1	Invitrogen, Live Technologies
attB1 FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAA	Seqüenciació dels plàsmids que contenen attB2	Invitrogen, Live Technologies
35S: comú CRAG	CGTAAAGACTGGCGAAC	Seqüenciació dels plàsmids que contenen el promotor 35S::	Servei de seqüenciació del CRAG
2x35S comú CRAG	CTTCGCAAGACCCTT	Seqüenciació dels plàsmids que contenen el promotor 35S::	Servei de seqüenciació del CRAG
M13 FW	GTAAAACGACGGCCAGTG	Primer general per a amplificar els entry clone per PCR i per a seqüenciació	Invitrogen, Live Technologies
M13 RV	CAGGAACACAGCTATGACCATG	Primer general per a amplificar els entry clone per PCR i per a seqüenciació	Invitrogen, Live Technologies

Encebadors per a reaccions de RT-PCR quantitativa

Nom	Seqüència	Ús	Referència
<i>ABI1</i> -FWD	CTTTCAGGCCATTCTCCGAA	RT-PCR quantitativa	Aquest treball
<i>ABI1</i> -REV	TTTACCCTCAATCTGATCCCGGT	RT-PCR quantitativa	Aquest treball
<i>ABI2</i> -FWD	ATGATGAAGCGCGGAGGATA	RT-PCR quantitativa	Aquest treball
<i>ABI2</i> -REV	CCGTTCCACCCGGATTACTTTC	RT-PCR quantitativa	Aquest treball
<i>Actina 2</i> Fw	GATTCAGATGCCCCAGAAGTCTTGT	RT-PCR quantitativa	(Alcázar i col., 2005)
<i>Actina 2</i> Rv	TGGATTCCAGCAGCTTCCAT	RT-PCR quantitativa	(Alcázar i col., 2005)

<i>AtCuAO1</i> -FWD Realtime	AGCTGGCGACATTCGTGAGAT	RT-PCR quantitativa	Aquest treball
<i>AtCuAO1</i> -RV Realtime	GTCCAGCATCATCCTCCCTA	RT-PCR quantitativa	Aquest treball
<i>AtCuAO2</i> -FWD Realtime	GTC AAGATGGA ACTCCCGC	RT-PCR quantitativa	Aquest treball
<i>AtCuAO2</i> -RV Realtime	TCGCCACATGATATCTCCAG	RT-PCR quantitativa	Aquest treball
<i>AtCuAO3</i> -FWD Realtime	GTAAGTTTGTGCCACTCCCCC	RT-PCR quantitativa	Aquest treball
<i>AtCuAO3</i> -RV Realtime	GCCACTCGACAAAAGTAACCCC	RT-PCR quantitativa	Aquest treball
<i>HABI</i> Fw Cris	TTTTTGCAAAGGGAGGACTGA	RT-PCR quantitativa	Aquest treball
<i>HABI</i> Rv Cris	CCGTTCCACCCGATTACTTTC	RT-PCR quantitativa	Aquest treball
Odf's (32T) Encebador per a RT-PCR	TT	RT-PCR quantitativa	Aquest treball
OST1 Fw	TGGAGGAAGACTTAGAGAGCGACCTT	RT-PCR quantitativa	(Peters i col., 2010)
OST2 Rv	TGCGTACACAATCTCTCCGCTACT	RT-PCR quantitativa	(Peters i col., 2010)
PP2CA Fw Real Time	TTGCTCTAGACATGGCAAGA	RT-PCR quantitativa	(Rodrigues i col., 2009)
PP2CA Rv Real Time	CTTTGTCGTAACGGGTGTAGC	RT-PCR quantitativa	(Rodrigues i col., 2009)
RD29B-F	GGAGCGGTCACTTCTTTGGCT	RT-PCR quantitativa	(Cuevas i col., 2008)
RD29B-R	GGTGTGCCAAAGTGATTGTG	RT-PCR quantitativa	(Cuevas i col., 2008)

3.8.3 Obtenció dels plasmidis portadors dels gens d'interès

Tots els clonatges per a l'obtenció de les construccions genètiques d'interès es van fer mitjançant Tecnologia Gateway (Invitrogen, Live Technologies, Estats Units), una tecnologia de clonatge universal basada en les propietats de recombinació específiques de lloc del bacteriòfag lambda (Nunes-Duby i col., 1989), que permet introduir seqüències de DNA en múltiples vectors, per a l'anàlisi funcional i l'expressió proteica, d'una manera ràpida i eficient. La recombinació lambda es catalitzada per diferents enzims que s'uneixen als llocs *att*, prenen els llocs diana, els tallen i hi uneixen l'ADN covalentment, podent efectuar la reacció de transferència de l'ADN heteròleg (flanquejat amb llocs *att*) entre vectors Gateway, per la via lítica o lisogènica. La via lítica o reacció LR recombinava un substrat *attL* (*entry clone*) amb un *attR* (*destination vector*) per crear un *expression clone* amb llocs *attB*. D'altra banda, la via lisogènica, o reacció BP, recombinava un substrat *attB* amb un *attP* (*donor vector*) per crear un *entry clone* amb llocs *attL* (Figura M.2).

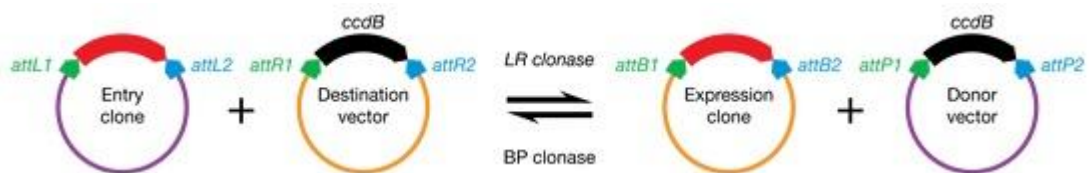


Figura M.2. Esquema de la tecnologia de recombinació Gateway.

3.8.3.1 Generació dels *entry clones*

Les regions codificants d'*ADC1*, *AtCuAO2* i *AtCuAO3* es van amplificar per PCR a partir de cDNA, obtingut per RT-PCR d'ARN de fulles d'*A. thaliana* (veure apartat 3.8.8), utilitzant els següents oligonucleòtids específics dels gens: *ADC1* ORF GAT FW i *ADC1* ORF GAT RV, *AtCuAO2*-FWD i *AtCuAO2*-REV, *AtCuAO3*-FWD i *AtCuAO3*-REV. Les regions subratllades dels encebadors directes faciliten la incorporació direccional de la inserció en el vector, i els encebadors inversos es van dissenyar eliminant el codó d'aturada. Per mantenir el codó d'aturada d'*AtCuAO3* es va fer servir l'encebador *AtCuAO3*-REV-stop, juntament amb *AtCuAO3*-FWD. Els productes de PCR es van visualitzar en un gel d'agarosa, i les bandes desitjades, purificades amb el kit d'extracció de gel QIAquick (Qiagen, CA, EUA) (descriu en l'apartat 3.8.6), es van introduir en el vector pENTR/D-TOPO (Figura M.3), utilitzant la tecnologia Gateway

d'acord amb el protocol proporcionat pel fabricant (Invitrogen Life Technologies), donant lloc als plàsmids *ADC1 entry clone*, *AtCuAO2 entry clone* i *AtCuAO3 entry clone*. Els vectors DKLAT4G34710 i DKLAT1G62810, obtinguts del ABRC, contenien les regions codificants d'*ADC2* i *AtCuAO1*, les quals es van transferir al vector pDONR221, mitjançant una reacció BP, per obtenir els plasmidis *ADC2 entry clone* i *AtCuAO1 entry clone*. Tots els *entry clone* generats es van seqüenciar, tal com s'indica en l'apartat 3.8.5, per tal de comprovar que contenien les corresponents seqüències codificants correctament orientades i que aquestes no tenien cap mutació.

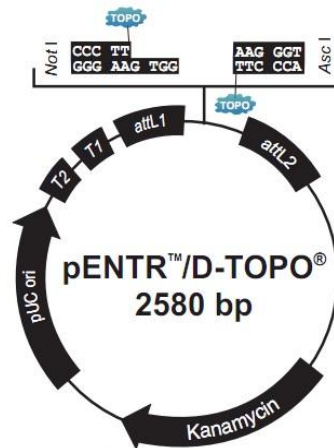


Figura M.3. Esquema de pENTR/D-TOPO, tal com es pot veure, aquest vector ja conte les regions attL1 i attL2 .

3.8.3.2 Generació dels *expression clones*

Per als estudis de localització de proteïnes, les seqüències codificants d'*ADC1* i *ADC2* sense el codó de STOP, contingudes en els respectius *entry clones*, es varen transferir, mitjançant una reacció LR, als *destination vectors* pEarleyGate102 i pEarleyGate103, respectivament, donant lloc als vectors d'expressió en planta *ADC1-CFP* i *ADC2-GFP*. Les seqüències codificants d'*AtCuAO1* i *AtCuAO2*, sense codó de STOP, contingudes en els respectius *entry clones*, es varen transferir, mitjançant una reacció LR, al *destination vector* pEarleyGate101, donant lloc als vectors d'expressió en planta *AtCuAO1-YFP* i *AtCuAO2-YFP*. Mentre que, *AtCuAO3* amb codó de STOP, es va transferir al *destination vector* pEarleyGate104, donant lloc al vector d'expressió en planta *YFP-AtCuAO3*. En els plasmidis per expressió en tabac tot això està flanquejat per dos còpies del promotor del virus del mosaic de la coliflor (2x35S) i un terminador *Nos* (NOST) (Figura M.4).

Per a la producció de proteïnes recombinants en fulla de tabac i posterior purificació, les seqüències codificants d'*AtCuAO1*, *AtCuAO2* i *AtCuAO3*, sense codó de STOP, van ser transferides independentment al *destination vector* pC-TAPa mitjançant un reacció LR. D'aquesta manera es van obtenir les construccions AtCuAO1-TAP, AtCuAO2-TAP i AtCuAO3-TAP. Aquests tres plàsmids contenen les regions codificants d'*AtCuAO1*, *AtCuAO2* i *AtCuAO3* fusionades a un *tag* TAP (tandem affinity purification), en el seu extrem C-terminal, que conté dos còpies de la regió d'unió a immunoglobulina de la proteïna A de *Staphylococcus aureus* (2xIgG-BD), una diana per a l'escissió per la proteasa 3C del rinovirus humà (3C), una cua de 6 histidines (6xHIS) i nou epitops myc (9xMYC) (Rubio i col., 2005) (Figura M.4).

Tots els plàsmids generats van ser directament seqüenciats, tal com s'indica en l'apartat 3.8.5.

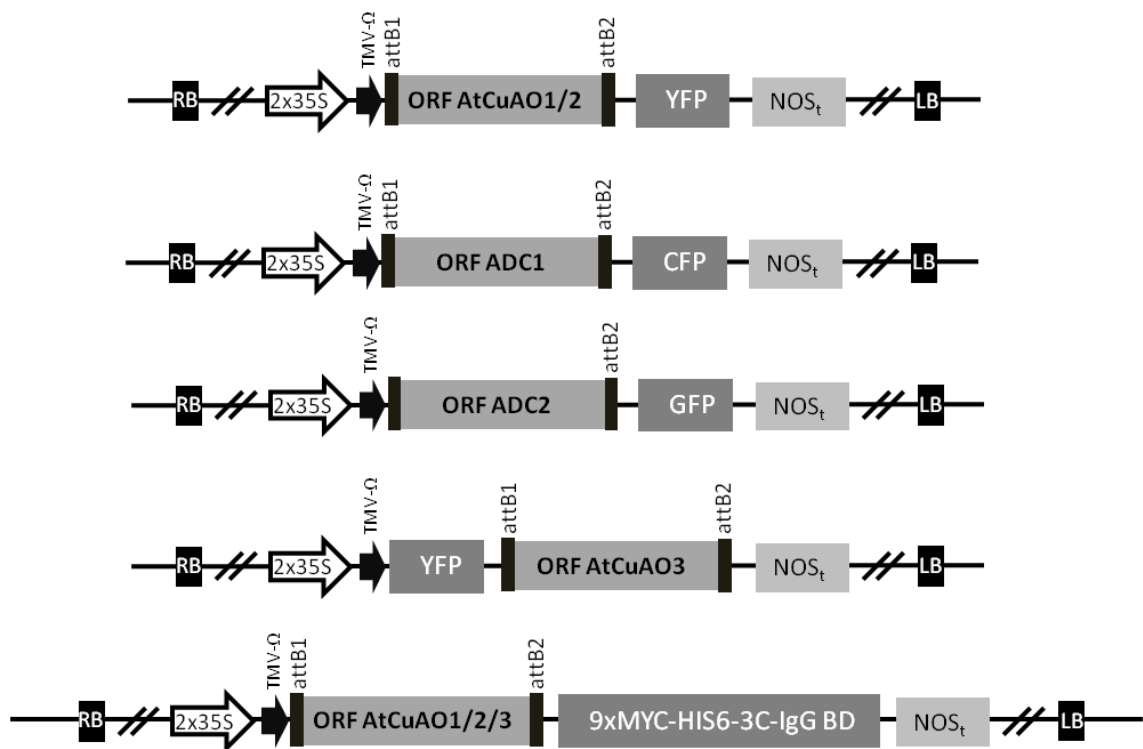


Figura M.4. Vectors per a la producció de proteïnes en planta generats per recombinació Gateway.

3.8.4 Amplificació per PCR

Els fragments de DNA d'interès es van amplificar per PCR (*Polymerase Chain Reaction*), després de posar a punt les condicions òptimes de reacció. Segons la polimerasa utilitzada, els components i concentracions utilitzats en la mescla de reacció van ser els que es mostren a la següent taula:

Taula M5. Mescles de les diferents PRCs utilitzades. ¹Taq™ DNA polymerase (Takara, Japo) va ser utilitzada per a comprovar les condicions de reacció dels primers i l'screening de mutants. ²Crimson Taq™ DNA polymerase (New England Biolabs, Alglaterra) es va utilitzar per la comprovació directa de colònies transformades. ³Pwo SuperYield DNA polymerase (Roche, Suïsa), polimerasa proofreading, va ser utilitzada per amplificar els fragments a clonar en un vector. ⁴La composició del tampó varia segons el fabricant.

Component	Mescla de reacció		
	Taq™ DNA polymerase ¹	Crimson Taq™ DNA polymerase ²	Pwo SuperYield DNA polymerase ³
DNA motlle	100 ng	-	100 ng
Tampó ⁴	2,5 µl (10x, no MgCl ₂)	10 µl (5x)	5 µl (10x)
dNTPS 10 mM	2 µl	4 µl	4 µl
MgCl ₂ 25 mM	2 – 4 mM	-	2,5 – 5 mM
Primer FW 10 µM	1 µl	2 µl	2 µl
Primer RV 10 µM	1 µl	2 µl	2 µl
DNA polimerasa	0,25 µl	0,25 µl	0,5 µl
H ₂ O mQ	qsp. 25 µl	qsp. 50 µl	qsp. 50 µl

Les temperatures i cicles més utilitzats en la PCR van ser: una desnaturalització inicial de 5 min a 94°C, seguit de 25-40 cicles (5-15 seg 94°C, 20-60 seg 45-60°C, 1 min/Kb 68-72°C) i una extensió final de 8-10 min a 72°C.

Els productes amplificats per PCR es van visualitzar en gels d'agarosa al 0,8% amb 0,4 mg/ml de bromur d'etidi.

3.8.5 Seqüenciació del DNA

Per la seqüenciació de les construccions es va utilitzar el kit “BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing” (Applied Biosystems). La mescla de la reacció contenia: 100-200 ng de DNA, 4 µl de mescla de la reacció de seqüenciació *Terminator Ready Reaction Mix*, 0,32 µl d'encebador 10 µM i aigua mQ qsp. 10 µl.

Les condicions de PCR van ser les indicades pel fabricant: 95°C, 5 min; 30 cicles (95°C 15 seg, 50°C, 4 min). La seqüenciació es va dur a terme en la Unitat de Genòmica dels SCT (Serveis Científicotècnics) de la UB o be en el Servei de seqüenciació del CRAG.

3.8.6 Purificació de fragments de DNA

Els fragments de DNA a purificar es van separar en gels d'agarosa al 0,8% amb bromur d'etidi (0,4 mg/ml), i es van visualitzar a l'UV amb una longitud d'ona de 360 nm. Els fragments d'interès es van escindir del gel, i el DNA es va extreure de la matriu d'agarosa mitjançant l'ús de columnes comercials "Qiaquick® gel DNA extraction" (Qiagen, Anglaterra), seguint les especificacions del fabricant.

3.8.7 Extracció de RNA del teixit vegetal

El material vegetal (50-200 mg), prèviament polvoritzat amb nitrogen líquid, es va homogeneïtzar amb 1 ml de Trizol (Sigma) amb l'ajuda d'un Tissuelysser (Qiagen, Anglaterra). A continuació, es va realitzar un rentat dels productes lipòfils amb 200 µl de cloroform agitant vigorosament la mostra, deixant reposar 5 minuts en gel, i centrifugant a 12.000 g durant 15 min a 4°C. A la fase aquosa recuperada s'hi van addicionar 500 µl d'isopropanol, es va incubar 5 min a T^a ambient i, després de centrifugar a 12.000 g 10 min a 4°C, es va descartar el sobrenedant, i el sediment de RNA es va rentar amb etanol 75% en aigua lliure de RNases. Després de tornar a centrifugar es va resuspendre en 100 µl d'aigua lliure de RNases.

La integritat del RNA es va comprovar visualment en gels de bromur d'etidi (0.4 mg/ml) al 3% d'agarosa, i la quantitat i puresa es van determinar mitjançant lectura espectrofotomètrica de la seva absorbància a longituds d'ona de 260, 280 i 230 nm. Una unitat d'absorbància a 260 nm correspon aproximadament a 40 µg/ml de RNA, que es considera d'elevada puresa quan la relació A_{260}/A_{280} és propera a 2 i la relació A_{260}/A_{230} superior o igual a 2. L'ARN extret es va mantenir a -80°C fins al moment de la seva utilització.

3.8.8 Obtenció de cDNA

El cDNA es va obtenir a partir de RNA total, utilitzant el kit de retrotranscripció “SuperScriptIII®” d’Invitrogen i seguint les especificacions dels fabricant. El RNA total (5 µg) es va tractar amb 1 µl de DNAsa (Turbo DNase kit AMBION) durant 30 min a 37°C. Posteriorment, es va inactivar la DNAsa afegint 5 µl de reactiu d’inactivació i incubant 5 min a T^a ambient. El RNA, lliure de DNA, es va purificar centrifugant 5 min a 10.000 g i 4 °C. El sobrenedant es va separar en un nou tub, i es va utilitzar 1 µl per comprovar l’absència de DNA genòmic mitjançant una PCR amb uns encebadors sobre introns i visualitzant el producte de la PCR en un gel d’agarosa al 0,8%. A 2,5 µg d’RNA (12,5 µl) tractats amb DNAsa, s’hi van afegir els dNTPs (1 µl de solució 10 mM), oligo dT (0,5 µl) i hexàmers degenerats (0,5 µl), es va incubar a 65°C durant 5 min, es va posar en gel 1 min, i es va centrifugar breument. Després del procés de desnaturalització, es van addicionar la resta dels components de la mescla de la reacció de retrotranscripció (2,5 µl de tampó de retrotranscripció10x, 5 µl MgCl₂, 1 µl DTT, 0,5 µl inhibidor de RNAsa, 0,5 µl transcriptasa reversa), i es va dur a terme la reacció seguint les especificacions del fabricant (50°C 60 min, 70°C 10 min). El cDNA obtingut es va diluir 1:10 i es va mantenir a -80°C fins el moment de la seva utilització.

3.8.9 RT-PCR quantitativa

Per a la reacció de RT-PCR quantitativa es va utilitzar el kit SYBR Green I Master mix (Roche Applied Science, Germany), en un aparell de RT-PCR quantitativa Light Cycler 480 (Roche).

La mescla de reacció contenia: 5 µl de SYBR green PCR Master mix, 0,2 µl d’una solució 10 µM de cada un dels encebadors (directe i revers), 2 µl de cDNA, o RNA per a realitzar el control, i aigua ultrapura (SIGMA) q.s.p 10 µl. Les reaccions es van dur a terme en una placa de 96 pous. Totes les reaccions de PRC a temps real es varen fer per quadruplicat. Les condicions de PCR van ser 50°C – 2 min, 95°C – 10 min, 45x [95°C – 15 seg, 60°C – 1 min].

El número de còpies de mRNA presents en cada mostra es va quantificar a partir de corbes de calibratge, realitzades amb dilucions progressives de cDNA motlle per cada una de les parelles d’encebadors utilitzats. L’expressió de cada gen es va normalitzar

respecte al valor obtingut per *Actina2*, que va ser el gen utilitzat com a control intern (Alcázar i col., 2005).

3.9 Producció i anàlisi de proteïnes

3.9.1 Producció de proteïnes de fusió en *N.benthamiana*

Per a la producció de les proteïnes de fusió d'interès, ja sigui per la seva purificació i el posterior anàlisi funcional, o bé per a estudis de localització subcel·lular, es va realitzar una transformació transitòria en fulles de *N. benthamiana* mitjançant agroinfiltració amb *A. tumefaciens* EHA105, portador de les construccions d'interès: AtCuAO1-TAP, AtCuAO2-TAP i AtCuAO3-TAP, per l'estudi funcional de les corresponents CuAOs; o ADC1-, ADC2-, AtCuAO1-YFP, AtCuAO2-YFP i YFP-AtCuAO3, per la localització subcel·lular de les corresponents proteïnes. Per això, una colònia de l'*Agrobacterium* transformat es va inocular en 5 ml de medi YEB, amb els corresponents antibiòtics, i es va incubar o/n a 28°C en agitació (200 rpm). Després, un inòcul de 100 µl del cultiu anterior es va diluir en 20 ml del mateix medi i es va incubar en les mateixes condicions. El cultiu bacterià obtingut es va centrifugar a 8000 rpm durant 20 minuts a T^a ambient, es va descartar el sobrenedant i es va resuspendre el pellet amb tampó d'agroinfiltració (10 mM MES pH 5.7, ajustat amb KOH 1 mM, MgCl₂ 10 mM i Acetosiringona 200 µM) fins a obtenir una DO₆₀₀ de 0.5. Paral·lelament es va realitzar el mateix procés per un cultiu d'*Agrobacterium* transformat amb un plasmidi portador d'un gen que codifica per la proteïna inhibidora del silenciament HC-Pro (Goytia i col., 2006). Els cultius bacterians resuspendes en tampó d'agroinfiltració es van deixar 3-5 hores a T^a ambient i, passat aquest temps, es va fer una mescla 1:1 d'*Agrobacterium* transformat amb la construcció d'interès i *Agrobacterium* portador de HC-Pro, amb la que es va infiltrar el revers de fulles joves de *N. benthamiana* de 2-4 setmanes d'edat mitjançant una xeringa d'1 ml sense agulla. Les plantes es van deixar al hivernacle i, 4 dies després, es va procedir a prendre mostra de les zones agroinfiltrades per purificar les proteïnes recombinants de fusió (apartat 3.9.2) o per als estudis de localització de les proteïnes (apartat 3.9.5). En el primer cas les mostres es van congelar en nitrogen líquid, es van polvoritzar, i es van guardar a -80°C fins a el moment del seu

ús; mentre que les mostres per localització es van analitzar immediatament una vegada recol·lectades, tal com es descriu en l'apartat 3.9.5.

3.9.2 Purificació de les proteïnes recombinants AtCuAO1, AtCuAO2 i AtCuAO3 fusionades a TAP.

Per a l'extracció de proteïnes i posterior purificació es van utilitzar les mostres de *N.benthamiana* recollides com s'indica en el apartat anterior, i es va procedir tal com descriuen Rubio i col. (2005) amb algunes modificacions. El material polvoritzat amb nitrogen líquid es va homogeneïtzar amb un volum igual de tampó d'extracció que contenia: Tris-HCl 100 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, 10% glicerol, 0.1% Tritó X-100, PMSF 1mM i 1x cocktail complet d'inhibidor de proteases (Sigma, Estats Units). Els homogeneïtzats es varen filtrar a través de quatre capes d'una membrana de nylon i es varen centrifugar a 14000 g durant 10 min a 4°C. La concentració de proteïnes del sobrenedant es va determinar mitjançant un assaig Bradford (Bio-Rad, Estats Units). Per purificar les proteïnes d'interès fusionades al TAP, l'extracte total de proteïnes es va incubar amb una resina "IgG Sepharose 6 Fast Flow beads" (Amersham Biosciences, Uppsala, Suècia) durant 2 h a 4°C amb un moviment rotatori suau. Després de centrifugar a 150 g durant 3 min a 4°C, es va recuperar la resina, en la que havien quedat retingudes les proteïnes de fusió mitjançant la regió d'unió a immunoglobulina de la proteïna A de *Staphylococcus aureus* (2xIgG-BD) inclosa en el TAP, i es va rentar tres vegades amb 10 ml de tampó de rentat (tampó d'extracció més NaCl 350 mM). Per eluir les proteïnes d'interès, es va incubar la resina amb 12 µl (50 units) de 3C protease (Precision protease; Amersham Biosciences), dissolta en 5 ml de tampó de rentat, a 4°C amb una rotació suau durant tota la nit. El sobrenedant, recuperat després de centrifugar a 150 g durant 3 min a 4°C, es va guardar, i es va fer un segon rentat de la resina en les mateixes condicions. Es van combinar els dos sobrenedants obtinguts i es van concentrar amb l'ajuda de tubs "Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter" (Millipore Corporation, Estats Units). Aquests sobrenadants, contenien les proteïnes AtCuAO fusionades a un tag de 6xHIS i 9xMYC, ja que les regions 2xIgG-BD i 3C del TAP s'eliminen durant el procés de purificació (Figura M.5). Les proteïnes de fusió purificades es van analitzar per western blot amb anticossos anti-myc (veure apartat 3.9.3).

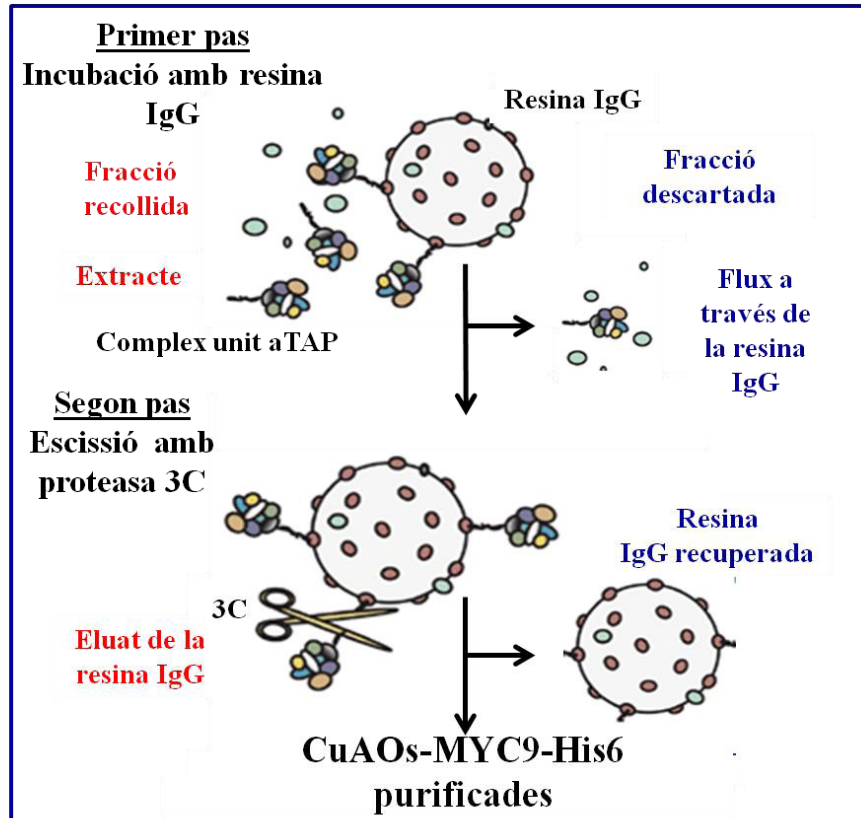


Figura M.5. Representació esquemàtica de la purificació de les proteïnes fusionades a TAP. Primer pas: incubació de l'extracte proteic amb la resina IgG. Segon pas: escissió de les proteïnes unides a TAP amb la proteasa 3C i posterior elució.

3.9.3 Anàlisi immunològic de les proteïnes

Els extractes de proteïnes totals i els purificats per cromatografia d'afinitat, obtinguts com es descriu en el apartat anterior, es van fraccionar per electroforesi en gels d'acrilamida en presència de dodecil sulfat sòdic (SDS-PAGE). Es van utilitzar concentracions d'acrilamida (Bio-Rad) del 8% en el gel separador i del 4% al gel concentrador. La composició d'aquests gels va ser la següent:

Gel separador: 5 ml Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 8 ml Acrilamida 30% Bio-Rad, 0,2 ml SDS 10%, 6,8 ml aigua mQ, 13,3 µl TEMED, 100 µl APS (persulfat d'amoni) 10%.

Gel concentrador: 1,26 ml Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 660 µl Acrilamida 30% Bio-Rad, 50 µl SDS 10%, 3 ml aigua mQ, 5 µl TEMED, 25 µl APS 10%.

L'electroforesi es va desenvolupar en una cubeta vertical Mini-Protean® (Bio-Rad) a 100 V, en presència d'un tampó que contenia Tris 25mM, glicina 190 mM, SDS 1% (p/v), pH 8,3.

Una vegada finalitzada l'electroforesi, les proteïnes es van transferir del gel a una membrana de nitrocel·lulosa (Amersham Biosciences) utilitzant una cubeta Mini trans-blot (Bio-Rad). El gel i la membrana es van equilibrar durant 30 min en tampó de transferència (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% (v/v), pH 8,3) per eliminar els components que poguessin interferir en la transferència, que es va fer a 4°C o/n a 15 V.

Un cop feta la transferència, es va bloquejar la membrana de nitrocel·lulosa amb una solució de TBS, que contenia 0,5 % Tween i 5% de llet desnatada en pols (solució de bloqueig), durant una hora a T^a ambient. A continuació es va incubar la membrana, durant tota una nit a 4°C, amb una dilució 1:5000 de l'anticòs primari Anti-Myc (GenScript) en la solució bloqueig. Es va rentar la membrana 3 vegades, durant 5 min, amb tampó TBS-tween (0,5% Tween en TBS 1X), i es va incubar amb l'anticòs secundari (anticòs contra anticòs de conill), diluït 1:5000 amb la solució de bloqueig, durant 1h. Passat aquest temps, es va rentar la membrana 4 vegades, durant 5 min, amb 5 ml de la solució TBS-tween, i es va deixar la membrana en aquesta solució fins al moment del revelat.

Per al revelat de la membrana, es va eliminar l'excés de TBS posant-la en contacte per la part posterior amb paper de filtre durant un segon. Tot seguit, es va mullar la membrana amb 2 ml de la solució ECL, preparada al moment barrejant: Pre-ECL A (luminol 2,5 mM, àcid p-cumaric 396 nM i Tris-HCl 100 mM pH8.5) i Pre-ECL B (H₂O₂ 5,6 mM i Tris-HCl 100 mM pH8.5, a 4°C). Es va col·locar dins d'una bossa de plàstic i es va visualitzar la quimioluminescència amb l'aparell "LAS-3000 luminescent image analyser" (Fujifilm, Tokio, Japó) a diferents temps (normalment entre pocs segons i 30 min). Cal considerar que el substrat quimioluminescent de la peroxidasa, present en la solució de detecció, té una estabilitat al voltant d'una hora.

3.9.4 Activitat enzimàtica de les proteïnes purificades

L'activitat core aminooxidasa de les proteïnes de fusió recombinants (AtCuAO1-MYC9-His6, AtCuAO2-MYC9-His6, AtCuAO3-MYC9-His6) es va determinar

mesurant la formació de H_2O_2 per fluorescència, fent servir el kit per a la detecció de peròxid d'hidrogen “Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit” (Invitrogen Life Technologies). Per això, les proteïnes de fusió purificades (1 μ g), o el mateix volum de tampó d'elució com a control, es varen incubar amb el substrat (10 mM de Put, Spd o Spm), reactiu Amplex Red 50 μ M, i 0,1 U ml^{-1} de peroxidasa de rave picant, en un tampó Tris-HCl 100 mM (pH 8.0), a 37°C durant 1 h. La fluorescència relativa es va mesurar a 540 nm d'excitació i 590 nm d'emissió amb un fluorímetre “SpectraMax M3 Multi-Mode Microplate Reader” (Molecular Devices), fent servir plaques de color negre de 96 pous (Costar, Corning Incorporated, Estats Units). La correcció, per tal d'eliminar la fluorescència de fons, es va fer restant els valors del medi de reacció sense el substrat. Per comprovar que l'enzim era una coure-aminooxidasa, es va determinar l'activitat enzimàtica en presència d'aminoguanidina (AG) 5 mM, un inhibidor competitiu irreversible de les amino oxidases, o de 8-hydroxyquinolina (8 HQL) 30 μ M, un agent quelant de coure. Per això, es varen realitzar pretractaments amb els inhibidors, durant 5 min a 30°C, abans d'afegir els substrats i determinar l'activitat tal com s'ha descrit anteriorment. Els valors es presenten com a fluorescència relativa.

3.9.5 Localització de proteïnes

Quatre dies després de l'agroinfiltració es va comprovar l'èxit de l'expressió de les proteïnes de fusió a marcadors fluorescents analitzant la fluorescència de les fulles amb la Lupa LEICA MS FLIII, a una longitud d'ona d'excitació de entre 460-495 nm, i visualitzant amb un filtre que permetia el pas de llum a partir de 510 nm.

Tots els experiments de localització es varen realitzar amb un microscopi confocal Olympus FV1000 (Olympus, Japó) amb un objectiu d'immersió en aigua de 63x. Totes les imatges es varen prendre d'una sola secció òptica, i es varen analitzar i sobreposar amb els respectius controls de localització utilitzant el programa “FV1000 Viewer Ver.03.1” (Olympus).

Les fulles de tabac agroinfiltrades amb l'*Agrobacterium* que contenia la construcció ADC1-CFP es varen tenyir amb una solució de DAPI (5 μ g/ml), un colorant que permet visualitzar els nuclis, abans d'observar-les sota el microscopi confocal a una longitud d'ona d'excitació de 405 nm i 405 nm, i amb un filtre per a l'emissió de 461-511 nm i

476-516 nm per a la CFP i el DAPI, respectivament. Les fulles de tabac agroinfiltrades amb l'*Agrobacterium* que contenia la construcció ADC2-GFP es varen observar directament sota el microscopi confocal a una longitud d'ona d'excitació de 488 nm i amb un filtre per a l'emissió de 500-575 nm per a la GFP, i de 620-680 nm per a la clorofil·la, que es va utilitzar com a marcador de cloroplasts.

Agrobacterium que contenen la construcció AtCuAO1-YFP es varen agroinfiltrar juntament amb *Agrobacterium* que contenen la construcció SPG-DsRed (SPG es una proteïna de secreció). Aquestes fulles es van observar amb una longitud d'ona de 515 nm per a la YFP i de 559 nm per a la DsRed, i un filtre per a l'emissió de 527-543 nm per a la YFP i de 581-681 nm per a la DsRed.

Els *Agrobacterium* que contenen les construccions AtCuAO2-YFP i YFP-AtCuAO3 es varen agroinfiltrar cadascun, juntament amb *Agrobacterium* que contenen la construcció CFP-SKL (un marcador de localització a peroxisomes). Aquestes fulles es van observar amb una longitud d'ona de 515 nm per a la YFP i de 405 nm per a la CFP, i un filtre per a l'emissió de 527-627 nm per a la YFP i de 476-516 nm per a la CFP.

4 Resultats

4 Resultats

4.1 Estudi de la possible funció protectora de la Put en resposta al estrès per fred

En treballs previs s'havia vist que els mutants d'inserció de T-DNA per als gens *ADC1* i *ADC2* d'*Arabidopsis* (*adc1* i *adc2*), que presentaven nivells de Put reduïts en comparació a les plantes de tipus silvestre, eren més sensibles a fred que aquestes (Cuevas i col., 2008), el que va portar a pensar que la Put podria tenir una funció protectora en l'estrès per fred. Una bona estratègia per a comprovar aquesta hipòtesi seria estudiar la tolerància a fred de plantes que acumulessin Put. Per això, en aquest treball es van fer servir plantes sobreexpressores d'*ADC2* caracteritzades prèviament (Alcázar i col., 2005) i plantes portadores del gen *ADC1* que han estat caracteritzades en aquest treball.

4.1.1 Caracterització de línies transgèniques 35S::*ADC1*

En treballs previs realitzats al nostre grup de recerca, per transformació amb *A. tumefaciens*, s'havien obtingut plantes transgèniques d'*A. thaliana* portadores del gen homòleg *ADC1*, sota el control del promotor constitutiu CaMV35S. En el moment d'iniciar aquest treball, disposàvem de 11 línies transgèniques (generació F2). Mitjançant autopollinització i estudis de segregació en un medi amb kanamicina, com a antibiòtic de selecció, es va determinar que 4 d'aquestes línies transgèniques tenien una única inserció de T-DNA (I6, I7, I9, I11), ja que varen resultar tenir una segregació 3:1, resistents:sensibles a kanamicina. Per cada una d'aquestes línies es van seleccionar plantes homozigotes. Per això, es van fer germinar 12 individus de cada línia transgènica (F2) en un medi amb kanamicina i es van seleccionar els que presentaven un percentatge de germinació del 100% en aquest medi.

En aquestes línies, es van determinar, mitjançant RT-PCR quantitativa, els nivells d'expressió del gen *ADC1* relatiu a la expressió d'*actina 2*, que es va utilitzar com a control intern (Figura R.1). Les 4 línies homozigotes (I6.6, I7.8, I9.4, I11.10) van resultar tenir uns nivells d'expressió d'*ADC1* superiors als de les plantes de tipus silvestres. Tal com es veu en la Figura R.1, la línia I9.4 era la que tenia uns majors nivells de transcrit, essent aquests 10 vegades superiors als del control (WT). En les línies I11.10 i I7.8, aquests nivells van ser, 6 i 7 vegades, respectivament, més alts que

en les plantes de tipus silvestres, mentre que en la línia I6.6 el nivell d'expressió d'*ADC1* només va augmentar 1,7 vegades en relació al control.

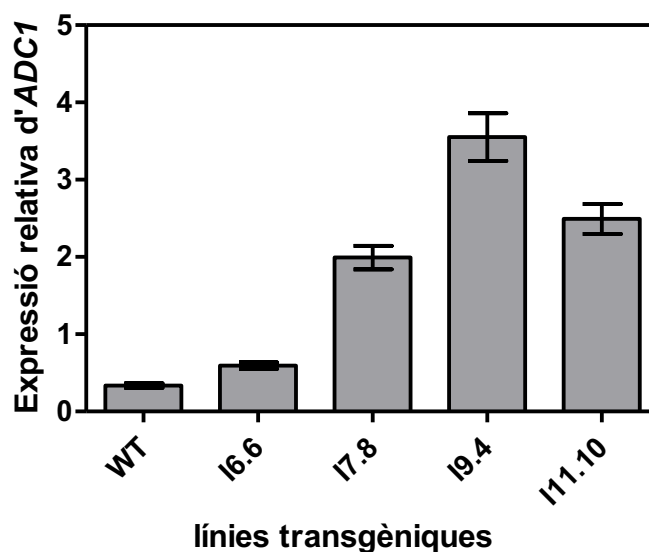


Figura R.1. Nivells d'expressió d'*ADC1* en les les plantes transgèniques *35S::ADC1*. Els nivells de transcrits es van determinar per RT-PCR quantitativa amb primers específics per *ADC1* i es van relativitzar als de l'*actina 2* en cada cas.

En les 4 línies homozigotes sobreexpresores d'*ADC1* es van quantificar els nivells de PAs. Com es pot observar a la Figura R.2, en les línies I7.8, I9.4 i I11.10, els nivells de Put van ser significativament superiors que en les plantes control no transformades (WT). Els nivells més alts de Put es van detectar en la línia I9.4, que era la que presentava els nivells més alts de transcrit *ADC1*. En aquesta línia el contingut de Put va ser 6 vegades superior al control, mentre que en les línies I11.10 i I7.8 l'increment va ser de 4 i 3 vegades, respectivament, en relació a les plantes de tipus silvestre. L'augment de Put no es va traduir en increment de Spd ni Spm en ninguna de les 3 línies transgèniques, ja que, com s'observa a la Figura R.2, els nivells de Spd en aquestes línies van ser similars als de les plantes control, i els nivells de Spm lleugerament menors. Resultats similars s'havien observat en les plantes sobreexpresores d'*ADC2* (Alcázar i col., 2005) i en cultius cel·lulars de pollancre transformats amb *ODC* de ratolí (Bhatnagar i col., 2002), el que indicaria que els nivells cel·lulars de Spd i Spm estan regulats de manera més estricta que els de Put. La línia transgènica I6.6 presentava una patró de PAs diferent a les altres 3. Com es pot observar en la Figura R.2, els nivells de Put i Spd en aquesta línia van ser lleugerament inferiors que en les plantes de tipus

silvestre, mentre que els nivells de Spm eren 2 vegades superiors, per el que aquesta línia es va descartar per posteriors anàlisis.

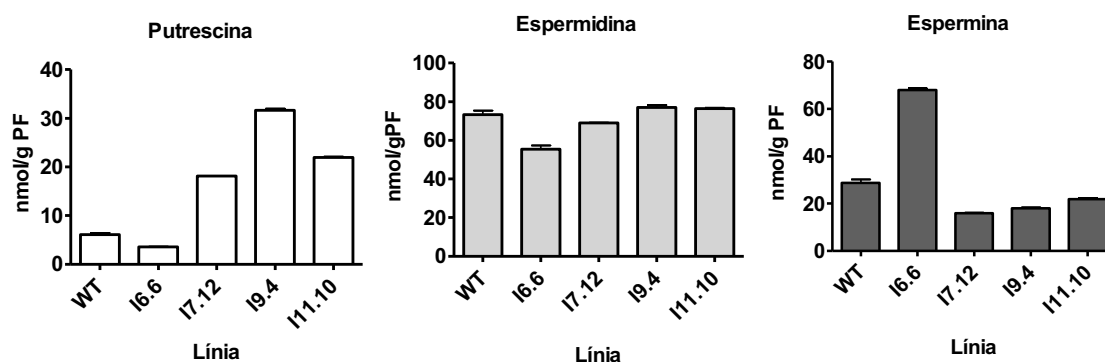


Figura R.2. Nivells de poliamines de les plantes sobreexpressores d'*ADC1* (I6.6, I7.12, I9.4, I11.10) i de plantes control no transformades (WT).

4.1.2 Tolerància a congelació de les plantes transgèniques *35S::ADC1*

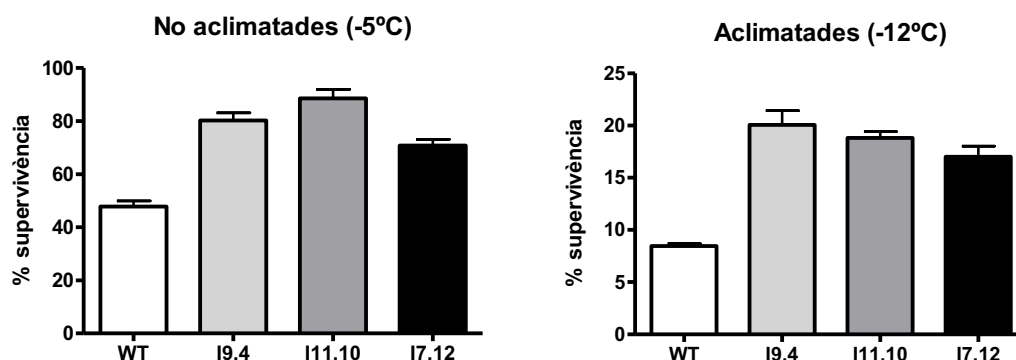
Com s'ha indicat en l'apartat 3.2.2.2 de Materials i Mètodes, l'experiment es va dur a terme utilitzant plantes de 3 setmanes d'edat crescudes en terra, sense i amb aclimatació prèvia (7 dies a 4°C). Les plantes es van exposar durant 6 hores a temperatures de congelació de -12°C o -5°C, segons haguessin estat o no aclimatades, i després de 2 setmanes de recuperació en condicions control es va determinar el percentatge de supervivència.

Com es pot veure, en la Figura R.3.A, les línies transgèniques sobreexpressores d'*ADC1* (I7.8, I9.4 i I11.10) van mostrar un major percentatge de supervivència que les plantes control de tipus silvestre (WT), tan si es tractava de plantes prèviament aclimatades com no. En absència d'aclimatació, les línies transgèniques sobreexpressores d'*ADC1* van sobreviure aproximadament un 30% més que les control, mentre que quan es donava un procés previ d'aclimatació, aquesta diferencia arribava al 50%. Les diferències entre les tres línies van ser petites, essent la línia I7.12, que era la que acumulava menys Put, la que va presentar un menor percentatge de supervivència, tot i ser aquest clarament superior al de les plantes control.

Aquests resultats estan d'acord amb els obtinguts prèviament amb mutants d'inserció de T-DNA per al gen *ADC1*, els quals eren més sensibles a congelació que les

plantes control, tan si havien estat prèviament aclimatats com si no (Cuevas i col., 2008), i posen de manifest que la Put té un paper protector en la resposta de les plantes a fred, essent aquest paper més important en els casos en que aquestes han estat aclimatades.

A



B



Figura R.3. Resposta a congelació de les plantes transgèniques sobreexpressores d'*ADC1*.

A. Percentatge de supervivència de les plantes control (WT) i sobreexpressores d'*ADC1* (19.4, I11.10 i I7.12), exposades a temperatures de -5 °C (no aclimatades) i -12 °C (aclimatades).

B. Aspecte de les plantes sobreexpressores d'*ADC1* (19.4, I11.10 i I7.12) i control (WT) després d'estar sotmeses al procés d'aclimatació i posterior congelació a -12 C°.

4.1.3 Tolerància a congelació de les plantes transgèniques *35S::ADC2*

En treballs anteriors es van caracteritzar, molecular i bioquímicament, quatre línies transgèniques d'*Arabidopsis* (2.1, 3.6, 9.12, 7.2) que presentaven diferents graus d'expressió del gen homòleg *ADC2*. En aquestes línies transgèniques es va observar una correlació lineal entre l'expressió del gen, l'activitat ADC i el contingut de Put (Alcázar i col., 2005). El contingut total de Put a les línies 2.1 i 3.6 va ser 64 i 37 vegades més

gran que a les plantes de tipus silvestre, mentre que les línies 9.12 i 7.2 van mostrar un menor augment, prop de 5 i 2 vegades, respectivament (Figura R.4). Igual que en el cas de les plantes sobreexpressores d'*ADC1*, aquesta acumulació de Put no es va traduir en un increment de Spd o Spm, de manera que aquestes plantes transgèniques constitueixen un material apropiat per estudiar el paper de la Put en la resposta de les plantes a estrès.

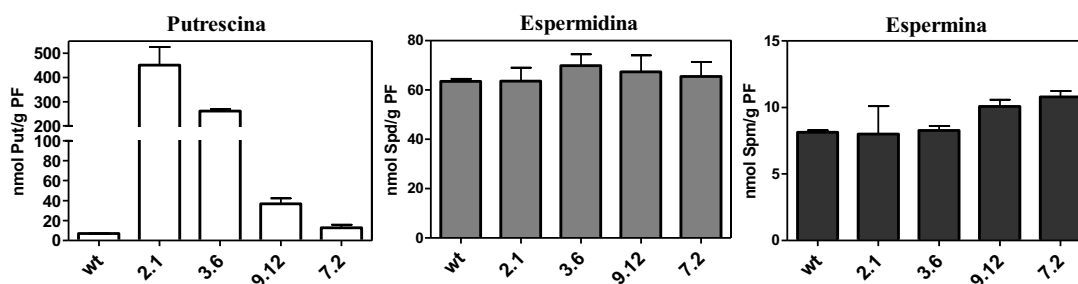


Figura R.4. Nivells de poliamines de les línies *35S::ADC2* i de les plantes de tipus silvestre.

Les plantes transgèniques *35S::ADC2* presentaven diverses alteracions en el desenvolupament (Alcázar i col., 2005), tals com una roseta basal més petita, nanisme i retras en la floració, que eren més marcades amb les línies que acumulaven majors nivells de Put (línies 2.1 i 3.6), mentre que en les línies 9.12 i 7.2 les alteracions fenotípiques, en condicions normals de creixement, eren menys pronunciades. Per aquest motiu es van seleccionar aquestes dues línies per avaluar els efectes de la Put en la tolerància de les plantes a congelació, tal com s'ha indicat en l'apartat anterior.

Com es pot observar a la Figura R.5, el percentatge de supervivència de les 2 línies transgèniques sobreexpressores d'*ADC2* va ser major que el de les plantes control de tipus silvestre (WT) quan les plantes havien estat prèviament aclimatades, i aquesta diferència va ser molt més marcada en les plantes de la línia 9.12 que en les de la línia 7.2. Com es mostra a la Figura R.4, el contingut de Put a les plantes de la línia 9.12 era 5 vegades superior al de les plantes control, mentre que en les plantes de la línia 7.2, només era 2 vegades més alt que en el control. En el cas de les plantes no aclimatades, només s'observà un lleuger increment d'un 10% de supervivència en la línia 9.12, mentre que els valors de la línia 7.2 són molt similars als de les plantes de tipus silvestre.

Aquests resultats indiquen que l'acumulació de Put, com a conseqüència de la sobreexpressió d'*ADC2*, incrementa la tolerància a congelació de plantes d'*Arabidopsis* exposades prèviament a un període d'aclimatació, i estan d'acord amb els obtinguts prèviament amb mutants d'inserció de T-DNA per al gen *ADC2*, els quals eren més sensibles a congelació que les plantes de tipus silvestre si havien estat prèviament aclimatats (Cuevas i col., 2008).

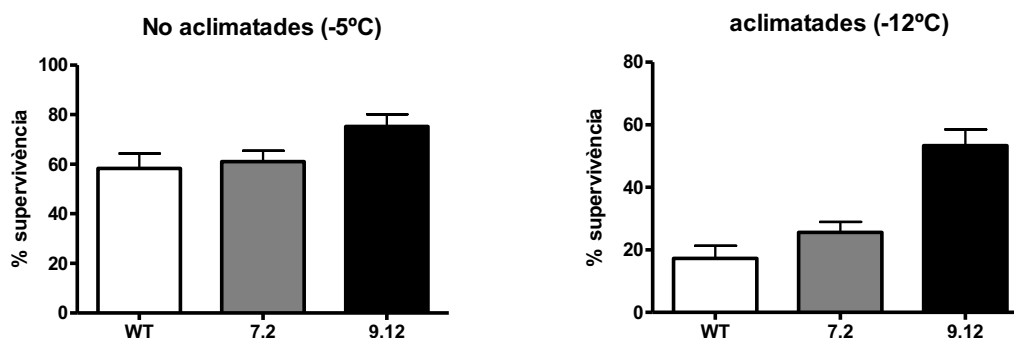


Figura R.5. Percentatge de supervivència de les plantes control (WT) i sobreexpressores d'*ADC2* (línies 7.2 i 9.12), exposades a temperatures de -5 °C (no aclimatades) i -12 °C (aclimatades).

4.2 Anàlisi de la tolerància a deshidratació

Com s'ha dit en l'apartat 4.1, les plantes transgèniques d'*Arabidopsis* sobreexpressores d'*ADC1* i *ADC2* presentaven nivells elevats de Put en comparació a les plantes de tipus silvestre, però mantenien uns nivells de Spd i Spm semblants al control (WT), i per tan eren un material adequat per a l'estudi de la funció de la Put en la resposta de les plantes a deshidratació.

4.2.1 Tolerància a deshidratació de les plantes sobreexpressores d'*ADC1* i *ADC2*.

Es va analitzar la tolerància a estrès per deshidratació de les plantes *35S::ADC2* (2.1, 3.6, 9.12, 7.2) i *35S::ADC1* (17.12, 19.4 i 11.10) comparada amb la de les plantes de tipus silvestre. Els experiments, tal com s'indica en l'apartat 3.2.2.1 de Materials i Mètodes, es van realitzar amb plantes crescudes en terra sota condicions ambientals controlades. Es van utilitzar plantes de 4 setmanes d'edat crescudes en condicions de dia curt, que es van deixar de regar durant 14 dies. Transcorregut aquest temps, les plantes

de tipus silvestre, totes les línies *35S::ADC1* i la línia *35S::ADC2* 7.2, van mostrar greus símptomes de deshidratació i pèrdua de turgència (Figura R.6).

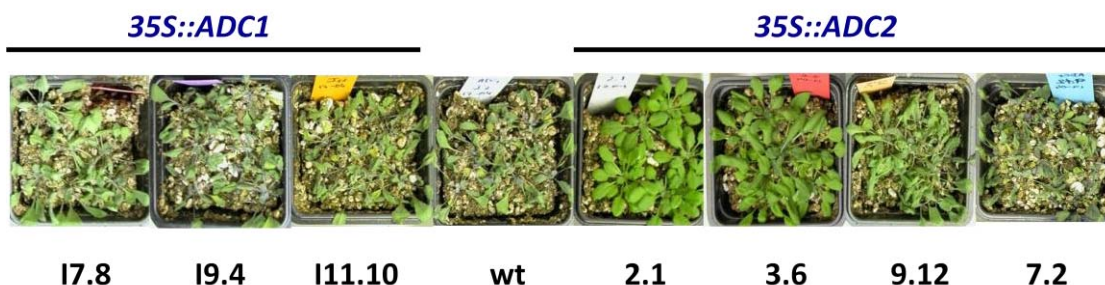


Figura R.6. Aspecte de les línies transgèniques *35S::ADC1*, *35S::ADC2* i plantes de tipus silvestre (WT) després de 14 dies sense regar seguits d'una setmana de reg.

Aquests símptomes van ser lleugerament menors en la línia 9.12 sobreexpressora d'*ADC2*, i pràcticament inapreciables en les línies *35S::ADC2* 3.6 i 2.1, que eren les que presentaven els nivells de Put més elevats de totes les línies transgèniques analitzades (Figura R.2 i Figura R.4). Per quantificar aquesta tolerància es va determinar el nombre de plantes que van seguir creixent després de tornar-les a regar durant els 7 dies següents a la deshidratació, i els valors es van expressar en forma de percentatge de supervivència (Figura R.7). Les dades obtingudes en tres experiments independents, amb un mínim de cinquanta plantes per línia, ens indiquen que les línies transgèniques *35S::ADC2* 2.1 i 3.6 van ser significativament més tolerants a la deshidratació que les plantes de tipus silvestre. Els percentatges de supervivència sota les condicions indicades van ser del 80% en la línia transgènica 2.1, 55% en la línia 3.6, 21% en la línia 9.12 i 16% en la línia 7.2, mentre que només va sobreviure un 12% de les plantes de tipus silvestre. En les plantes *35S::ADC1* el percentatge de supervivència va ser similar al de les plantes de tipus silvestre (Figura R.7).

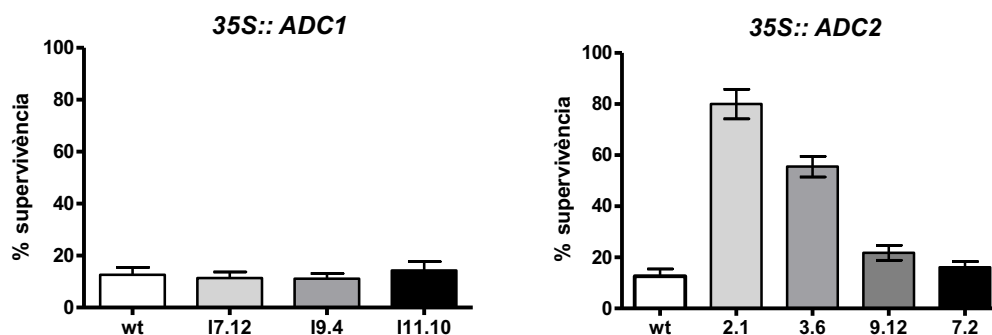


Figura R.7. Percentatge de supervivència de les línies transgèniques *35S::ADC1*, *35S::ADC2* i de les plantes de tipus silvestre després de 14 dies sense regar seguits d'una setmana de reg.

Per assegurar que totes les plantes havien estat exposades al mateix grau de dèficit hídric, es va determinar el contingut gravimètric d'aigua al sòl (SGWC), un paràmetre que serveix per conèixer l'estat hídric del sòl. Com és lògic, i tal com es mostra en la Figura R.8, els valors d'aquest paràmetre van disminuir al llarg del període de deshidratació, sense que s'observessin diferències significatives entre les diferents línies transgèniques i les plantes de tipus silvestre, de manera que al final de l'experiment els valors d'aquest paràmetre eren similars en totes les plantes analitzades, i molt propers a 0. Això indicaria que el contingut d'aigua del substrat es semblant, per el que podem concloure que l'estrès hídric a què van ser sotmeses els diferents tipus de plantes és totalment comparable.

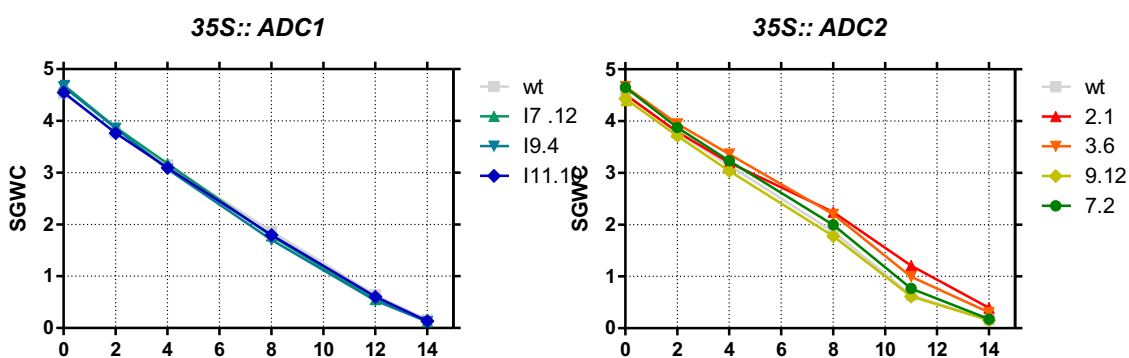


Figura R.8. Contingut gravimètric d'aigua en el sòl (SGWC) dels testos de les línies transgèniques *35S::ADC1* i *35S::ADC2* comparat amb el de les plantes de tipus silvestre (wt).

4.2.2 Efecte de l'aplicació de gibberel·lines en la tolerància a deshidratació de les plantes sobreexpressores d'*ADC2*.

Existeixen diverses publicacions en les que es descriu un increment de la tolerància a diferents tipus de estrès abiòtic en plantes deficientes en gibberel·lines (Achard i col., 2008; Achard i col., 2006). D'altra banda, en treballs previs s'havia observat que les plantes transgèniques *35S::ADC2* presentaven uns nivells de gibberel·lines bioactives (GA_1 i GA_4) menors que les plantes de tipus silvestre (Alcázar i col., 2005). Per tal de comprovar si la resistència a deshidratació observada en les línies transgèniques sobreexpressores d'*ADC2* venia donada pels baixos nivells de gibberel·lines detectats en les mateixes, es va estudiar la tolerància a deshidratació de plantes *35S::ADC2* i tipus silvestre, a les que prèviament se'ls havia aplicat, o no, àcid gibberel·lelic (GA_3) (veure Materials i Mètodes 3.2.2.1). Com es pot veure a la Figura R.9, la supervivència de les plantes control exposades a deshidratació va ser de un 2,5% en les plantes no tractades amb GA_3 , mentre que de les plantes tractades amb GA_3 no en va sobreviure cap. En les línies *35S::ADC2*, la supervivència també es va veure fortament disminuïda per el tractament amb GA_3 , passant, en la línia 3.5, d'un 80%, en les plantes no tractades, a un 30% en les plantes tractades. En el cas de la línia 2.1, la supervivència va ser d'un 90% i un 50%, respectivament, en les plantes no tractades o tractades amb GA_3 . Tot i que la supervivència de les plantes transgèniques *35S::ADC2* es va veure reduïda pel tractament amb GA_3 , aquestes plantes seguien essent més resistents a deshidratació en comparació a les plantes de tipus silvestre (Figura R.9). Aquests resultats indiquen que els baixos nivells de gibberel·lines presents en les línies transgèniques sobreexpressores d'*ADC2* podrien explicar només en part l'elevada tolerància a deshidratació d'aquestes plantes en relació a les de tipus silvestre, però no pot ser la única causa, ja que l'aplicació exògena de l'hormona no aconsegueix revertir el fenotip de resistència als nivells observats en les plantes de tipus silvestre.

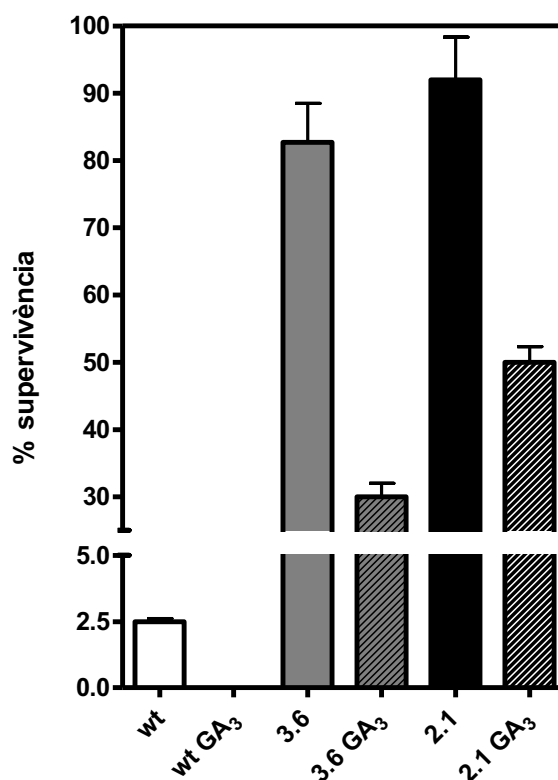


Figura R.9. Tolerància a deshidratació de les línies transgèniques *35S::ADC2* tractades o no amb gibberel·lines. Percentatge de supervivència de les línies transgèniques *35S::ADC2* (3.6 i 2.1) i de les plantes de tipus silvestre (WT) tractades (barres ratllades) o no (barres sense ratllar) amb GA₃, després de dos setmanes de deshidratació i posterior de recuperació.

4.2.3 Contingut d'aigua i potencial de soluts de les línies transgèniques *35S::ADC1* i *35S::ADC2*.

Per examinar quin altre mecanisme fisiològic podia estar implicat en la tolerància a deshidratació observada en les línies transgèniques *35S::ADC2*, es va determinar la pèrdua d'aigua durant l'estrès per deshidratació. Per això, es va calcular el contingut relatiu d'aigua (RWC), un paràmetre que determina l'estat hídric de la planta. Quan l'aigua absorbida per les arrels s'equilibra amb l'aigua perduda per transpiració en les fulles, el RWC té un valor aproximat de 0.9. Després de 14 dies sense regar, el RWC a les plantes de tipus silvestre va disminuir prop d'un 75%, fins a arribar a un valor absolut de 0.2 al final de l'experiment. En totes les línies transgèniques sobreexpressores d'*ADC1* aquest descens va ser similar a l'observat en les plantes de tipus silvestre,

arribant a valors absoluts de RWC al final del període de deshidratació de l'ordre de 0.2. En el cas de les plantes sobreexpresores d'*ADC2*, el descens del RWC en les línies 7.2 i 9.12 va ser lleugerament menor que en les plantes de tipus silvestre. Mentre que en les línies *35S::ADC2* 2.1 i 3.6, que van mostrar els nivells més alts de supervivència (Figura R.7), aquest descens va ser significativament menor: 36% en la línia 3.6 i 15% en la línia 2.1, amb uns valors absoluts finals de RWC de 0,48 i 0,65 respectivament (Figura R.10). Aquestes dades indiquen que en les línies 2.1 i 3.6 l'elevada acumulació de Put per sobreexpressió d'*ADC2* redueix la pèrdua d'aigua en les plantes.

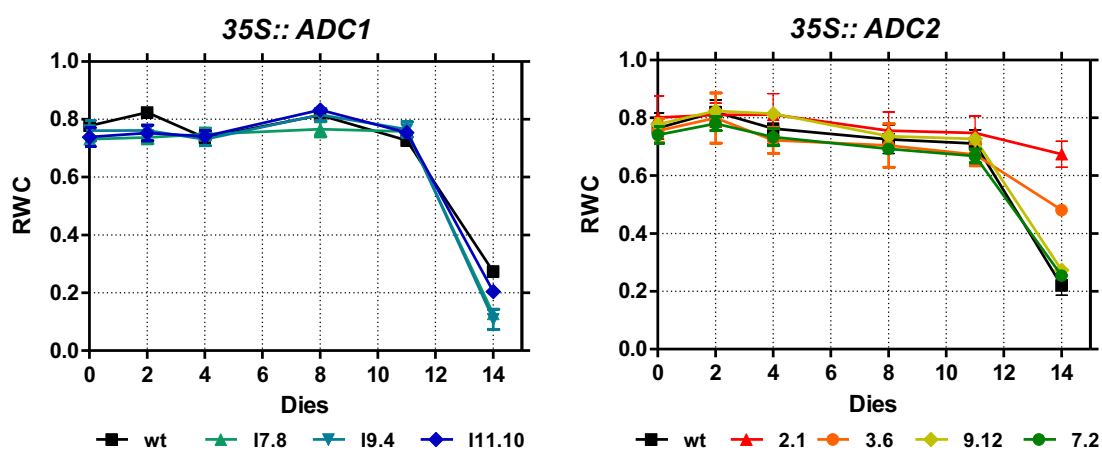


Figura R.10. Contingut relatiu d'aigua (RWC) en les fulles de les línies transgèniques *35S::ADC1* i *35S::ADC2*, i en les plantes de tipus silvestre.

El potencial de soluts (ψ_s) ens indica la concentració de partícules osmòticament actives dissoltes en l'aigua i, convencionalment, es defineix com pressió osmòtica. Un increment net en la concentració de soluts en la cèl·lula indueix un increment en la presa d'aigua i permet mantenir la turgència cel·lular. Per tant, la major retenció d'aigua en les línies *35S::ADC2* 2.1, 3.6 podria ser deguda a un major potencial de soluts. Les poliamines han estat considerades per alguns autors com osmolits (Kaplan i col., 2004). Atès els elevats nivells de Put detectats en les línies transgèniques 2.1 i 3.6, això podria explicar la seva major tolerància a deshidratació. Per comprovar si aquest era el cas, es va determinar el potencial de soluts de les fulles en les plantes transgèniques i de tipus silvestre. Com es pot observar a la Figura R.11 el potencial de soluts era similar en totes les línies transgèniques *35S::ADC2* analitzades, i no presentava diferències

significatives amb el detectat en les plantes de tipus silvestre. En les línies transgèniques *35S::ADC1* el potencial de soluts era similar o menor que en les plantes de tipus silvestre. Aquests resultats indiquen que ni les línies transgèniques sobreexpressores d'*ADC1* ni d'*ADC2* acumulen més soluts que les plantes de tipus silvestre.

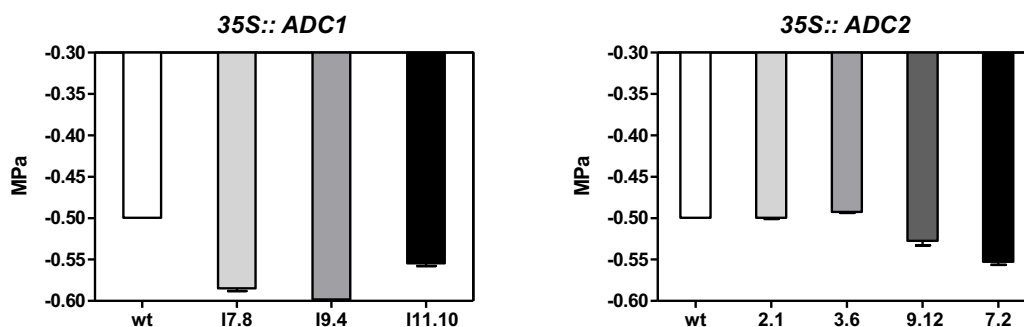


Figura R.11. Potencial de soluts de les línies transgèniques *35S::ADC1* i *35S::ADC2*, i de les plantes de tipus silvestre (WT).

4.2.4 Taxa de transpiració i obertura estomàtica en les línies transgèniques *35S::ADC2*

Atès que la menor pèrdua d'aigua en les línies transgèniques sobreexpressores d'*ADC2* no es va poder explicar en base a una major concentració de soluts, es va decidir estudiar si podia ser deguda a una reducció en la taxa de transpiració. La transpiració és el principal procés responsable de la pèrdua d'aigua a les plantes, i taxes molt elevades de transpiració poden amenaçar la supervivència de la planta, especialment en situacions d'estrès hídric. Gairebé tota l'aigua que es perd per transpiració ho fa pels estomes de les fulles i la tija, per tant una planta alhora d'obrir i tancar les estomes ha d'aconseguir un equilibri entre l'absorció de diòxid de carboni per a la fotosíntesi i la pèrdua d'aigua per transpiració. Per aquest motiu, vam decidir determinar la taxa de transpiració amb un analitzador d'intercanvi de gasos LI-COR en les diferents línies transgèniques *35S::ADC2* i en les plantes de tipus silvestre.

La taxa de transpiració en les línies sobreexpressores 2.1 i 3.6, que eren les que presentaven un RWC més alt, va resultar ser significativament menor que en les plantes de tipus silvestre, un 24% i un 17%, respectivament (Figura R.12), mentre que en les línies 9.12 i 7.2, la taxa de transpiració va ser només lleugerament inferior o igual, respectivament, que en les plantes de tipus silvestre (Figura R.12). Aquestes dades

indiquen que la menor taxa de transpiració en les línies transgèniques *35S::ADC2* que acumulen alts nivells de Put podria ser la causa de la menor pèrdua d'aigua observada en les mateixes.

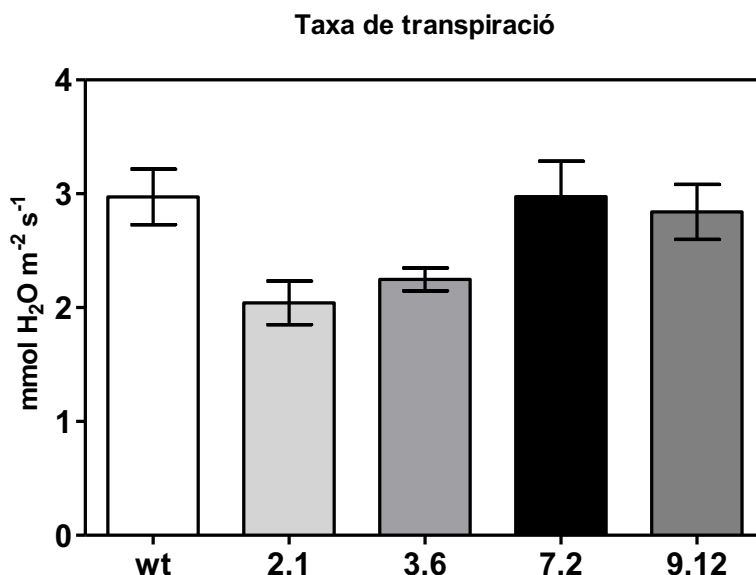


Figura R.12. Taxa de transpiració en les diferents línies transgèniques *35S::ADC2* i en les plantes de tipus silvestre (wt).

Com ja s'ha dit abans, la transpiració es dona principalment a través dels estomes, de manera que un menor nombre d'estomes i/o una menor obertura dels mateixos, es traduiria en una menor transpiració i, conseqüentment, en una menor pèrdua d'aigua. Per determinar si la menor taxa de transpiració observada en les plantes transgèniques era deguda a que presentaven un menor nombre d'estomes i/o una menor obertura d'aquests, es van analitzar aquests paràmetres en les línies transgèniques *35S::ADC2* que presentaven un major grau de tolerància a deshidratació (2.1 i 3.6) i es van comparar amb les plantes de tipus silvestre. El nombre d'estomes es va determinar visualment en l'epidermis del revers de les fulles amb un microscopi Nikon diaphot al qual se li va acoblar una càmera fotogràfica Canon EOS 450D . El nombre d'estomes de les línies sobreexpressores *35S::ADC2* 2.1 i 3.6 va resultar ser igual que el de les plantes de tipus silvestre (Figura R.13.A).

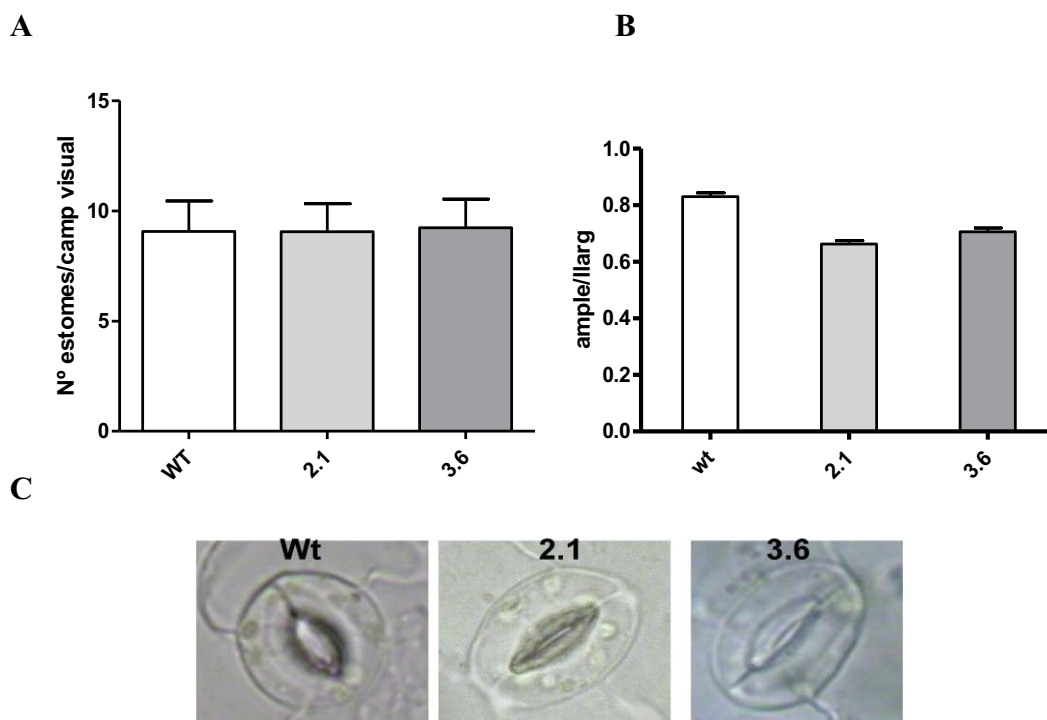


Figura R.13. A. Nombre d'estomes de les línies transgèniques *35S::ADC2* 2.1, 3.6 i de les plantes de tipus silvestre (WT). B. Obertura estomàtica determinada com la relació ample/llarg del porus estomàtic. C. Tres fotografies representatives d'estomes dels diferents tipus de plantes analitzades, tipus silvestre (Wt) i les transgèniques *35S::ADC2* 2.1 i 3.5.

L'obertura estomàtica es va mesurar quan les plantes es trobaven en la meitat del cicle de llum, fent servir el mateix material que per a comptabilitzar el nombre d'estomes i analitzant les fotos amb el programa "Image J 1.41". Com es pot observar en la Figura R.13.B, la obertura estomàtica en les plantes de tipus silvestre va resultar ser un 20% i un 15% superior a la de les línies 2.1 i 3.6, respectivament. La reducció de l'obertura estomàtica en aquestes línies *35S::ADC2* està d'acord amb el major RWC observat en les mateixes sota condicions d'estrès hídric (Figura R.10), i amb la seva major tolerància a deshidratació (Figura R.7).

4.2.5 Nivells de poliamines de les línies transgèniques *35S::ADC2* en resposta a deshidratació.

Com s'ha indicat prèviament, treballs anteriors realitzats al laboratori (Alcázar i col., 2005), i les dades obtingudes en aquest treball (Figura R.4), demostren que, en condicions normals de creixement, les línies *35S::ADC2* tenen nivells de Put superiors a

les plantes de tipus silvestre però no presenten diferències en els nivells de Spd i Spm (Figura R.4). En aquest treball s'han analitzat els nivells de PAs d'aquestes línies sota condicions d'estrès hídric amb l'objectiu de comprovar si la resposta a aquest estrès modificava el perfil de PAs. Per això es van seleccionar les dues línies transgèniques *35S::ADC2* amb uns nivells de PAs més contrastats i una resposta diferent a deshidratació (línies 2.1 i 7.2).

Com s'havia observat en experiments anteriors (Alcázar i col., 2006b), els nivells de Put a les plantes de tipus silvestre i a la línia 7.2 van augmentar durant el període de deshidratació (Figura R.14). No obstant això, aquest augment no va ser suficient per conferir tolerància a deshidratació (Figura R.7). En la línia 2.1, amb uns nivells inicials (abans de l'estrès per deshidratació) de Put 70 vegades superiors que els de les plantes de tipus silvestre, els nivells de la diamina van disminuir durant el període de deshidratació, encara que es van mantenir molt superiors als de les plantes de tipus silvestre i la línia 7.2, entre 16 i 12 vegades, respectivament (Figura R.14). Aquesta disminució de Put observada en la línia transgènica 2.1 no es relaciona amb un augment dels nivells de Spd i/o Spm. Com es pot observar a la Figura R.14, els nivells de Spd i Spm en les plantes de tipus silvestre i les línies transgèniques 7.2 i 2.1 van ser similars al llarg de tot l'experiment, i van decreixer prop de 2.5 i 1.5 vegades, respectivament, durant el període de deshidratació. Aquests resultats indiquen que la tolerància a deshidratació observada en les línies *35S::ADC2* 2.1 i 3.6 és deguda als elevats nivells de Put que acumulen aquestes línies transgèniques.

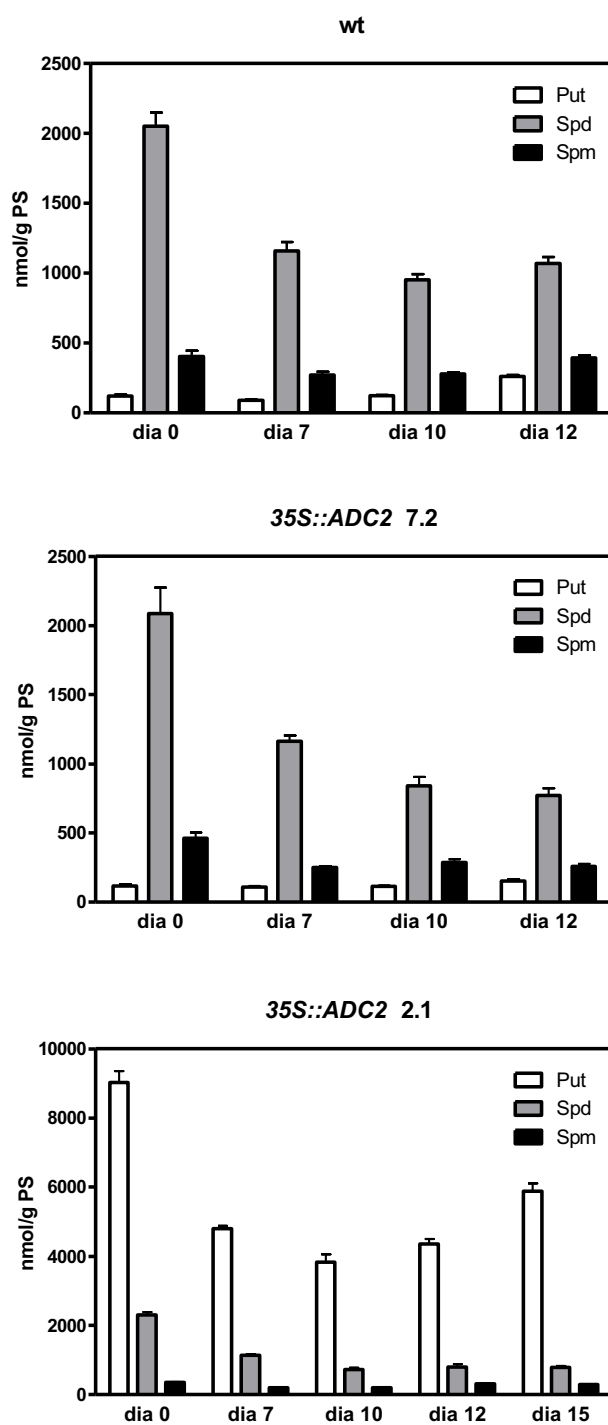


Figura R.14. Nivells de PAs de les línees 35S::ADC2 2.1 i 7.2 en comparació amb les plantes de tipus silvestre al llarg del període de deshidratació.

4.2.6 Nivells d'ABA en les línies transgèniques *35S::ADC2*

L'ABA és una fitohormona que està directament implicada en la regulació de l'obertura estomàtica i, en treballs previs realitzats al laboratori, s'havia vist una possible interrelació ABA-poliamines (Cuevas i col., 2008; Alcázar i col., 2006a). Per tant, es va pensar que les plantes transgèniques *35S::ADC2* podien presentar un nivells d'ABA més elevats que les plantes de tipus silvestre, fet que podria explicar la seva menor obertura estomàtica (Figura R.13) i taxa de transpiració (Figura R.12). Per comprovar aquesta hipòtesi es van determinar els nivells d'ABA en les plantes transgèniques i les plantes de tipus silvestre en condicions normals de creixement. Com es pot observar a la Figura R.15, en plantes crescudes en condicions control, és a dir no sotmeses a estrès hídric, no hi ha diferències significatives en els nivells d'ABA entre les línies transgèniques *35S::ADC2* 2.1 i 3.6, que presentaven menor obertura estomàtica i taxa de transpiració, i les plantes de tipus silvestre o la línia 7.2 .

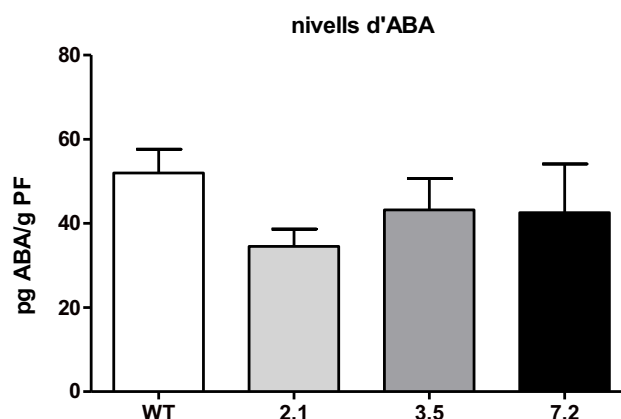


Figura R.15. Nivells d'ABA en plantes de tipus silvestre (WT) i línies transgèniques *35S::ADC2* de quatre setmanes crescudes en condicions de dia curt.

En no observar diferències significatives en els nivells d'ABA entre les plantes de tipus silvestre i les línies transgèniques *35S::ADC2* en condicions normals de creixement, es va pensar que l'increment d'ABA, característic d'un procés de deshidratació, podia ser major i/o produir-se més d'hora durant el procés de deshidratació en les línies transgèniques tolerants a deshidratació (2.1 i 3.6) que en les no tolerants (7.2 i WT). Per això es va decidir analitzar els nivells de l'hormona en plantes de tipus silvestre i en les línies transgèniques 7.2 (no tolerant a deshidratació) i 2.1 (clarament tolerant a deshidratació) al llarg del període de deshidratació . Com es

pot observar a la Figura R.16, durant els primers 7 dies de deshidratació no es van observar diferències significatives en els nivells d'ABA entre els 3 tipus de plantes analitzades. A partir d'aquest moment, els nivells d'ABA en les plantes no tolerants a deshidratació (tipus silvestre i línia 7.2) incrementen de forma molt marcada, aconseguint valors 10 vegades superiors als detectats en condicions normals de creixement (punt 0) després de 12 dies de deshidratació. En la línia 2.1, clarament tolerant a deshidratació, el perfil de la corba d'acumulació d'ABA durant el període d'estrès és similar al observat en les plantes no tolerants, però l'increment d'ABA està endarrerit i només s'observa entre els dies 12 i 15 (Figura R.16). Així doncs, l'increment d'ABA en els diferents tipus de plantes es produeix en el moment en què es manifesta la deshidratació per una disminució del RWC (Figura R.10), el que succeeix més tard en la línia tolerant (2.1) que en les no tolerants (7.2 i WT). Aquests resultats indiquen que la sobreacumulació de Put a les línies transgèniques *35S::ADC2* tolerants a deshidratació no indueix un increment en els nivells d'ABA (Figura R.16) que permeti explicar l'efecte observat en la transpiració i obertura estomàtica (Figura R.12 i Figura R.13).

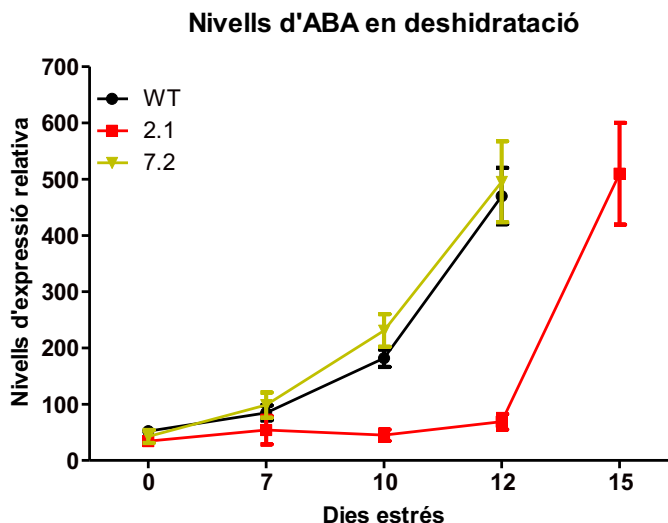


Figura R.16. Nivells d'ABA de les línies transgèniques *35S::ADC2* 2.1, 7.2 i plantes de tipus silvestre (WT) durant el procés de deshidratació.

4.2.7 Tancament estomàtic de les plantes transgèniques 35S::ADC2 en resposta a ABA.

Ja que, com s'ha indicat en l'apartat anterior, no es varen observar diferències en els nivells d'ABA entre les plantes transgèniques tolerants a deshidratació i les plantes de tipus silvestre, es va pensar que la diferent resposta a estrès podia ser deguda a una major sensibilitat a l'hormona de les línies tolerants (2.1 i 3.6). Això implicaria que amb la mateixa, o fins i tot una menor, concentració d'ABA, aquestes plantes tindrien els estomes més tancats, el que explicaria la seva menor transpiració i major tolerància a deshidratació. Per verificar aquesta hipòtesi es va determinar l'obertura estomàtica en resposta a concentracions creixents d'ABA exogen. Com era d'esperar, el grau d'obertura estomàtica, tant en les línies 35S::ADC2 com en la plantes de tipus silvestre, va disminuir a mesura que s'incrementava la concentració d'ABA (Figura R.17). No obstant això, les corbes que relacionen l'obertura estomàtica amb la concentració de l'hormona són pràcticament paral·leles en els 3 tipus de plantes analitzades (Figura R.17), encara que els valors són menors en les dos línies sobreexpressores d'ADC2, el que suggeriria que no hi ha diferències significatives en la resposta a l'ABA entre les plantes de tipus silvestre i les línies transgèniques 35S::ADC2 tolerants a deshidratació. Tanmateix, aquests resultats no es poden considerar concloents, ja que el paràmetre que s'avalua es troba constitutivament alterat (és menor) en les línies transgèniques analitzades, el que fa difícil veure disminucions marcades de l'obertura estomàtica en aquestes línies.

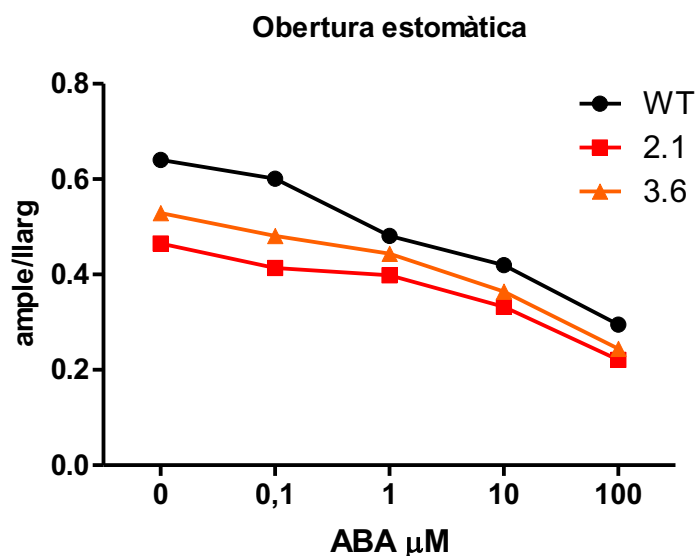


Figura R.17. Obertura estomàtica de les plantes transgèniques *35S::ADC2* 2.1 i 3.6, i de les plantes de tipus silvestre (WT) en presència de diferents concentracions d'ABA.

4.2.8 Obtenció de plantes híbrides *aba2-3* x *35S::ADC2* i estudi de la tolerància a deshidratació

Els mutants de biosíntesi d'ABA, entre els quals hi ha el mutant *aba2-3*, presenten nivells molt baixos de l'hormona, i són extremadament sensibles a deshidratació degut a que els seus estomes es tanquen molt poc a causa dels baixos nivells d'hormona. Per tal de comprovar si les línies transgèniques tolerants a deshidratació (*35S::ADC2* 2.1) podien ser més sensibles a ABA, tal com s'especulava en l'apartat anterior, es va decidir obtenir plantes que presentessin la mutació *aba 2-3* alhora que sobreexpressaven el gen *ADC2*. L'objectiu d'aquest experiment era intentar revertir, si més no parcialment, el fenotip de sensibilitat a deshidratació del mutant *aba 2-3* mitjançant la sobreexpressió d'*ADC2*. Un resultat positiu en aquest experiment, suggeriria una major sensibilitat a ABA de les plantes *35S::ADC2*.

Les plantes híbrides (*aba2-3* x *ADC2* 2.1) es van obtenir pol·linitzant plantes homozigotes *35S::ADC2* 2.1 amb pol·len de les plantes mutants *aba2-3* o viceversa (Figura R.18.A). La presència de la mutació *aba2-3* en aquestes plantes es va comprovar mitjançant selecció amb paclobutrazol, un inhibidor de la germinació, al què són resistents els mutants *aba2-3* per la seva deficiència en ABA. De la generació F3, es van seleccionar les línies que van presentar un 100% de germinació en aquestes

condicions, això indicava que eren homozigotes per la mutació. D'aquestes línies es van seleccionar aquelles que eren capaces de germinar en proporció 3:1 en medi MS amb 50 mg/l de kanamicina, utilitzat com antibiòtic de selecció, el que indicava que eren heterozigotes per *ADC2*, ja que no es van poder obtenir plantes homozigotes per els dos caràcters, probablement degut a que aquest genotip era letal. En treballs previs s'havia observat que els individus heterozigots *35S::ADC2 2.1* presentaven nivells elevats d'expressió d'*ADC2* i un elevat contingut de Put (Alcázar i col., 2005), per tant les plantes híbrides resultants haurien de presentar nivells molt baixos d'ABA i elevats de Put. En aquestes plantes es va determinar la tolerància a deshidratació, tal com s'indica en l'apartat 3.2.2.1 de Materials i Mètodes, i es va comparar amb la dels seus progenitors: mutants *aba2-3* i transgèniques *35S::ADC2 2.1*. Com es mostra a la Figura R.18, el major percentatge de supervivència es va observar en les plantes transgèniques sobreexpresores d'*ADC2* (100%), seguit de les híbrides *aba2-3x35S::ADC2 2.1* (40%) i, finalment, les mutants *aba2-3* (20%). Aquests resultats, indiquen que la sobreexpressió d'*ADC2* reverteix parcialment la sensibilitat a deshidratació del mutant de biosíntesi d'ABA, *aba2-3*, i suggereixen que les plantes que acumulen Put per sobreexpressió d'*ADC2* podrien ser més sensibles a ABA. Una altra possibilitat, que no es pot descartar, és que la Put actuï per sota o independent de l'ABA en la ruta de senyalització a estrès hídric. Per tal d'elucidar si les plantes que sobreexpressen *ADC2* eren hipersensibles a l'ABA es van avaluar altres paràmetres que s'utilitzen de forma habitual per determinar la sensibilitat a l'hormona, com són el creixement d'arrels, la taxa de germinació i l'expressió de gens de resposta a ABA.

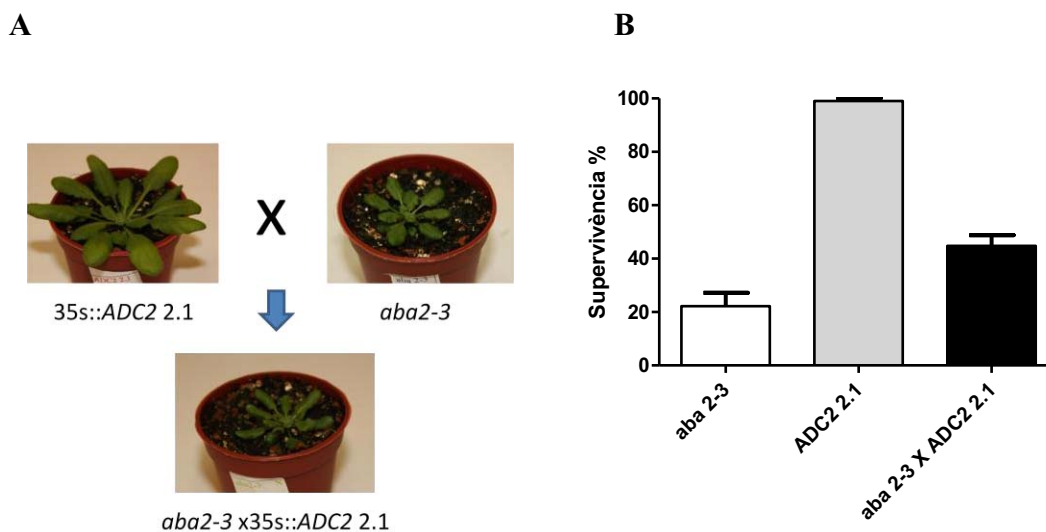
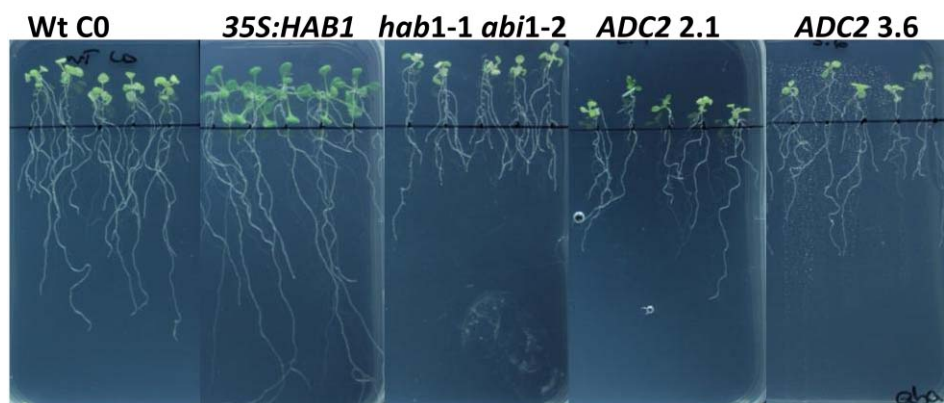


Figura R.18. Línies *aba 2-3x35S::ADC2 2.1*. **A.** Esquema de l'obtenció de les línies *aba 2-3x35S::ADC2 2.1*. **B.** Percentatge de supervivència de las línies *aba2-3*, *35S::ADC2 2.1* i *aba2-3 x 35S::ADC2 2.1* després de 14 dies sense regar.

4.2.9 Efecte de l'aplicació exògena d'ABA en el creixement d'arrels.

Un dels efectes de l'ABA en el desenvolupament vegetal és la inhibició del creixement en longitud de les arrels, per tant la sensibilitat a aquesta hormona es pot avaluar mesurant la longitud de l'arrel en plantes crescudes en presència d'una concentració coneguda d'ABA exogen, de manera que quan més sensible és una planta a l'hormona, menor serà el creixement de l'arrel. El grau de sensibilitat de les línies transgèniques *35S::ADC2* a l'ABA, es va avaluar fent créixer aquestes línies i plantes de tipus silvestre en plaques de Petri, en posició vertical, que contenien medi MS complementat amb 10 μ M d'ABA (veure apartat 3.4.2). Per tal de comprovar que el tractament es duia a terme de forma adequada es varen fer servir, com a controls, dos tipus de plantes, caracteritzades prèviament per altres grups, que tenien alterada la sensibilitat a l'hormona (Saez i col., 2006): plantes transgèniques *35S::HAB1*, insensible a ABA, i el doble mutant *hab1-1 x abil-2*, hipersensible a ABA.

A



B

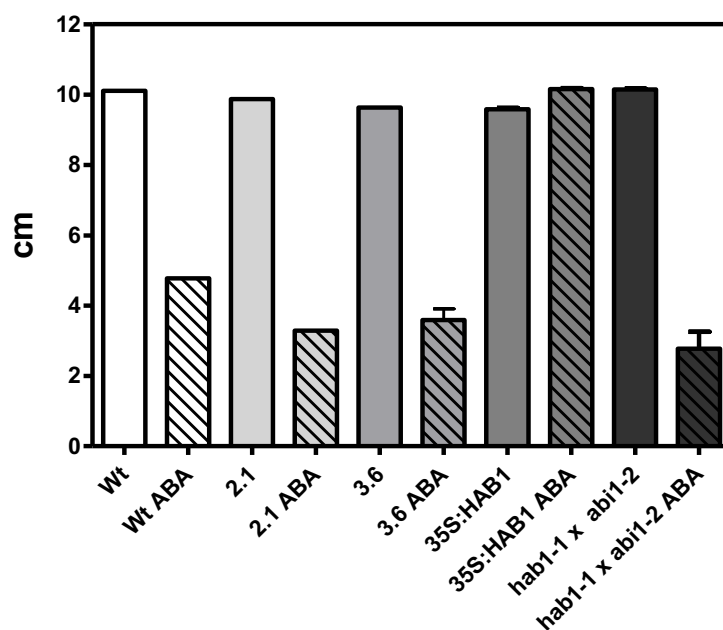


Figura R.19. Creixement de les arrels de diferents tipus de plantes en medi MS, en presència o no d'ABA 10 μ M. Wt: plantes de tipus silvestre; 2.1 i 3.6; línies transgèniques *35S::ADC2*; *35S::HAB1*: plantes transgèniques que no responen a ABA (control negatiu); *hab1-1xabi1-2*: doble mutant hipersensible a ABA (control positiu). A. Aspecte de les arrels dels diferents tipus de plantes analitzades crescudes en presència d'ABA 10 μ M. La línia negra mostra la longitud de les arrels abans d'iniciar el tractament amb ABA, moment en que es va començar a mesurar el creixement. B. Longitud de les arrels (cm) de les diferents plantes analitzades, crescudes en absència (barres sense ratllar) o presència (barres ratllades) d'ABA 10 μ M.

Després de 10 dies, les arrels de les plantes crescudes en presència d'ABA van presentar un creixement menor que les crescudes en absència de l'hormona, excepte les

de la línia *35S::HAB1*, que, com era d'esperar, no va mostrar un disminució en el creixement, demostrant així que a part de l'ABA no hi havia altres factors que afectessin al paràmetre determinat. La major inhibició del creixement de les arrels es va detectar en el doble mutant *hab1-1 x abil-2*. En aquest cas, les arrels van ser un 72% més curtes en les plantes tractades amb ABA que en les no tractades (Figura R.19). Com que aquesta era una línia hipersensible a ABA, aquest resultat demostrava que el tractament s'havia realitzat correctament. Les arrels de les línies sobreexpresores d'*ADC2* 2.1 i 3.6 crescudes en presència d'ABA van ser, respectivament, un 66% i un 62% més curtes que les crescudes en absència de l'hormona. Mentre que en les plantes de tipus silvestre la longitud de les arrels tractades amb ABA va ser un 52% menor que la de les no tractades (Figura R.19). Aquests resultats indiquen que les línies transgèniques sobreexpresores d'*ADC2* són més sensibles a ABA que les plantes de tipus silvestre pel que fa a la inhibició del creixement de les arrels.

4.2.10 Efecte de l'aplicació exògena d'ABA en la germinació de les llavors.

L'ABA té un paper fonamental en la dormició de les llavors, de manera que la seva aplicació exògena retarda o inhibeix el procés de germinació. Això permet avaluar la sensibilitat a l'hormona mesurant la taxa de germinació de les llavors en presència de d'ABA exogen.

El grau de sensibilitat a ABA de les línies transgèniques *35S::ADC2* es va avaluar determinat la taxa de germinació de les llavors d'aquestes línies i de plantes de tipus silvestre en plaques que contenien medi MS complementat o no amb diferents concentracions d'ABA (Figura R.20). En absència d'ABA exogen, la germinació de les llavors procedents de les línies transgèniques *35S::ADC2* 2.1 i 3.6 es va veure lleugerament endarrerida en comparació a les plantes de tipus silvestre, de manera que, després de 2 dies en el medi de cultiu havien germinat un 100% de les llavors de tipus silvestre, però només un 85% i un 82% de les línies 2.1 i 3.6, respectivament (Figura R.20.A). Aquest endarreriment en la germinació de les línies transgèniques es va veure augmentat quan les llavors van germinar en un medi que contenia ABA 0,5 μ M. En aquestes condicions, després de 9 dies havien germinat el 83% de les llavors de les plantes de tipus silvestre, però només el 40% de la línia 2.1 i el 45%, de la línia 3.5 (Figura R.20.B). Resultats similars es van obtenir amb concentracions d'ABA més

elevades (Figura R.20.C), fins a 3 μM . Amb aquesta concentració de l'hormona les diferències de germinació entre les línies transgèniques i les plantes de tipus silvestre es van atenuar, i van ser nul·les amb una concentració d'ABA 5 μM . Aquests resultats suggereixen que la sobreexpressió d'*ADC2* incrementa la sensibilitat a ABA en la germinació de les llavors.

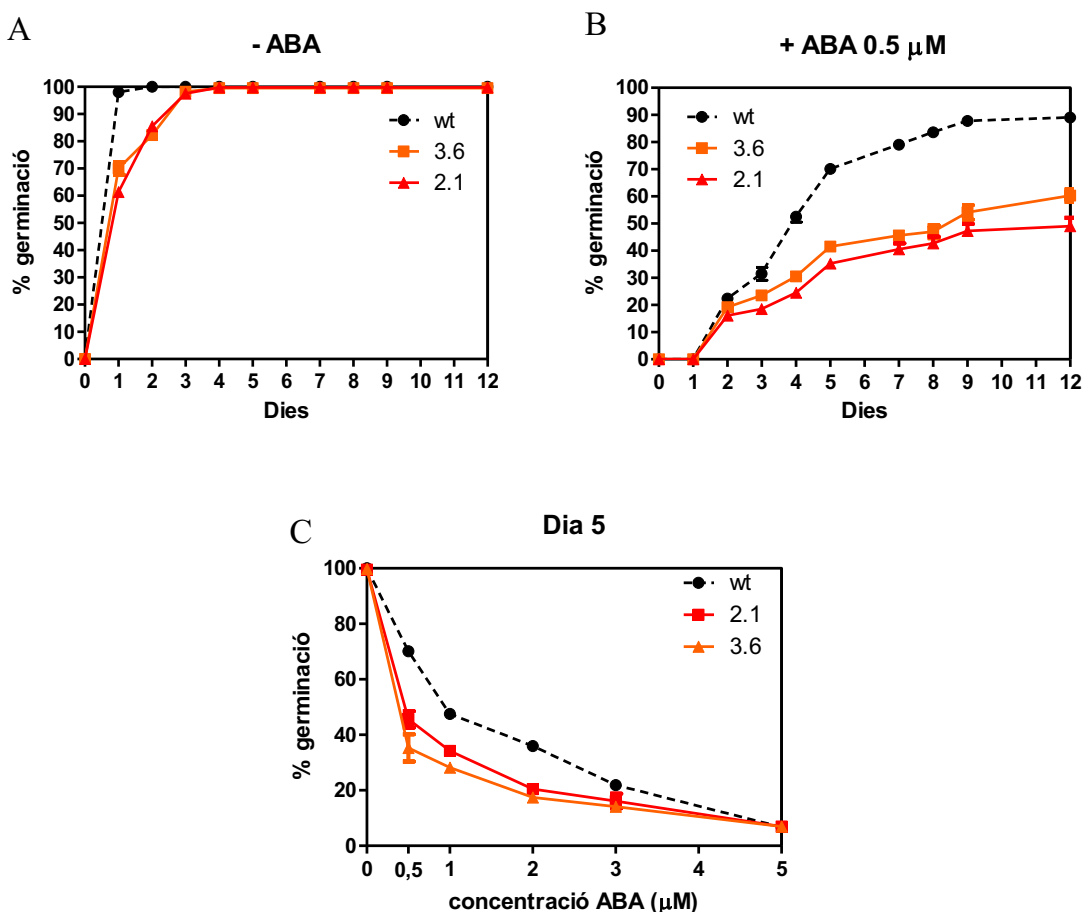


Figura R.20. Efectes de l'ABA en la germinació de les llavors de les línies transgèniques *35S::ADC2* 2.1 i 3.6 i les plantes de tipus silvestre (wt). A. Germinació de les diferents línies en absència d'ABA. B. Germinació de les diferents línies en presència d'ABA 0.5 μM . C. Germinació de les diferents línies en diferents concentracions d'ABA: 0, 0.5, 1, 2, 3 i 5 μM .

4.2.11 Perfil transcripcional de gens de resposta a ABA.

Els resultats mostrats en els dos apartats anteriors suggereixen que les plantes transgèniques *35S::ADC2* 2.1 i 3.6 són més sensibles a ABA que les plantes de tipus silvestre. Per tal de confirmar aquests resultats, es va analitzar l'efecte que produïa la sobreexpressió d'*ADC2* en l'expressió de diversos gens regulats per ABA. Per això, es

va analitzar, mitjançant RT-PCR a temps real, l'expressió de 6 gens de resposta a ABA: *ABII*, *ABI2*, *HABI*, *RD29B*, *PP2CA* i *OSTI* (Peters i col., 2010; Rodrigues i col., 2009), en plantes sobreexpresores d'*ADC2* i plantes de tipus silvestres que havien estat tractades o no, durant 3h, amb ABA 10 μ M, tal com es descriu en l'apartat 3.2.1.1 de Materials i Mètodes. En general, els gens marcadors de resposta a ABA, presenten una expressió baixa en absència de l'hormona, però la seva expressió s'incrementa de forma marcada en resposta a la mateixa (Saez i col., 2006). Això es va observar clarament en tots els gens analitzats (Figura R.21).

Com es pot observar a la Figura R.21, després del tractament amb ABA, l'expressió dels gens avaluats va ser superior en les línies transgèniques *35S::ADC2* que en les plantes de tipus silvestre. Així, l'expressió d'*ABII* en les línies 2.1 i 3.6 tractades amb ABA va ser, respectivament, 23 i 20 vegades superior que en les plantes no tractades, mentre que en les plantes de tipus silvestres aquest increment va ser només de 14 vegades. En el cas d'*ABI2*, la seva expressió en les línies 2.1 i 3.6, després del tractament amb ABA, va incrementar 103 i 78 vegades en relació a les plantes no tractades amb l'hormona, mentre que en les plantes de tipus silvestre aquest increment fou de 46 vegades. Després del tractament amb ABA, l'increment en l'expressió de *HABI* va ser aproximadament 4 i 3 vegades superior en les línies 2.1 i 3.6 que en les plantes de tipus silvestre. En aquestes condicions, l'expressió de *PP2CA*, va augmentar 63 vegades en la línia 2.1, 34 en la línia 3.6 i 33 en les plantes de tipus silvestre, en relació a les plantes no tractades amb ABA. L'expressió de *RD29B* en les línies 2.1 i 3.6 tractades amb l'hormona va ser, respectivament, 1,3 i 1,5 vegades més alta que en les plantes de tipus silvestre. Mentre que en el cas de *OSTI*, aquesta diferència va ser de 2 vegades en la línia 2.1, i de 1,8 vegades en la línia 3.6. Aquests resultats suporten la idea de que les línies transgèniques *35S::ADC2*, que acumulen elevats nivells de Put, són hipersensibles a ABA.

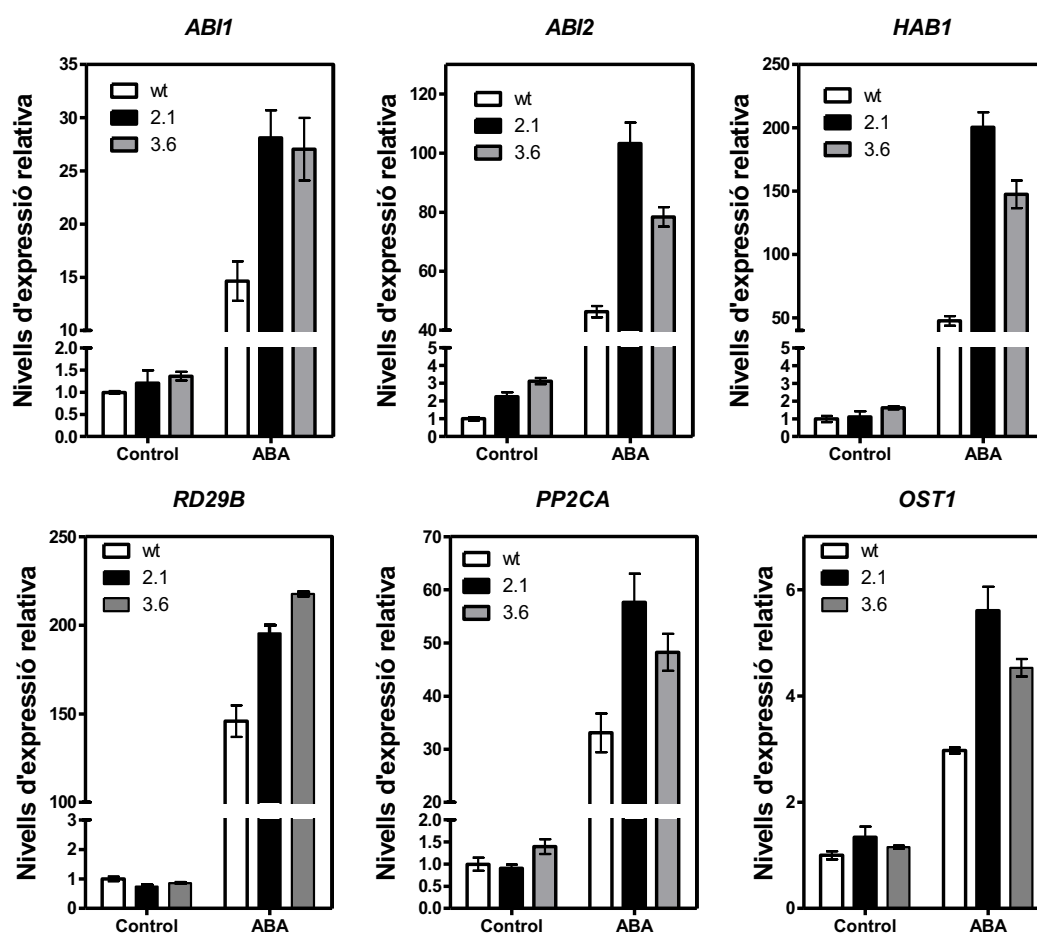


Figura R.21. Expressió d'*ABI1*, *ABI2*, *HAB1*, *RD29B*, *PP2CA* i *OST1*, en plantes transgèniques *35S::ADC2* 2.1 i 3.6, i plantes de tipus silvestre, després de 3h en un medi amb una concentració d'ABA 10 μM (ABA) o bé el mateix medi sense ABA (control). Els nivells de transcrits es van determinar per RT-PCR quantitativa amb primers específics per cada gen i es van relativitzar als de l'*actina 2* en cada cas.

4.2.12 Localització de les proteïnes ADC1 i ADC2

Per investigar la localització *in vivo* de les proteïnes ADC1 i ADC2, el cDNA que contenia la regió codificant d'aquestes proteïnes es va fusionar a l'extrem C-terminal de la proteïna fluorescent CFP (*ciano fluorescent protein*) o GFP (*green fluorescent protein*), respectivament, donant lloc a les proteïnes de fusió ADC1-CFP i ADC2-GFP, que van permetre la posterior localització en fulles de *N. benthamiana* agroinfiltrades.

Tres dies després de l'agroinfiltració, es va poder comprovar l'èxit de la transformació observant la presència de fluorescència en l'epidermis de les fulles agroinfiltrades. Mitjançant l'observació al microscopi confocal, tal com s'indica en l'apartat 3.9.5 de Materials i Mètodes, per a la proteïna ADC1-CFP es va obtenir un patró de fluorescència en que es veia un sola area fluorescent per cada cèl·lula (Figura R.22.A). Aquestes mateixes cèl·lules d'epidermis de *N. Benthamiana* agroinfiltrades es van tenyir amb DAPI, un compost fluorescent que tenyeix el DNA del nucli, i van mostrar un patró de fluorescència molt similar a l'observat amb la proteïna ADC1-CFP (Figura R.22.B). Fent una observació de la proteïna ADC1-CFP i del colorant DAPI alhora, es va veure que la fluorescència dels dos coincidia perfectament (Figura R.22.C), el que indicaria que la proteïna ADC1-CFP té una localització nuclear.

En l'epidermis de fulles de tabac agroinfiltrades amb la construcció que contenia el gen *ADC2* fusionat a *GFP* es va observar un patró de fluorescència puntejat (Figura R.22.D), amb diversos punts per cèl·lula i tots amb una mida semblant, que eren abundants en les cèl·lules guarda dels estomes. Aquesta fluorescència va coincidir totalment amb la obtinguda quan es va fer servir una longitud d'ona per a excitar les clorofil·les (Figura R.22.E i F), pigments fotosintètics continguts en els cloroplasts, el que suggereix que la proteïna ADC2-GFP es localitza en aquests orgànuls cel·lulars.

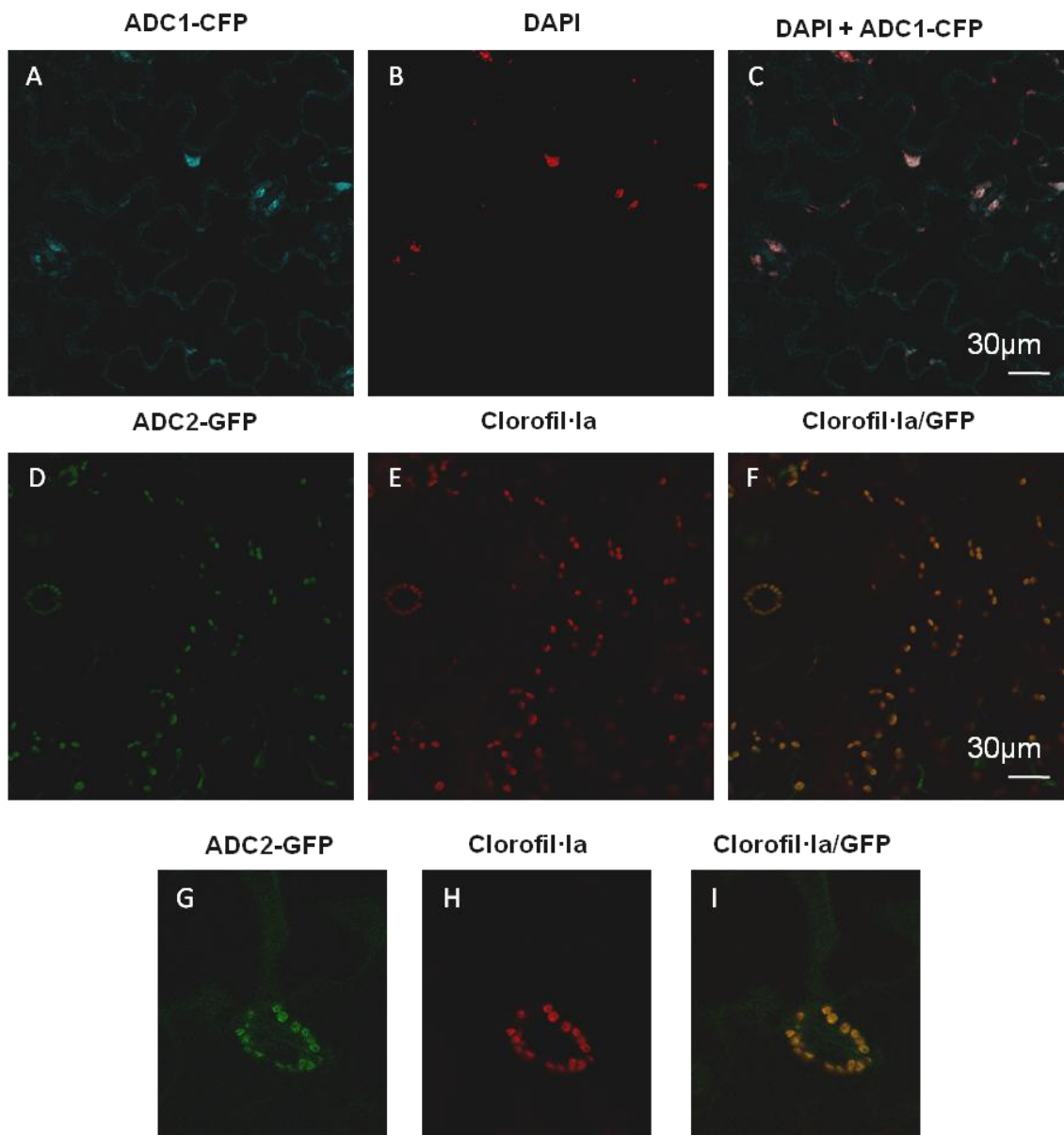


Figura R.22. Localització subcel·lular de les proteïnes ADC1 i ADC2 fusionades a CFP i GFP, respectivament. Es mostren les imatges obtingudes amb microscopia confocal on es veu, gracies a la seva fluorescència, la localització d'aquestes proteïnes en epidermis de fulles de *N. benthamiana* agroinfiltrades. Cèl·lules que expressen transitoriament ADC1-CFP (A) o ADC2-GFP (D, G), respectivament. Cèl·lules tenyides amb el colorant fluorescent específic per a nuclis DAPI (B). Colocalització d'ADC1-CFP amb DAPI (C). Fluorescència de les clorofil·les (E, H). Colocalització d'ADC2-GFP amb les clorofil·les (F, I). Les dades es van obtenir fent servir un objectiu 40x d'immersió en aigua.

4.3 Caracterització de tres amino oxidases d'Arabidopsis dependents de coure

En moltes espècies vegetals, les CuAOs estan codificades per famílies multigèniques (Møller i McPherson, 1998; Tipping i McPherson, 1995). L'anàlisi de la informació existent a la base de dades del genoma d'Arabidopsis (www.arabidopsis.org), revela que hi ha 10 gens anotats com a putatives CuAOs, entre els quals es troben: ATAO1 (Møller i McPherson, 1998) , AtCuAO1 (Wimalasekera i col., 2011) , i vuit gens més: At1g31710, At2g42490, At1g31670, At1g31690, At3g43670, At4g12270, At4g12280 i At4g12290. Aquests gens presenten homologia amb ATAO1, i d'altres CuAOs caracteritzades en diferents espècies vegetals i animals (Pietrangeli i col., 2007; Mura i col., 2007; Ascenzi i col., 2002). Totes les seqüències proteiques deduïdes de les corresponents regions codificadores d'aquests gens presenten un domini amino oxidasa (IPR002937).

De tots els gens que codifiquen per putatives CuAOs es van seleccionar els tres que tenien un grau d'expressió més elevat en estat vegetatiu (Figura R.23) segons la base de dades Genevestigator (www.genevestigator.com) (Zimmermann i col., 2004), que a partir d'ara s'anomenaran: *AtCuAO1* (At1g62810, (Wimalasekera i col., 2011)), *AtCuAO2* (At1g31710) i *AtCuAO3* (At2g42490), per la seva caracterització funcional

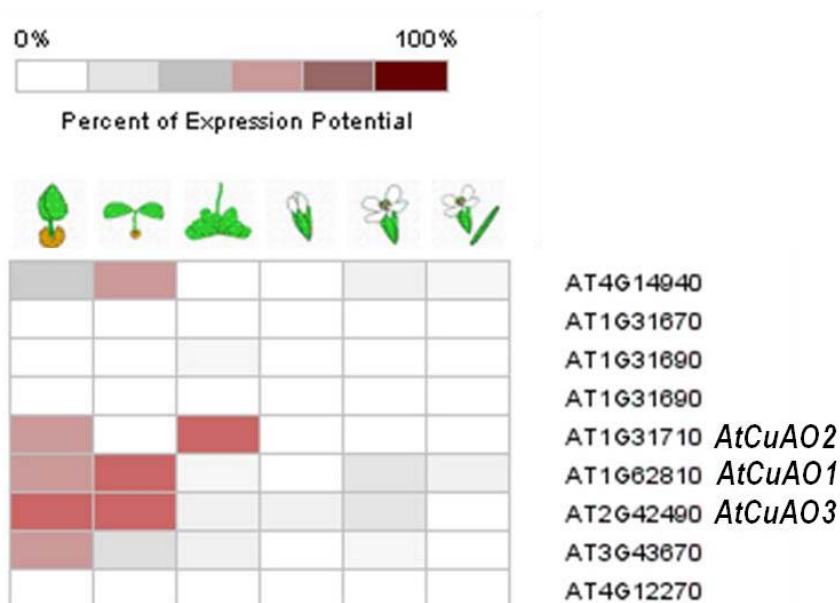


Figura R.23. Expressió dels gens anotats com a putatives CuAOs en diferents estadis vegetals i organs, extret de la base de dades www.genevestigator.com (Zimmermann i col., 2004).

4.3.1 Comparació de les seqüències d'AtCuAO1, AtCuAO2 i AtCuAO3 amb altres CuAOs

Les seqüències d'aminoàcids d'AtCuAO1, AtCuAO2 i AtCuAO3 es van alinear amb la CuAO de *Pisum sativum* (PsCuAO, nombre d'accés GenBank L39931), la única CuAO d'origen vegetal que ha estat cristal·litzada, i la ATA01, la única CuAO d'*Arabidopsis* caracteritzada a nivell funcional (Figura R.24). AtCuAO1 i AtCuAO2 van mostrar un alt nivell de conservació de seqüència quant es van comparar amb altres CuAOs vegetals, mentre que el grau de conservació va ser més baix en el cas d'AtCuAO3. En particular, la seqüència d'aminoàcids d'AtCuAO1 va resultar tenir un 60% d'homologia amb ATA01 i un 64% amb PsCuAO. L'homologia entre les seqüències d'aminoàcids d'AtCuAO2 i ATA01 va ser de 65%, i de 71% entre les seqüències d'AtCuAO2 i PsCuAO. La homologia d'AtCuAO3 amb ATA01 i PsCuAO va ser menor, 45% i 44%, respectivament. L'homologia entre la seqüència d'aminoàcids d'AtCuAO3 i les altres dos AtCuAOs també va ser baixa, 44% amb AtCuAO2 i 43% amb AtCuAO1, mentre que AtCuAO2, va exhibir un 63% d'homologia amb AtCuAO1.

Els residus d'aminoàcids descrits com a importants per a l'activitat catalítica de CuAOs vegetals, aparentment estan conservats en les tres AtCuAOs estudiades en aquest treball (Figura R.24). ATA01 conté 32 dels 33 residus d'aminoàcids que estan descrits com a conservats en la major part de les CuAOs (Møller i McPherson, 1998; Tipping i McPherson, 1995), mentre que AtCuAO1, AtCuAO2 i AtCuAO3 contenen 32, 31 i 30 d'aquests aminoàcids, respectivament (Figura R.24). Entre aquests aminoàcids s'inclouen la tirosina que es troba en el centre actiu (Figura R.24, Tyr441, Tyr412, Tyr495), i que posteriorment pateix una modificació per formar el cofactor TPQ (Tipping i McPherson, 1995; Mu i col., 1992; Janes i col., 1992); quatre histidines, tres de les quals corresponen als lligands amb coure (Møller i McPherson, 1998; Kumar i col., 1996; Parsons i col., 1995) (Figura R.24; His499, His501 i His662 per AtCuAO1, His472, His474 i His632 per AtCuAO2, His546, His548 i His712 per AtCuAO3), i l'àcid aspàrtic que es troba al centre actiu (Wilmot i col., 1997) (Figura R.24, Asp354, Asp325 i Asp412). La Cys373 i Cys399 en AtCuAO1, 344 i 370 en AtCuAO2, i 431 i 457 en AtCuAO3, residus importants per a la formació d'un potencial pont disulfur (Padiglia i col., 2002), també estan conservades en la majoria de les CuAOs. El residu de serina, en la posició aminoacídica 438 de la AtCuAO1 (Figura R.24) és una treonina

en la majoria d'aminooxidasas. Els residus d'aminoàcids en les posicions 205 i 479 de la AtCuAO2 són asparagina i histidina, respectivament, mentre que en la majoria de les CuAOs són àcid aspàrtic. En la AtCuAO3, els aminoàcids de les posicions 559 i 564 són cisteïna i àcid glutàmic, respectivament, mentre que aquests residus són glicina i asparagina en altres CuAOs. Finalment el residu en la posició 449 és prolina en la majoria de les CuAOs, però valina i alanina en AtCuAO3 i ATAO1, respectivament (Figura R.24).

```

PsCuAO  -----MAST-----TMMRLALFVSVLTLLSFH----- 21
ATAO1  MHINVNVLSSTSITT-----PSMNTSILAI--LFLIQ----- 31
AtCuAO1 -----MAE-----PSFARLF--LLFFSFL-----IFATYSWVFG 28
AtCuAO2 -----MAPLHFTILILFSV----- 15
AtCuAO3 -----MASASKKTSACPHHGSLPPPKLVSAAPDTVAVVSDADDQRAKSVLESVIR 52

PsCuAO  -----AVVSVT-PLHVQHPLDELTKEEFLA--VQIVQNKYPISN- 58
ATAO1  -----CVF--TLGLHFHPLDELTPQEINK--TSFIVKKSHLGNL 66
AtCuAO1 PDSGFLFGTRVRKTLGNSNRQVHVHDSLEKPHHPLDELTVREINR--VRTILSNHDPGFGS 86
AtCuAO2 -----IVVSSSFTPPRHFDDELTELE--KLVRTIINKSYVGFEN 54
AtCuAO3 PVDSFPDNT-AKPP--ANKGISVMPRTETKHPDELDELSAAEISVAVATVRAAGANPEVR- 107
          : * : * : * :
PsCuAO  NRLAFHYIGLDDPEKDHVL-----RYETHPT--LVSI PRKIFVVAIINS 100
ATAO1  KDLTFHYLDLEPNKSHVL-----QWLSFNPSKKPPPPRRRSFVVVRAGG 111
AtCuAO1 GSATIHSMALDEPEKSRV-----QWKKGNK-----LLSRRAAVVAYWGG 126
AtCuAO2 HKFTFYVGLNEPNKSLVL-----SWYSSPNHT- IKPPPRQAFVIARDNG 98
AtCuAO3 DGMRFIEVASVEPDKQVVALADAYFFPFQPSLLPRTKSGPVI PMKLP RRARLVVYNQK 167
          : * : * : * :
PsCuAO  QTHE--ILINLR-----IRSI VSDNIHNGYGFPILSVD---EQSLAI-KLPL 141
ATAO1  QTYE--LIIDLI-----TSKIASSRIYTGHPSPFTFIEL-----FKASKLPL 152
AtCuAO2 QTHE--ITVDDL-----SGRVVSDVINRRTSGYPILTLNDV---FAASQVPL 167
AtCuAO3 KTRV--IVLDFS-----SRAIVSDKIHVNGYPMLSNDEQ-----EASTELV 139
AtCuAO3 SNETSVIIVALSEVHAVTRGGHRRGRVSSQVIVDVQPP-MDA-----AEYAECEAVK 220
          : * :
PsCuAO  KYPPFIDSVKRGLNLSEIVCSS-FTMGWFGEEN--VRTVRLDCFMKE---STVNIYV 194
ATAO1  TYPPFKSILDRSLNISEVSCIP-FTVGWYGETTT--RRELKASC FYRD---GSVNVFG 205
AtCuAO1 KSLEFNRSIEARGVKFSDLACIT- PFAGWFGSEEE-GRVRVIRVQCFTLQ---GTNVMFM 221
AtCuAO2 KFKPFIDSVAKRGLNVSEIVFTT-STIGWYGETKAEAEVIRLMPFVLD---GTVMML 194
AtCuAO3 DFPPIEAMKRRGIEDMDLVMVDVPCVGYHSEADAPSRRLAKPLIYCRTDSDSPMENGYA 280
          : * : * : * :
PsCuAO  RPITGITIVADLDLMIKIVEYHVRDIEAVPTAENT-EYQVSKQSPFPGPK-QHSLTSHQPO 252
ATAO1  RPIEGITITIDVDMQVVKYSDRFRKPLPEKEGN-DFRKKHKFPFSC-----NVS 255
AtCuAO1 RPLEGLYVTVDLKLEVIKIIDKGPPIPKASGT-EYRFGVQNKPVHMDRINPISMEQPD 280
AtCuAO2 RPIEGMTIIVNLDKEMVSEFKDRSVVTMPIANGT-EYRISKLNPPFGPT-LHNAVLLQPD 252
AtCuAO3 RVEGIYVLDVMQNMVIEFEDRKFVLPPLPDLRNYTPGESRGGVDRSDVKPLQIIQE 340
          : * : * : * :
PsCuAO  GPGFQI-NGHVSWANWKFHIGFDVRAIGIVISLASYDLEKHKSRVLYKGYISELFVY 311
ATAO1  DTGFKI-LGNRVKANWKFHVGFARAGVTISTASVLDPRTKRFRVMYRGHVSETFVY 314
AtCuAO1 GPSFRVEDGHLVKWANWVHVKADQDAGMIISQATVRDSETGEPVSVMYKGFPELSEFVY 340
AtCuAO2 GPGFKV-DGHIVRWANWFHISFDVRAIGIVISLALFDVTVNRYRQVLYKGHLEMFIPY 311
AtCuAO3 GPSFRV-RGYFVEWQKWNFRIGFTPREGLVIHVSAYVDSGRGR-RVAHRLSFVEMVY 398
          : * : * : * :
          #
PsCuAO  QDPTTEFYKTFDFSGFGLSTVSLIPNRDCPPHAQFIDTYVHSANGTPEILLKNAICV 371
ATAO1  MDPTYEWYRTFMDIGFGRSAVNLQPLIDCPQNAAFFDGHVAGPDGTAKMKNVNCV 374
AtCuAO1 MDPEEGWYKGYMDAGELGLGPTAMPVPLNDPCRNYSYIDGVFASPDGKEIVQPNMCL 400
AtCuAO2 MDPSDDWYFITYLDGDFGCGQCAVSLQPYTDCPAGAVFMDGIFAGQDGTAKIKVMCI 371
AtCuAO3 GDPNEPHYRKNADFAGEDGLGKNAHSLKKGCDLGSIKYFDAHFTNFTGGVETIENCVCL 458
          : * : * : * :
          @
PsCuAO  FEQY-GNIMWRHTENGIPNESIEESRTEVNLIVRTIVTVGNVDNVIDWEFKASGISKPSI 430
ATAO1  FEKNGYGASFRTEINVPQVITSGAAEISLVVRMVAATLGNVDYIVDWEFKKSGAIRVGV 434
AtCuAO1 FERYAGDISWRHSEILFANADIRESRPKVTLVARMATSGVGNVDYIFDWEFQTDGLIRIVT 460
AtCuAO2 FEKYAGDIMWRHTAEIIPNLEITEVRPDVSLVARIVTVGNVDYIVDYEFPKSPSIRKMGV 431
AtCuAO3 HEED-HGILWKHQDWRGTGLA---EVRRSRRLTVSFLCTVANYEYGFYWHFYQDGKIEAEV 514
          : * : * : * :
          $ $
PsCuAO  ALSGILEIKGTNIKHKDEI--KEDLHGKLVANSIGIYHDHFYIYLLDFDIDGTH-NSFE 487
ATAO1  DLTGVLEVKATSYTSNEQI--TENVYGTQVAKNTIAVNHHDHYLYYLLDLDVGDNG-NSLV 491
AtCuAO1 AASGLMLVKGT PYDNDVDDLGDREDDAGPLISENVIGVVDHDFITFHLDMIDGPMNSLV 520
AtCuAO2 GLTGVLKVPVEYIHTSEIKLGEDIHGTIVADNTVGVNHDHFVTRFLHLDIDGTE-NSFV 490
AtCuAO3 KLTGILSLGALQPGE-----TRKYGTIAPGLYAPVHQHFFIARMDSVDCPKPDAFN 567
          : * : * : * :
PsCuAO  KTSLKTVRIK---DGSKRKS YWTTETQAKTESDAKITIGL-APAEVLVNVNPNIKTAVG 543
ATAO1  KAKLKTVRVTDVNTKSSRRKSYWTVVKTAKTEADGRVRLGS-EPVELLIVNPNKKTIKI 550
AtCuAO1 KVHLEKQVVP---TGKSPRKS YLKVKKYIAKTEKDAQIKLSLYDPYEFHIVNPNKRSRVG 577
AtCuAO2 RNELVTRSPK--SVNTPRKYWTTPKTKARTEAEARVRLGL-KAEELVVVNPNRKTKHG 547
AtCuAO3 QVVEVNVVRVDERGENNVHNAFYAE-KLLKSEAVAMRDCDPLSARHWIVRNTRTVNRVT 626
          : * : * : * :
PsCuAO  NEVG YRLIPA-IPAPLLTEDDYEQIRGAF TNYNVVVTAYNRTKWKWAGGLYVDH-SRGGD 601
ATAO1  NTVGYRLIPEHLPATSLLDYDPEIRAGYTKYPVWVTAYDRSERWAGGFYSDR-SRGGD 609
AtCuAO1 NPAGYRIVPG-GNAASLLDHDPPQIRGAF TNNQI WVT PYNRSEYAGGLVLIYQ-SQGGD 635
AtCuAO2 NEVG YRLHGG-SAAGPLLAQDDFPQIRAAFTNYNVVITPYNRSEVWAGGLYADR-SQGD 605
AtCuAO3 QLTGYKLVPG-SNCLPLARPEAKFLRRAAF LKHNLVVTRYPADKFP GGEFFPNQNPAGE 685
          : * : * : * :
          $
PsCuAO  TLA VVTKQNRREIVNKDIVMWHVVGIIHVPAQEDFPIMPLLSTSFELRPTNFFERNPVLKT 661
ATAO1  GLAVWSSRNREIENKDIVMWNVVGHHIPYQEDFPVMP TLHGGLTLRPSNFFDNDPLIG- 668
AtCuAO1 TLQVWSDRDRS IENKDIVLWYTLGFHHVPCQEDYFVMP TAAASFELKPAFFESNPILGS 695
AtCuAO2 TLA VWSQRNRKIEKEDIVMNYTVGFHHVPSQEDYPTMP T LSGGFELRPTNFFERNPVLKT 665
AtCuAO3 GLAVVWKQRNRSLESDVWLWYVFGITHVPRLEDVWMPVEHIGFTLMPHGFNFCSPAVDV 745
          : * : * : * :
PsCuAO  LSPRDVAVPGCS-----N----- 674
ATAO1  ----- 674
AtCuAO1 APFFEKDLVPCR-----PFASS----- 712
AtCuAO2 KPVKVTARKCT-----PKND----- 681
AtCuAO3 PNPCELETKSEVKEVVAFKALQTLGGLSKL 776

```

Figura R.24. Alineament de les seqüències d'amino àcids d'AtCuAO1, AtCuAO2 i AtCuAO3 amb altres CuAOs vegetals. Els organismes i els símbols utilitzats són els següents: AtCuAO1,

AtCuAO2, AtCuAO3 i ATA01 (Møller i McPherson, 1998) són CuAOs d'*A. thaliana* i PsCuAO, és una CuAO de *P. sativum* (Tipping i McPherson, 1995). Els residus idèntics es troben marcats amb asterisc (*). Les substitucions conservades o semiconservades estan anotades amb ‘:’ i ‘.’, respectivament. Els 33 residus totalment conservats en la majoria de les coure aminooxidases es troben marcats amb un fons de color gris. Els residus no conservats en les CuAOs d'*A. thaliana* estan marcats invertidament, amb la lletra de color blanc. Els residus d’histidina d’unió a coure estan marcats amb ▼. Els cercles negres (●) indiquen la tirosina que posteriorment es modificava per a formar la TPQ. El lloc actiu format per un àcid aspartic s’indica amb #. L’anàlisi es va dur a terme fent servir el programa CLUSTALW per a l’alineament de seqüències.

4.3.2 Expressió d’*AtCuAO1*, *AtCuAO2* i *AtCuAO3* en *Nicotiana benthamiana* i caracterització de les proteïnes recombinants fusionades a TAP

Per tal de comprovar que *AtCuAO1*, *AtCuAO2* i *AtCuAO3* codifiquen amino oxidases funcionals dependents de coure, aquests gens es van expressar transitòriament en *N. benthamiana* com a proteïnes de fusió utilitzant el vector d’expressió en vegetals pC-TAPa (Popescu i col., 2007), tal com es descriu en l’apartat 3.9.1 de Materials i Mètodes. El tag TAP consta de: dos còpies de la regió d’unió a immunoglobulina de la proteïna A de *Staphylococcus aureus* (2xIgG-BD), una diana per a l’escissió per la proteasa 3C del rinovirus humà (3C), una cua de 6 histidines (6xHIS) i nou epitops myc (9xMYC) (Rubio i col., 2005) (Figura R.25). La presència d’aquest TAP facilita la purificació de proteïnes i la seva detecció amb d’anticossos.

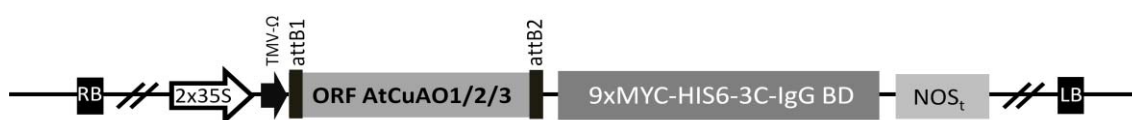


Figura R.25. Construcció per a produir AtCuAOs recombinants fusionades al tag TAP en *N. benthamiana*.

AtCuAO1, *AtCuAO2* i *AtCuAO3* codifiquen proteïnes de 712, 681 i 776 aminoàcids respectivament, amb unes masses moleculars de 80,1, 76,7 i 86,7 kDs, mentre que el TAP té una massa molecular calculada de 34,3 kD.

Cinc dies després de l’agroinfiltració, es va prendre la mostra de les zones agroinfiltrades, i els extractes de proteïnes solubles es van analitzar per Western blot utilitzant anticossos anti-myc. Com es pot observar en la Figura R.26, en els extractes

proteics procedents de plantes transformades amb les construccions portadores de les diferents AtCuAOs (Figura R.25), es va detectar una sola banda, la qual tenia la mida esperada (114 kD, 111 kD i 121 kD) per a cadascuna de les tres proteïnes de fusió (AtCuAO1-TAP, AtCuAO2-TAP, AtCuAO3-TAP) (Figura R.26). Aquestes proteïnes es van purificar per cromatografia d'afinitat utilitzant IgG-Sepharose, procés que implica la digestió amb la proteasa 3C i conseqüent trencament de la unió a IgGs. En els extractes parcialment purificats, utilitzant el mateix anticòs anti-myc, s'hi van detectar bandes al voltant de 101, 98 i 108 kD, que es corresponen amb la mida esperada per les proteïnes de fusió sense el domini 2xIgG d'unió a la proteïna A: AtCuAO1-MYC9-His6, AtCuAO2-MYC9-His6 i AtCuAO3-MYC9-His6, respectivament (Figura R.26).

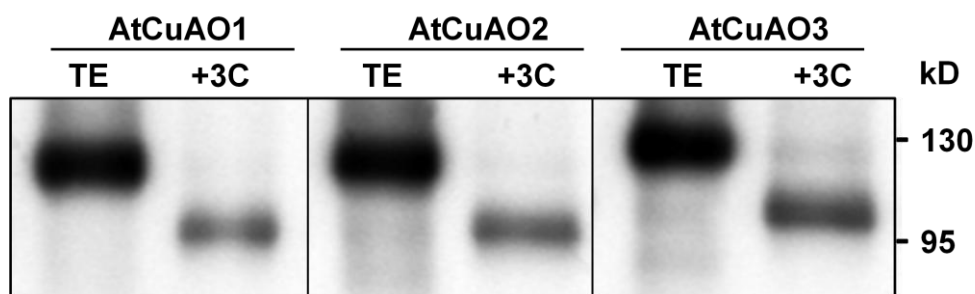


Figura R.26. Western blot de les proteïnes recombinants AtCuAO produïdes en plantes de *N. benthamiana*. Les proteïnes presents en l'extracte de proteïna total (TE) i en l'eluat obtingut a partir d'una resina d'IgGs fent servir la proteasa 3C (+3 C) es van separar en un gel SDS-PAGE al 8% d'acrilamida i es van revelar utilitzant l'anticòs anti-myc. La banda de major pes molecular correspon a la proteïna de fusió que conté tot el *tag* TAP, mentre que la banda de menor pes molecular correspon a les proteïnes de fusió que se'ls ha eliminat del TAP el domini d'unió a IgG. A la dreta es mostren els marcadors de pes molecular (kD).

L'activitat enzimàtica de cada proteïna de fusió parcialment purificada es va avaluar mitjançant la producció de H_2O_2 . Per a aquest fi, les proteïnes de fusió es van incubar amb el reactiu Amplex Red (Invitrogen, Live Technologies) oxidable per H_2O_2 , peroxidasa, i la diamina Put, o bé les poliamines Spd o Spm. La reacció de qualsevol de les tres proteïnes amb Put va permetre detectar alliberació de H_2O_2 , i per tant activitat amino oxidasa (Figura R.27). Aquesta activitat es va veure reduïda entre un 85% i un 75% si es feia un pretractament amb aminoguanidina, un inhibidor irreversible competitiu d'aminoxidases que interactua amb el cofactor TPQ (Figura R.27). L'activitat amino oxidasa també es va reduir un 97% per tractament previ amb 8-hidroxiquinolina, un agent complexant de coure, que inhibeix de manera no competitiva

aminoxidases dependents de coure (Figura R.27). La Spm també va resultar ser un bon substrat per a les tres proteïnes, i novament aquesta activitat enzimàtica va ser inhibida per l'aminoguanidina, un 74%, i la 8-hidroxiquinolina, un 94% (Figura R.27). No obstant això, cap de les tres proteïnes de fusió va ser capaç d'oxidar la Spm. Aquests resultats suggereixen que AtCuAO1, AtCuAO2 i AtCuAO3 codifiquen proteïnes funcionals amb activitat amino oxidasa dependent de coure, que són capaces d'oxidar Put i Spd, però no Spm, amb el consegüent alliberament de H₂O₂. Mentre que AtCuAO1 i AtCuAO2 no va semblar que tinguessin preferència per cap dels substrats reconeguts, AtCuAO3 va mostrar una major activitat quan es va utilitzar Put com a substrat que quant aquest va ser Spd (Figura R.27).

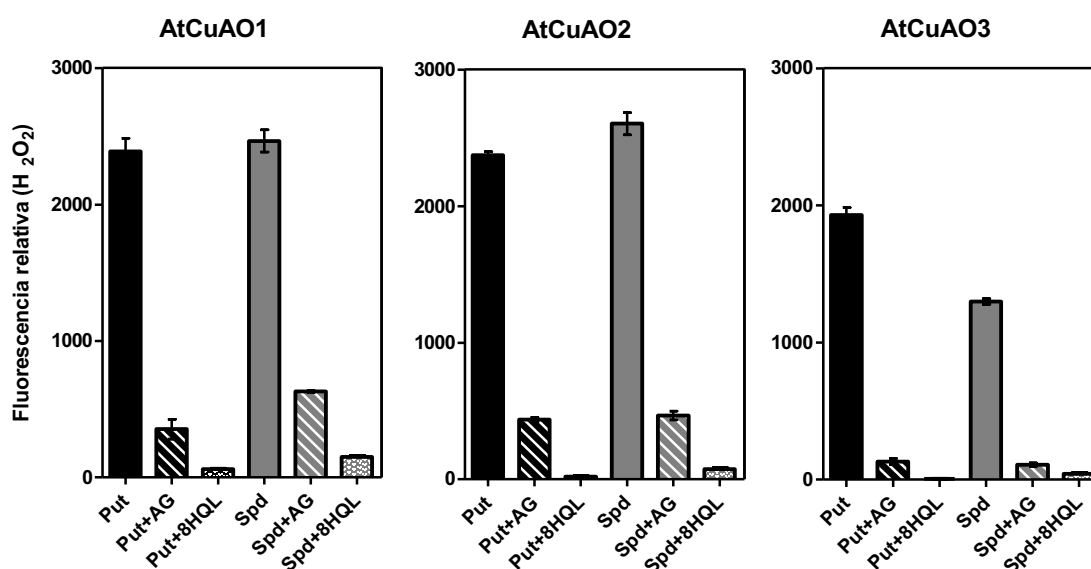


Figura R.27. Activitat amino oxidasa de les proteïnes de fusió recombinants AtCuAO1-MYC9-His6 (AtCuAO1), AtCuAO2-MYC9-His6 (AtCuAO2) i AtCuAO3-MYC9-His6 (AtCuAO3). Els eluats utilitzats per mesurar l'activitat de l'enzim, que es van obtenir per purificació d'extractes proteics utilitzant una resina d'IgG i proteasa 3C, contenen 1 µg de proteïna. La fluorescència relativa correspon a la quantitat de H₂O₂ alliberat per l'oxidació de la Put o Spd (10 mM), soles o pre-tractades amb els inhibidors de CuAO, aminoguanidina (AG, 5 mM) o 8-hidroxiquinolina (8HQL, 30 µM), fent servir el reactiu Amplex Red.

4.3.3 Perfil d'expressió d'*AtCuAO1*, *AtCuAO2* i *AtCuAO3* durant el desenvolupament i en diferents òrgans vegetals.

Per avaluar la regulació espacial i temporal de l'expressió dels 3 gens que codifiquen diferents *AtCuAOs*, es va analitzar l'expressió d'*AtCuAO1*, *AtCuAO2* i *AtCuAO3* mitjançant RT-PCR a temps real utilitzant RNA aïllat de diferents òrgans de plantes adultes d'*Arabidopsis* (fulles de roseta, tiges, flors). L'expressió d'aquests gens també es va determinar en plàntules senceres de 4, 12, 21 i 28 dies d'edat per tal de saber si hi havia algun tipus de regulació en l'expressió d'aquests gens durant el desenvolupament de la planta (Figura R.28).

Els transcrits d'*AtCuAO1*, *AtCuAO2* i *AtCuAO3* es van detectar en tots els òrgans analitzats, però amb diferents nivells. L'expressió d'*AtCuAO1* era abundant en les fulles de la roseta, però els nivells més alts es van trobar en tiges i flors. L'expressió d'aquest gen va augmentar al voltant de 3 vegades en plàntules de 28 dies en comparació amb les plàntules de 4 dies d'edat (Figura R.28). Un patró d'expressió similar es va observar per *AtCuAO3*, amb un augment de l'expressió al llarg del desenvolupament de la planta, i un pic d'expressió en les flors, seguit de fulles i tiges, en què l'expressió va ser similar (Figura R.28). Per contra, els nivells d'expressió d'*AtCuAO2*, eren abundants en les tiges, però baixos en els altres òrgans analitzats. L'expressió d'aquest gen no va augmentar durant les diferents etapes del desenvolupament (Figura R.28). A més, *AtCuAO2* va resultar ser el gen que presentava un menor grau d'expressió dels tres analitzats en aquest treball (Figura R.28).

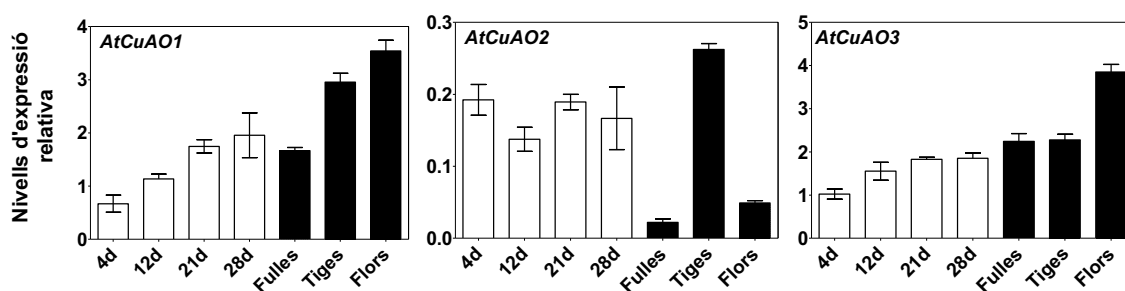


Figura R.28. Anàlisi de l'expressió dels gens *AtCuAO1-3*. L'expressió es va determinar en plàntules d'*A. thaliana*, cultivades en medi MS, de 4, 12, 21 i 28 dies d'edat (barres blanques) i en diferents òrgans de plantes de 6 setmanes d'edat cultivades en terra (barres negres). Els nivells d'expressió es van determinar per RT-PCR quantitativa utilitzant encebadors específics per cada gen. L'expressió d'aquest gens es va relativitzar a l'expressió del gen *Actina2* en cada mostra.

4.3.4 Perfil d'expressió d'*AtCuAO1-3* en resposta a diferents estímuls externs

S'ha descrit que les amino oxidases dependents de coure estan involucrades en la resposta de les plantes a estrès tan abiòtic com biòtic (revisat per Angelini i col (2010) i Cona i col (2006). Per aquest motiu, es va decidir investigar el patró d'expressió d'*AtCuAO1*, *AtCuAO2* i *AtCuAO3* en resposta a diversos estímuls externs. Per això a plàntules d'*Arabidopsis* crescudes *in vitro* se'ls va aplicar exògenament flagel·lina 22, una proteïna bacteriana que activa les defenses de la planta, o diferents fitohormones, com ABA, SA, MeJA, i el precursor d'etilè ACC. També es van incloure en aquest anàlisis plàntules que havien estat ferides (Figura R.29).

L'expressió més alta d'*AtCuAO1* es va observar en les plantes tractades amb SA després de 24 hores (al voltant de 7,5-vegades més que les plantes no tractades). En aquest punt, l'expressió d'*AtCuAO1* també va augmentar en resposta als tractaments amb MeJA, flagel·lina i ABA, encara que en menor grau (aproximadament 3,5 vegades). Cal remarcar que la inducció d'aquest gen per ABA, ja s'observava 3h després del tractament (Figura R.29). L'expressió d'*AtCuAO1* no es va veure afectada de manera considerable en les plantes ferides ni en les tractades amb ACC (Figura R.29). Els nivells dels transcrits d'*AtCuAO3* també es van veure augmentats per els tractaments amb ABA, SA, flagel·lina i MeJA, a les 8 h (Figura R.29). A a les 24 h els nivells d'expressió d'aquest gen van augmentar a les plantes tractades amb MeJA, però van disminuir a les tractades amb ABA o SA, i varen romandre gairebé constants en les tractades amb flagel·lina. L'expressió d'*AtCuAO3* va ser lleugerament inferior després de 8h en les plantes que havien estat ferides, però va tornar als nivells basals després de 24 hores, i no es va veure pràcticament afectada per el tractament amb ACC (Figura R.29). Per contra, l'expressió d'*AtCuAO2* va ser clarament induïda a les 8 h en les plantes ferides i en les tractades amb MeJA (aproximadament 12-vegades), mentre que no es va veure afectada per cap dels altres tractaments aplicats (Figura R.29).

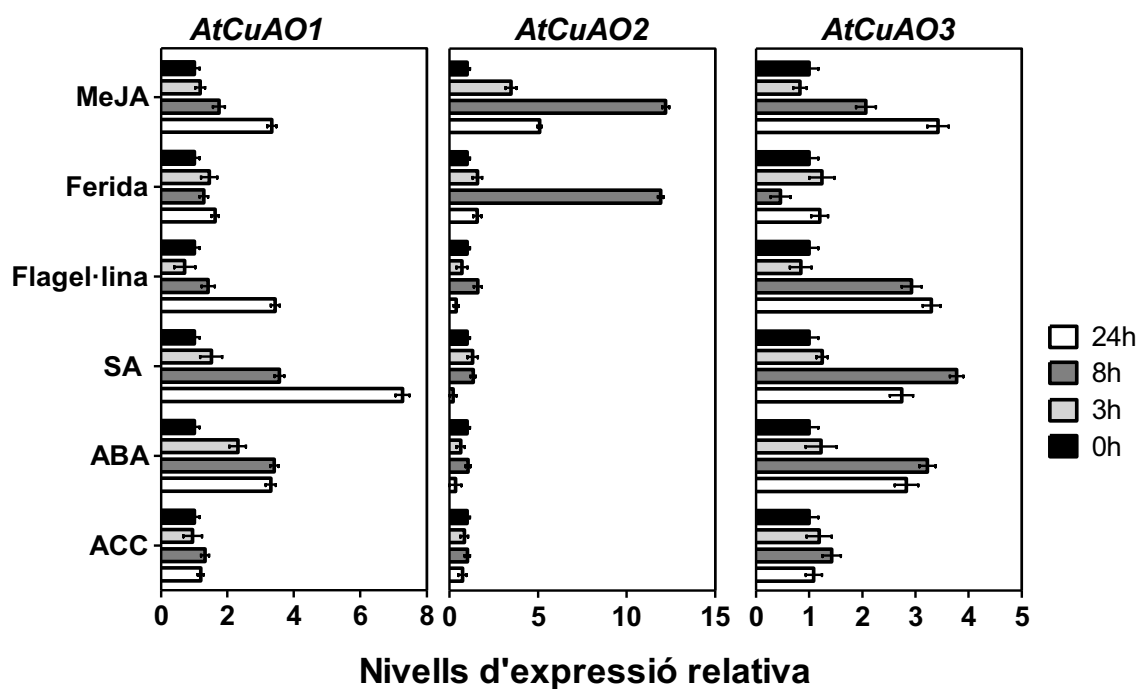


Figura R.29. Expressió dels gens *AtCuAO1-3* en plàntules d'*Arabidopsis* en resposta a diversos tractaments. Els nivells relatius de transcrits dels gens *AtCuAO1*, *AtCuAO2* i *AtCuAO3* es van determinar per PCR a temps real en plàntules d'*Arabidopsis* exposades a diferents tractament amb flagel·lina 22, SA, Meja, ACC, ABA, o ferida, després de 0, 3, 8 i 24 h de tractament. Els valors, prèviament relativitzats a l'*Actina 2*, s'expressen en relació amb el nivell d'expressió de les plantes no tractades, que se suposa que és un. Els valors són la mitjana \pm SE de tres repeticions. Les barres representen errors estàndard.

4.3.5 Localització subcel·lular d'*AtCuAO1*, *AtCuAO2* i *AtCuAO3*

AtCuAO3 conté en el seu extrem C-terminal (aminoàcids 774-776) la seqüència canònica SKL (Ser-Lys-Leu), tripèptid que participa en el direccionalment de proteïnes als peroxisomes. De fet, la localització peroxisomal d'aquesta proteïna ja s'havia demostrat prèviament en un estudi del proteoma de peroxisomes (Reumann i col., 2009; Eubel i col., 2008). Tot i això, en aquest treball s'ha confirmat experimentalment la localització subcel·lular d'aquesta proteïna, fusionant-la a YFP en el seu extrem N-terminal i expressant-la en *N. benthamiana* de forma transitòria (Figura R.30.I-L).

En estudis bioinformàtics per predicció de la localització subcel·lular de proteïnes utilitzant el programa PSORT, l'únic que permet assignar possibles localitzacions

peroxisomals, no es van identificar AtCuAO1 ni AtCuAO2 com a possibles proteïnes peroxisomals. Per AtCuAO2, aquest programa va donar una àmplia gamma de localitzacions, incloent reticle endoplasmàtic, aparell de Golgi i mitocòndries, així com un putatiu pèptid senyal amb una diana d'escissió entre els aminoàcids 1-19; mentre que per AtCuAO1, es va predir una localització extracel·lular, amb un possible lloc d'escissió entre els residus aminoàcídics 21 i 22. Per tal de determinar experimentalment la localització subcel·lular d'aquestes dues isoformes d'AtCuAO, es va fusionar la YFP, en pauta oberta de lectura a l'extrem C-terminal d'AtCuAO1 i AtCuAO2. Les proteïnes de fusió AtCuAO1-YFP i AtCuAO2-YFP es van expressar de forma transitòria, mitjançant agroinfiltració, en fulles de *N. benthamiana* (Figura R.30 A-H).

L'observació amb un microscopi confocal de les cèl·lules infectades va mostrar un patró de fluorescència puntejat dintre de les cèl·lules que expressaven AtCuAO2-YFP (Figura R.30 E), molt semblant al observat per YFP-AtCuAO3 (Figura R.30 I). Els peroxisomes es mostren de color blau (Figura R.30 F-J), degut a l'expressió d'una proteïna de fusió marcador de peroxisomes (CFP-SKL, (Nelson i col., 2007)). Tant en el cas d'AtCuAO2-YFP, com en el de YFP-AtCuAO3, totes les marques grogues observades en les cèl·lules coincideixen amb la fluorescència blava observada amb la proteïna de fusió CFP-SKL (Figura R.30 G-H i Figura R.30 H-L), confirmant que AtCuAO3 és una proteïna peroxisomal i suggerint fermament que AtCuAO2 també es localitza en els peroxisomes.

Les cèl·lules que expressaven AtCuAO1-YFP van mostrar un patró de secreció, amb la fluorescència groga localitzada principalment en la perifèria de les cèl·lules (Figura R.30 A), aquest patró també es va observar en les cèl·lules que expressaven SPG-DsRed (Figura R.30 B), que es va utilitzar com a control de secreció de proteïnes (Torrent i col., 2009). A més, la fluorescència groga d'AtCuAO1-YFP va colocalitzar amb la fluorescència vermella de la DsRed secretada (Figura R.30.C i D), el que suggereix clarament que AtCuAO1 és una proteïna extracel·lular.

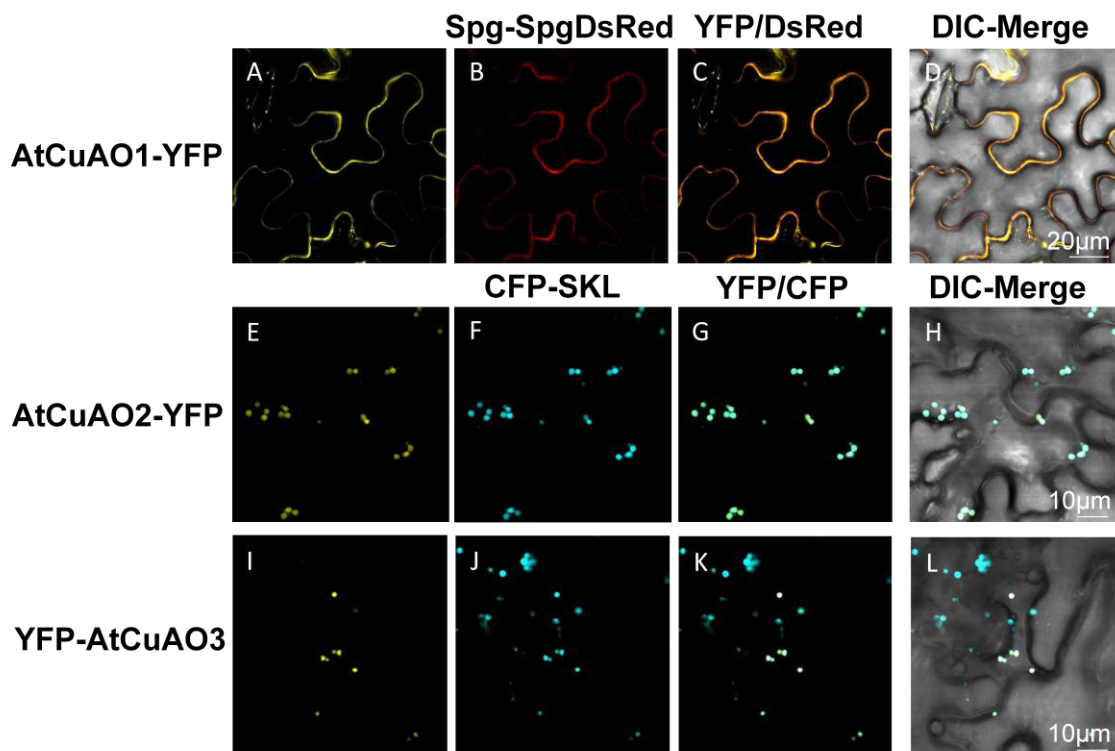


Figura R.30. Localització subcel·lular de les proteïnes AtCuAO1, AtCuAO2 i AtCuAO3 fusionades a YFP. Es mostren les imatges obtingudes mitjançant microscopia confocal on es veu, gracies a la seva fluorescència, la localització d'aquestes proteïnes en epidermis de fulles de *N. benthamiana* agroinfiltrades que expressen transitoriament CuAO1-YFP (A), el marcador de proteïnes extracel·lulars Spg-DsRed (B), AtCuAO2-YFP (E), YFP-AtCuAO3 (I) o el marcador de proteïnes peroxisomals CFP-SKL (F, J). Colocalització de les AtCuAOs fusionades a la YFP amb el marcador extracel·lular (C i D) o el peroxisomal (G, H, K i L). En les imatges de contrast diferencial d'interferència (DIC) es mostra la morfologia de les cel·lules transformades sobreposades a les imatges que mostren les proteïnes d'interès fusionades a YFP amb els corresponents marcadors (D, H i L). Les dades es van obtenir fent servir un objectiu 40x d'immersió en aigua.

5 Discussió

5 Discussió

5.1 En *Arabidopsis* l'acumulació de Put per sobreexpressió d'*ADC1* o *ADC2* indueix tolerància a congelació

Els resultats de diversos estudis correlacionals indiquen que les PAs estan implicades en la resposta de les plantes a fred. S'ha observat que, en diferents espècies vegetals, els nivells de PAs augmenten després del tractament amb fred, a més les varietats vegetals tolerants a fred mostren uns nivells de PAs superiors a les no tolerants (Szalai i col., 2009; Kasukabe i col., 2004; Shen i col., 2000; Lee, 1997; Szalai i col., 1997; Kramer i Wang, 1989; Nadeau i col., 1987). La importància de les PAs en la resposta a fred s'ha demostrat també mitjançant l'aplicació d'exògena d'aquests compostos o dels seus inhibidors biosintètics (Kim i col., 2002; He i col., 2002; Lee, 1997; Kramer i Wang, 1989). Els resultats obtinguts amb aquestes aproximacions experimentals indiquen que nivells elevats de PAs es correlacionen amb una major tolerància a baixes temperatures. D'altra banda, estudis generals enfocats a la identificació de gens i/o metabòlits relacionats amb la resposta a fred han posat de manifest la participació de la biosíntesi de PAs en aquest procés. (Kaplan i col., 2007; Vogel i col., 2005; Cook i col., 2004). Per tant l'obtenció de plantes amb nivells elevats de PAs pot ser una bona estratègia per incrementar la tolerància a fred.

En *Arabidopsis*, entre els gens de la biosíntesi de PAs, l'expressió dels quals s'indueix en resposta a baixes temperatures, es troben *ADC1* i *ADC2*, els dos gens que codifiquen ADC (Urano i col., 2003). D'altra banda s'ha vist que diferents al·lels mutants d'*adc1* i *adc2*, amb una incapacitat parcial alhora d'acumular Put en resposta al fred, eren més sensibles a aquest estrès que les plantes de tipus silvestre (Cuevas i col., 2008). En aquest treball hem estudiat l'efecte de la sobreexpressió d'*ADC1* i *ADC2* en la tolerància a congelació d'*Arabidopsis*. Per això hem utilitzat 3 línies transgèniques *35S::ADC1* (I7.12, I9.4 i I11.10), i 2 línies *35S::ADC2* (9.12 i 7.2) (Alcázar i col., 2005). En les línies *35S::ADC1* els nivells de Put eren entre 3 i 6 vegades superiors que en les plantes de tipus silvestre (Figura R.2), i no presentaven alteracions en el desenvolupament. Les línies *35S::ADC2* 9.12 i 7.2, amb increments de Put de 6 i dues vegades, respectivament (Figura R.4), es van seleccionar perquè no presentaven les

alteracions fenotípiques (menor mida de la roseta basal i elongació de la tija) observades en la resta de línies transgèniques (Alcázar i col., 2005).

Els resultats dels experiments de congelació, mostren que en *Arabidopsis* la sobreexpressió d'*ADC1* és suficient per promoure la tolerància a congelació. En les plantes *35S::ADC1* l'increment de tolerància a la congelació, en comparació amb les plantes de tipus silvestre, s'observa tant en plantes aclimatades com en no aclimatades, però aquesta diferència és més gran quan es tracta de plantes aclimatades (Figura R.3). La sobreexpressió d'*ADC2* també induïx tolerància a congelació, però només quan les plantes han estat prèviament aclimatades (Figura R.5). Aquests resultats estan d'acord en els obtinguts prèviament amb els mutants *adc1* i *adc2*, els quals eren més sensibles a congelació que les plantes de tipus silvestres, essent aquesta diferència més marcada en els mutants *adc1*, i encara més en les plantes aclimatades (Cuevas i col., 2008), i suporten la idea de que *ADC1* i *ADC2* exerceixen un paper important en la tolerància a congelació.

Es important destacar que l'increment en els nivells de Put observat en les línies transgèniques *35S::ADC1* i *35S::ADC2*, no es va traduir en un increment dels nivells de Spd i Spm, pel que podem dir que la Put té un paper intrínsec en la resposta d'*Arabidopsis* a congelació, principalment en el procés d'aclimatació. Per tant, la obtenció de plantes que acumulin Put, per sobreexpressió d'*ADC1* o d'*ADC2*, podria tenir interès agronòmic degut a la seva resistència fred i glaçades; ja que, com s'indica en la Introducció, un dels efectes detectats com a resultat del canvi climàtic és un avanç en la floració dels fruiters, el que els fa més sensibles a gelades tardanes (Peñuelas, 2004; Iglesias, 1995).

Tenint en compte que la tolerància a congelació es major en les plantes sobreexpressores d'*ADC1* que en les sobreexpressores d'*ADC2*, i que una expressió molt forta del gen *ADC2* comporta alteracions en el desenvolupament (Alcázar i col., 2005), el gen *ADC1* semblaria ser el millor candidat per a futures aplicacions biotecnològiques.

5.2 En *Arabidopsis* l'acumulació de Put per sobreexpressió d'*ADC2* indueix tolerància a deshidratació

Com s'indica en l'Introducció, actualment la sequera es un dels problemes més importants a nivell ambiental. Per tant, la necessitat de generar varietats vegetals resistents a aquest tipus d'estrès és un desafiament per a l'agricultura sostenible. *Arabidopsis thaliana* és una espècie silvestre intolerant a la sequera distribuïda en l'hemisferi nord, en els climes temperats i freds (Koornneef i col., 2004), que pertany a la família de les Brassicàcies, en la qual s'inclouen també espècies d'interès agrícola com la colza (*Brassica napus*). Per tant, *Arabidopsis* és un model útil per induir resistència a la sequera a través de la manipulació genètica, i transferir després aquest coneixement a espècies cultivables estretament relacionades.

Igual que en el cas del fred, esmentat en l'apartat anterior, hi ha diferents estudis correlacionals que demostren que les PAs estan implicades en l'adaptació de les plantes a deshidratació (Groppa i Benavides, 2008; Bouchereau i col., 1999). Fins ara, s'havia proposat que l'acumulació de Spd i Spm, a través de l'activació del flux metabòlic de Put cap aquestes PAs, permetia discriminar entre cultivars tolerants i no tolerants a sequera (Yang i col., 2007; Alcázar i col., 2006b; Capell i col., 2004). Aquest model limitaria el paper de Put a un mer precursor dels compostos protectors Spd i Spm. No obstant això, com s'indica en l'apartat anterior, en *Arabidopsis* l'acumulació de Put per sobreexpressió dels gens *ADC1* i *ADC2* no es tradueix en augments en el contingut de Spd i/o Spm (Figura R.2 i Figura R.4). Per tant, les plantes d'*Arabidopsis 35S::ADC1* i *35S::ADC2* són un model adequat per estudiar l'efecte de la Put en la tolerància a deshidratació, així com el seu possible mecanisme d'acció, independentment dels canvis en el nivells de Spd i Spm observats en altres espècies vegetals.

En aquest treball s'ha estudiat com afecten les concentracions elevades de Put, per sobreexpressió d'*ADC1* i d'*ADC2*, en la resposta a l'estrès per sequera en *Arabidopsis*. Per això s'han utilitzat les línies transgèniques indicades en el apartat anterior, més les línies *35S::ADC2: 2.1* i *3.6*, amb un contingut de Put 63 i 37 vegades més alt que les plantes de tipus silvestre, respectivament. És important assenyalar que el treball es va realitzar amb plantes crescudes en terra i sotmeses a una disminució gradual de la disponibilitat d'aigua al sòl, ja que els resultats poden variar segons la forma en què s'indueix l'estrès (Wilson i col., 2009). Molts dels treballs que estudien la tolerància a

deshidratació en *Arabidopsis* s'han realitzat induint estrès osmòtic mitjançant el tractament amb concentracions elevades de mannitol o polietilenglicol (PEG-6000), procediment que, a més de provocar plasmòlisi i dany cel·lular (Verslues i col., 2006; Munns, 2002), pot ser tòxic per a la planta (Verslues i col., 1998), provocant efectes no relacionats amb l'estrès hídric. Cal indicar que dels 806 gens dels quals n'incrementa l'expressió en experiments d'estrès hídric, només 27 són corregulats quan varia la manera d'induir l'estrès: tractament amb concentracions altes de mannitol, fent servir un paper de filtre per tal de deshidratar ràpidament la planta o per un dèficit gradual d'aigua en el sòl (Bray, 2004).

Els resultats obtinguts demostren que només l'acumulació d'alts nivells de Put, induïts per sobreexpressió d'*ADC2*, augmenten la tolerància a deshidratació d'*Arabidopsis* (Figura R.6 i Figura R.7). A més, en les línies transgèniques *35S::ADC2* el grau de tolerància era proporcional als nivells de Put, de manera que les línies amb nivells més elevats de la diamina (línies 2.1 i 3.6) són les que presenten major tolerància a deshidratació. Aquestes dades demostren clarament que la tolerància a deshidratació està relacionada directament amb el contingut de Put, sempre que aquesta sigui produïda via *ADC2* (Figura R.4, Figura R.6 i Figura R.7), i que canvis moderats en els nivells de Put, com els observats en les plantes de tipus silvestre i la línia 7.2 exposades a deshidratació, o la Put produïda via *ADC1*, no confereixen tolerància a sequera. Sembla que hi hauria un llindar en la concentració de Put produïda via *ADC2*, a partir del qual es presentaria aquest fenotip, que no s'aconsegueix quan el gen *ADC2* s'expressa sota el control del seu propi promotor ni amb la sobreexpressió constitutiva del gen *ADC1*. Aquesta "hipòtesi del llindar" ja ha estat proposada per altres autors en arròs, on es va veure que la sobreexpressió d'*ADC* de *Datura stramonium* comportava un augment dels nivells de Put, fins a un nivell màxim, a partir del qual es convertia en Spd i Spm, que actuarien com a compostos protectors (Capell i col., 2004). Els nostres resultats demostren que, en *Arabidopsis*, l'acumulació de Put via *ADC2*, és suficient per conferir protecció davant la deshidratació, ja que els nivells de Spd i Spm no augmenten durant l'estrès (Figura R.14), el que ens permet afirmar que en aquesta espècie vegetal la Put té un efecte protector intrínsec davant l'estrès hídric.

5.3 La tolerància a deshidratació de les plantes sobreexpressores d'*ADC2* podria ser deguda en part a una deficiència en GAs

Com s'ha dit, les plantes sobreexpressores d'*ADC2* presentaven un fenotip de nanisme degut a que eren deficients en GAs bioactives (GA4 i GA1), com a conseqüència d'una menor expressió dels gens que codifiquen les dioxigenases (GA20ox i GA3ox) implicades en les últimes etapes de la biosíntesi d'aquestes GAs (Alcázar i col., 2005).

Es ben conegut que les GAs tenen un paper important en el desenvolupament vegetal durant tot el cicle ontogènic de les plantes, però la seva implicació en la resposta a estrès ha estat menys estudiada. Malgrat això hi ha dades que relacionen els nivells de GAs bioactives amb la tolerància a diferents tipus d'estrès. Així, un mutant nan d'ordi, deficient en la conversió de GA₂₀ i GA₉ en GA₁ i GA₄, respectivament, que són les etapes catalitzades per les dioxigenases, és més tolerant a l'estrès per calor i sequera que les plantes de tipus silvestre, i aquesta tolerància es redueix per tractament amb GA₃ (Vettakkorumakankav i col., 1999). A més, el tractament de les plantes d'ordi de tipus silvestre amb paclobutrazol, un inhibidor de la biosíntesi de GAs, incrementa la tolerància a estrès (Vettakkorumakankav i col., 1999). En *Arabidopsis*, el mutant de biosíntesi de GAs *gal-3* és més tolerant a l'estrès salí que les plantes de tipus silvestre, i aquesta tolerància disminueix per aplicació exògena de GA₃ (Magome i col., 2004). Per tant, la resistència a deshidratació mostrada per les línies sobreexpressores d'*ADC2* 2.1 i 3.6 podria venir donada pels seus baixos nivells de GAs bioactives. Per comprovar aquesta hipòtesi es va analitzar la tolerància a deshidratació de les línies 35S::*ADC2* tractades o no amb GAs. Com es veu en la Figura R.9, de manera similar al que s'havia observat en els mutants d'ordi i d'*Arabidopsis* deficients en GAs, l'aplicació exògena de GA₃ va revertir parcialment el fenotip de tolerància a deshidratació de les línies transgèniques, però no es va arribar als nivells detectats en les plantes de tipus silvestre. Aquests resultats indiquen que la deficiència de GAs podria ser la causa, almenys en part, de la tolerància a deshidratació induïda per l'acumulació de Put via *ADC2* (Figura D.1). No obstant això, el fet que la tolerància a deshidratació fos més gran en les plantes transgèniques tractades amb GAs que en les plantes de tipus silvestre no tractades amb l'hormona, suggereix que hi ha d'haver algun altre mecanisme, independent de GAs, implicat en aquesta resposta. En plantes que sobreexpressen el factor de transcripció

DDF1, pertanyent a la família AP2/ERF (Magome i col., 2004), que com s'indica en la Introducció regulen la resposta a estrès abiòtic per una ruta independent d'ABA, s'ha observat també hi ha una correlació inversa entre el contingut de GAs i la tolerància a estrès salí. En les plantes *35S::DDF1* els nivells de GAs bioactives estan disminuïts en relació a les plantes de tipus silvestre, però l'expressió de *GA20ox* i *GA3ox* és superior en les primeres (Magome i col., 2004). Aquest fet també s'ha descrit en mutants deficientes en la biosíntesi o resposta a GAs, mentre que en mutants amb nivells elevats de GAs o amb una resposta incrementada a l'hormona l'expressió de *GA20ox* i *GA3ox* està disminuïda (Yamaguchi, 2008; Olszewski i col., 2002; Hedden i Phillips, 2000). Això és degut a un mecanisme de regulació per retroalimentació negativa que permet mantenir l'homeòstasi de GAs i està mediat per les proteïnes DELLA (Zentella i col., 2007), una família de proteïnes (5 en Arabidopsis: GAI, RGA, RGL1, RGL2 i RGL3) que actuen com a repressores en la senyalització de GAs. Els treballs d'Achard i col. (2008; 2006) amb un quàdruple mutant DELLA indiquen que la tolerància a salinitat de les plantes deficientes ens gibberel·lines podria estar mediada per aquestes proteïnes reguladores. Aquest podria ser també el cas en les plantes *35S::DDF1*, en les que s'observa un marcat increment en l'expressió de *RGL3* (Magome i col., 2008). Tanmateix, en les plantes *35S::ADC2* no funciona el mecanisme de regulació per retroalimentació negativa, ja que tant els nivells de GAs bioactives com l'expressió dels gens que codifiquen *GA20ox* i *GA3ox* estan reduïts (Alcázar i col., 2005). A més, en aquestes plantes (línia 2.1) s'ha observat que l'expressió de *DDF1* i altres factors de transcripció de la família AP2/ERF està disminuïda (Alcázar i col., 2005), el que suggereix que el mecanisme de regulació de la biosíntesi de GAs i de la resposta a estrès mediat per Put ha de ser diferent del de *DDF1*.

5.4 L'acumulació de putrescina per sobrepressió d'*ADC2* regula l'obertura estomàtica i la pèrdua d'aigua per transpiració

Per comprendre els processos fisiològics subjacents a la tolerància a la sequera observada en les línies transgèniques *35S::ADC2*, i elucidar possibles mecanismes implicats en aquesta resposta, es van determinar diversos paràmetres relacionats amb l'estat hídric de les plantes. Els resultats obtinguts mostren que, després d'un període de deshidratació de 14 dies, el contingut relatiu d'aigua (RWC) en les línies *35S::ADC2*

tolerants a la deshidratació (2.1 i 3.6) era significativament superior que en les no tolerants (línia 7.2, línies 35S::ADC1 i plantes de tipus silvestre) (Figura R.10), mentre que la taxa de transpiració era menor (Figura R.12). A més, l'obertura estomàtica en les línies tolerants 2.1 i 3.6 era menor que en les plantes de tipus silvestre (Figura R.13). Aquests resultats indiquen que l'acumulació d'alts nivells de Put, via ADC2, dona lloc a una menor pèrdua d'aigua per transpiració, com a resultat d'una menor obertura estomàtica, que es tradueix en un increment de la tolerància a deshidratació. S'ha descrit que nivells alts de PAs (Put, Spd, Spm) inhibeixen l'obertura dels estomes i indueixen el seu tancament (Liu i col., 2000). Mitjançant experiments de "patch-clamp", aquests autors van demostrar que l'acumulació intracel·lular de PAs inhibia l'entrada de K^+ a l'interior de les cèl·lules guarda. Això indicaria l'existència d'una connexió entre condicions d'estrès, nivells de PAs i regulació de l'obertura estomàtica, que podria explicar la tolerància a deshidratació observada en les línies 35S::ADC2. Aquesta hipòtesi vindria recolzada per altres publicacions que descriuen la regulació de l'activitat dels canals iònics de la membrana per concentracions elevades de PAs (Zhao i col., 2007; Shabala i col., 2007). Alternativament, la degradació de la Put a través d'amino oxidases dependents de coure (CuAOs) podria contribuir al tancament estomàtic tal com descriuen Ann i col. (2008) en faves. La degradació de PAs per amino oxidases produeix H_2O_2 , que com es ben conegut està implicat en la resposta de les plantes tant a estrès abiòtic com biòtic (Cona i col., 2006). El H_2O_2 indueix el tancament estomàtic i, consegüentment, major tolerància a deshidratació (Kwak i col., 2003). En les cèl·lules de guarda de *Vicia faba* el H_2O_2 produït per degradació de Put mediada per CuAO és essencial per el tancament estomàtic induït per ABA (Ann i col. 2008).

Una altra possibilitat per explicar la menor obertura estomàtica observada en les línies transgèniques que acumulen alts nivells de Put, seria l'activació de la fosfolipasa C. Aquest enzim trenca el fosfatidilinositol 4,5-difosfat per produir inositol 1,4,5-trifosfat (IP3) i diacilglicerol unit a membranes (DeWald i col., 2001; Otterhag i col., 2001; Drobak i Watkins, 2000). L'acumulació d'IP3 activa la ruta de transducció de senyal a estrès, a causa de l'alliberament de Ca^{2+} de les reserves intracel·lulars i l'activació dels canals de K^+ , el que es tradueix en la inducció del tancament estomàtic (Blatt i col., 1990; Gilroy i col., 1990). Els nivells d'IP3 estan regulats tant per la

síntesi, a partir de fosfatidilinositol 4,5-bifosfat (Munnik i col., 1998), com per la degradació, mediada per fosfatases (Berdy i col., 2001; Quintero i col., 1996; Gillaspay i col., 1995). En animals, les PAs augmenten els nivells d'IP3 perquè activen la fosfolipasa C (Hedeskov i col., 1991; Spath i col., 1991) i la fosfatidilinositol fosfat 5-quinasa, que catalitza la producció del precursor de IP3 (inositol 4,5-P) (Singh i col., 1995), alhora que inhibeixen l'activitat de la IP3 5-fosfatasa (Seyfred i col., 1984). Wilson i col. (2009) han descrit que mutants d'*Arabidopsis* amb pèrdua de funció per al gen que codifica SAL1, un enzim que pot desfosforilar dinucleòtids fosfat o inositol fosfat, presenten major tolerància a deshidratació que les plantes de tipus silvestre en assajos similars als realitzats en aquest treball. El mutant de SAL1, *alx8*, presenta nivells molt augmentats de Put (15,2 vegades més que el tipus silvestre), que coincideixen en un increment en l'expressió d'*ADC2*. Els autors suggereixen que els nivells elevats de Put podrien ser els responsables de la tolerància a deshidratació observada en els mutants, i consideren la possibilitat que nivells elevats de Put podrien modificar els nivells de fosfoinositol.

5.5 L'acumulació de Put per sobreexpressió d'*ADC2* no altera els nivells d'ABA en plantes d'*Arabidopsis*

Es un fet prou conegut que l'ABA regula la resposta de les plantes a deshidratació mitjançant la regulació de l'obertura estomàtica i de l'expressió de diversos centenars de gens, que comporta l'alteració del perfil de metabòlits. En treballs previs realitzats al laboratori es va observar que l'expressió d'*ADC2* s'indueix durant la deshidratació per una via dependent d'ABA, ja que els mutants *aba* i *abi*, deficitaris en la biosíntesi i resposta a l'ABA, respectivament, tenen bloquejada la inducció del gen *ADC2* per deshidratació (Alcázar i col., 2006a). Com s'indica en l'apartat 5.3, l'expressió de diversos factors de transcripció de la família AP2/ERF està reprimida en les línies transgèniques *35S::ADC2* tolerants a deshidratació (línea 2.1) (Alcázar i col. 2005), el que suggeriria que en aquestes plantes la resposta a sequera esta regulada per una via dependent d'ABA. Considerant totes aquestes dades, seria lògic pensar que la tolerància a deshidratació observada en la línies *35S::ADC2*, com a resultat d'una menor taxa de transpiració i obertura estomàtica, podria ser deguda a un major contingut d'ABA en les mateixes. No obstant això, les dades obtingudes en aquest treball no donen suport a

aquesta hipòtesi, ja que els nivells d'ABA de les línies *35S::ADC2* tolerants o no a deshidratació són similars, tant en condicions normals de cultiu (Figura R.15), com durant la deshidratació (Figura R.16). Al llarg d'aquest procés s'observa un increment molt marcat dels nivells endògens d'ABA en el moment en què les plantes presenten els primers símptomes de dèficit hídric, el que passa més tard a les línies tolerants a deshidratació que a les no tolerants (Figura R.10 i Figura R.16). Per tant, podem concloure que la tolerància a sequera induïda per acumulació de Put en les línies *35S::ADC2* no és deguda a un increment en els nivells d'ABA.

5.6 La sobreexpressió d'*ADC2* en *Arabidopsis* induïx hipersensibilitat a ABA

Una possibilitat per explicar el fenotip observat en les plantes *35S::ADC2* sobre productores de Put, seria que aquestes línies transgèniques fossin hipersensibles a ABA i, conseqüentment, la mateixa, o menor, concentració de l'hormona induiria una major resposta en les línies *35S::ADC2* que acumulen Put, això explicaria la seva major tolerància a deshidratació. Els estudis d'obertura estomàtica en resposta a diferents concentracions d'ABA mostren corbes paral·leles en els casos de les línies transgèniques tolerants o no a deshidratació (Figura R.17), fet que semblaria estar en desacord amb d'hipòtesi plantejada. No obstant això, aquests resultats han de ser considerats amb precaució, ja que el fet de que les línies que acumulen Put tinguin més tancats els estomes que les plantes de tipus silvestre de forma constitutiva fa que, en les primeres, sigui difícil observar increments del tancament estomàtic. Per tant, aquests resultats no poden ser considerats conclouents. De fet, en les plantes híbrides *aba2-3* x *35S::ADC2* es recupera parcialment el fenotip de sensibilitat a deshidratació dels mutants *aba 2-3*, deficients en ABA (Figura R.18), el que confirma que la tolerància a aquest estrès observada en les plantes *35S::ADC2* no és dependent de la concentració d'ABA, i suggeriria que aquestes plantes presenten una major sensibilitat a l'hormona. Per confirmar aquesta hipòtesi es van analitzar altres paràmetres relacionats amb la sensibilitat a ABA, com son la germinació i el creixement de les arrels en presència d'hormona exògena.

El percentatge de germinació de les llavors en un medi complementat amb 0,5 μM d'ABA va ser més baix en les línies transgèniques sobreproductores de Put (*35S::ADC2* 2.1 i 3.6) que en les plantes de tipus silvestre. A més l' IC_{50} d'ABA en la germinació va

ser de 0,5 μM per a les llavors de línies transgèniques i de 1 μM per les de plantes de tipus silvestre (Figura R.20). D'altra banda, l'inhibició del creixement de les arrels després d'un període en medi complementat amb ABA va ser més marcada en les línies transgèniques que en les plantes de tipus silvestre (Figura R.19). Totes aquestes dades indiquen que les línies transgèniques tolerant a deshidratació són més sensibles a ABA que les plantes de tipus silvestre. També es va determinar l'expressió de diferents gens de resposta a ABA (*ABI1*, *ABI2*, *HABI1*, *PP2C*, *RD29B* i *OST1*) després de 3h de tractament amb l'hormona, es va observar que l'expressió d'aquests gens es veu incrementada en les línies transgèniques *35S::ADC2* en comparació a les plantes de tipus silvestre (Figura R.21). Aquests resultats estan d'acord amb els obtinguts en els estudis de germinació i creixement de les arrels, i suporten l'idea de que les plantes que acumulen Put, per sobreexpressió d'*ADC2* són hipersensibles a ABA, això justificaria, al menys en part, la seva elevada tolerància a estrès hídric. Cosa que no és d'estranyar si considerem que tots els mecanismes esmentats en l'apartat 5.3 per explicar la reducció en l'obertura estomàtica i la tolerància a deshidratació, induïdes per els alts nivells de Put acumulats en les línies transgèniques *35S::ADC2* (activació de canals iònics, producció de H_2O_2 , producció de IP_3), són també induïts per ABA (Kwak i col., 2003).

Considerats conjuntament els resultats d'aquesta part del treball indiquen que, en *Arabidopsis*, l'acumulació d'elevats nivells de Put, per sobreexpressió d'*ADC2*, dona lloc a una inhibició de la biosíntesis de GAs i un increment de la sensibilitat a ABA, que podrien explicar la tolerància a deshidratació observada en aquestes plantes, fet que suggereix una potencial interacció entre l'acció de l'ABA i la biosíntesis de GAs (Figura D.1), tot i que fan falta més dades per tal de conèixer com podrien produir-se aquesta interacció.

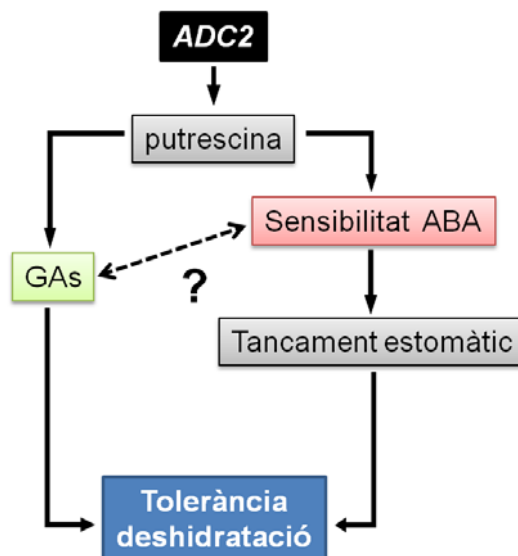


Figura D.1. Model simplificat per explicar l'acció de la Put produïda via ADC2 en la resposta a deshidratació d'Arabidopsis.

5.7 Les proteïnes ADC1 i ADC2 presenten diferent localització subcel·lular

Els resultats d'aquest treball demostren que *ADC1* i *ADC2* tenen un paper important en la tolerància a baixes temperatures, però només *ADC2* està implicat en la resposta a deshidratació d'Arabidopsis. Així, tot i que el dos gens codifiquen per a dos proteïnes homologues, sembla que tindrien un paper diferent en la resistència a la sequera i un paper semblant en resposta a fred. Aquestes diferències, podrien venir donades, almenys en part, per una diferent localització subcel·lular de les proteïnes. Els estudis de localització *in vivo* de les proteïnes de fusió *ADC1-GFP* i *ADC2-CFP*, suggereixen que *ADC2* és una proteïna cloroplàstica, mentre que *ADC1* sembla localitzar-se en nucli i citoplasma (Figura R.22). La localització en citoplasma i cloroplasts està d'acord amb estudis previs, realitzats per fraccionament subcel·lular, que localitzaven l'activitat ADC de diferents espècies vegetals en el citoplasma i, en menor proporció, en cloroplasts i mitocondris (Slocum i Furey, 1991).

Pel que fa a la presència d'ADC en el nucli, com s'observa en el cas d'*ADC1*, s'ha descrit també en teixits no fotosintètics de tabac, i la seva funció s'ha relacionat amb la síntesi de d'alcaloides. No obstant això, *Arabidopsis*, a diferència de tabac, no sintetitza alcaloides indòlics de tipus nicotina. En animals, les PAs són constituents importants del nucli (Mach i col., 1982) i regulen la fosforilació de proteïnes, de manera que tenen un paper en la transducció de senyals (Meksuriyen i col., 1998). En plantes de blat de

moro, Hirasawa i Suzuki (1985) van demostrar la presència de PAs en el nucli associades a la cromatina. Mentre que en plantes de pèsol, s'ha descrit que la Spm estimula l'activitat d'una quinasa nuclear (Datta i col., 1987). Per tant, es podria especular, que la Put sintetitzada al nucli via ADC1, podria tenir una funció senyalitzadora.

La presència d'ADC en cloroplasts s'ha descrit també en civada (Borrell i col., 1995) i en tabac (Bortolotti i col., 2004). A més en tabac, de manera similar a l'observada en *Arabidopsis*, l'ADC s'ha localitzat també en nucli i citoplasma (Bortolotti i col., 2004). En espinacs i civada s'ha detectat la presència de PAs en membranes tilacoidals (Legocka i Zajchert, 1999; Kotzabasis i col., 1993), associades, en ambdós casos, al fotosistema II. A més, en *Helianthus tuberosus* s'ha descrit la presència d'una transglutaminasa plastídica, que catalitza la incorporació de PAs en proteïnes estromals i tilacoidals (Del Duca i col., 1995). D'altra banda, resultats obtinguts amb fulles de civada, indiquen que el paper protector de les PAs durant la senescència induïda per estrès osmòtic, és deguda al fet que aquests compostos inhibeixen la pèrdua de clorofil·les i estableixen les membranes tilacoidals (Borrell i col., 1995; Besford i col., 1993). L'estabilització de les membranes cloroplàstiques per PAs podria ajudar a entendre l'efecte protector de la Put acumulada per via ADC2. D'altra banda, és important destacar que la proteïna ADC2 s'acumula en gran quantitat en les cèl·lules oclusives dels estomes (Figura R.22), les úniques cèl·lules de l'epidermis que contenen cloroplasts, això podria explicar l'efecte exercit per de l'acumulació de Put produïda via ADC2 en l'obertura estomàtica i la tolerància a deshidratació descrites en els apartats anteriors.

5.8 Caracterització funcional de tres gens d'*Arabidopsis* (*AtCuAO1-3*) que codifiquen amino oxidases dependents de coure

Com s'indica a la Introducció, els nivells de PAs en plantes estan regulats per la biosíntesi i per la degradació, portada a terme per les amino oxidases (AOS). Per tant, una altra estratègia per incrementar els nivells de Put podria ser inhibir les amino oxidases dependents de coure (CuAOs) que degraden la diamina. En *Arabidopsis* hi ha 10 proteïnes anotades com putatives CuAOs, però només una (*ATAO1*) ha estat

caracteritzada (Møller i McPherson, 1998), en aquest treball hem caracteritzat funcionalment 3 d'aquestes CuAOs.

Durant molt de temps s'ha considerat que, en plantes, la degradació de les PAs tenia lloc a l'espai intercel·lular, ja que les activitats PAO i CuAO s'han detectat majoritàriament a la fracció cel·lular obtinguda de la paret (Slocum i Furey, 1991). Tanmateix, cap de les cinc isoformes de PAO caracteritzades en *A. thaliana* s'ha trobat en aquest espai. Mentre que per a dos d'elles, AtPAO1 i AtPAO5, s'ha predit una localització citoplasmàtica (Fincato i col., 2010), les altres tres (AtPAO2, AtPAO3, AtPAO4) s'han localitzat en els peroxisomes (Fincato i col., 2011; Moschou i col., 2008; Kamada-Nobusada i col., 2008). D'altra banda totes les AtPAOs caracteritzades porten a terme l'oxidació les PAs a través de la retroconversió, i no poden catabolitzar les PAs per oxidació terminal (Fincato i col., 2010). Per tan, sembla interessant saber si hi ha alguna AO que dugui a terme aquest tipus d'oxidació terminal en els peroxisomes d'Arabidopsis i conèixer com es du a terme l'oxidació de les PAs en l'apoplast d'aquesta planta model. En aquest treball hem caracteritzat tres dels deu gens que codifiquen putatives CuAOs en Arabidopsis (AT1G62810, AT1G31710 i AT2G42490), als que hem anomenat *AtCuAO1*, *AtCuAO2* i *AtCuAO3*. Tal com es pot observar en la Figura R.27, les proteïnes de fusió purificades *AtCuAO1*-MYC9-His6, *AtCuAO2*-MYC9-His6 i *AtCuAO3*-MYC9-His6 poden oxidar la Put i la Spd *in vitro*, amb el corresponent alliberament de H₂O₂. Tot i que la Put ha estat descrita com el millor substrat per a les CuAOs, també s'ha descrit l'oxidació de la Spd per aquests enzims, tant en animals (Seiler, 2004) com en plantes (Pietrangeli i col., 2007). En tots els casos, l'oxidació d'ambdues poliamines es va inhibir per tractament amb aminoguanidina, un inhibidor competitiu d'AOs que interacciona amb el cofactor TPQ específic de les CuAOs, i amb 8-hidroxiquinolina, un agent complexant de coure (Figura R.27). Per tant, podem concloure que *AtCuAO1*, *AtCuAO2* i *AtCuAO3* codifiquen proteïnes funcionals amb activitat amino oxidasa dependent de coure, que són capaces d'oxidar la Put i la Spd però no la Spm.

5.9 AtCuAO2 i AtCuAO3 es localitzen als peroxisomes on podrien cooperar amb les PAOs en el catabolisme de les PAs,.

Dos de les tres CuAOs d'Arabodopsis descrites en l'apartat anterior, AtCuAO2 i AtCuAO3, es localitzen als peroxisomes (Figura R.30). La proteïna producte d'AT2G42490 (AtCuAO3), ja havia estat descrita com a una proteïna peroxisomal en estudis de proteòmica (Reumann i col., 2009; Eubel i col., 2008). Això no és sorprenent, ja que aquesta proteïna conté, al seu extrem C-terminal, la seqüència SKL descrita com una senyal de direccionament a peroxisomes. Normalment, les proteïnes que s'acumulen en peroxisomes, contenen en la seva seqüència d'aminoàcids una senyal de direccionament a aquest compartiment subcel·lular, que pot ser de tipus 1 (PST1) o del tipus 2 (PTS2). PTS1 és una seqüència tripeptídica SKL, o una variant d'aquesta, localitzada al final de l'extrem C-terminal de la majoria de proteïnes de la matriu peroxisomal; mentre que PTS2 és una seqüència nonapeptídica amb un prototip RLx5HL, que es troba a l'extrem N-terminal de les proteïnes o a prop seu (Reumann i col., 2009). AtCuAO2 no conté cap de les seqüències senyal de direccionament a peroxisomes descrites, i els programes informàtics tampoc prediuen una possible localització peroxisomal per aquesta proteïna. Tanmateix, el patró de localització subcel·lular de la proteïna de fusió AtCuAO2-YFP *in vivo* és molt semblant al observat per a YFP-AtCuAO3, i la fluorescència observada per AtCuAO2-YFP colocalitza amb l'observada per el marcador de peroxisomes CFP-SKL (Figura R.30. H i L), el que suggereix que AtCuAO2 és una proteïna peroxisomal. Cal tenir en compte que els programes informàtics per fer prediccions de localització subcel·lular de proteïnes tenen limitacions i no permeten identificar com a peroxisomals les proteïnes de la membrana d'aquests orgànuls o les que van a la matriu per mecanismes "piggy-backing" i que, per tan, no tenen les senyals PST1 o PST2. També cal remarcar que la predicció de la localització d'algunes proteïnes peroxisomals és incorrecta per un coneixement insuficient de les variants de les PSTs. De fet, hi ha diverses proteïnes que no tenen PTS que es localitzen als peroxisomes (Reumann i col., 2009).

Tot i que AtCuAO3 ja havia estat descrita com una proteïna peroxisomal, no hi ha dades experimentals sobre la seva funció. Els resultats d'aquest treball mostren que aquesta proteïna, com l'AtCuAO2, és una amino oxidasa funcional dependent de coure, que oxida Put i Spd però no Spm (Figura R.27). Aquest fet es especialment rellevant, ja

que, com s'ha dit anteriorment, cap de les tres AtPAOs localitzades en peroxisomes és capaç d'oxidar les PAs a través del catabolisme terminal (Fincato i col., 2010). AtPAO2 i AtPAO3 converteixen Spm a Spd i aquesta a Put, mentre que AtPAO4 retroconverteix Spm a Spd sense convertir aquesta a Put (Takahashi i Kakehi, 2010). Per tant, l'oxidació terminal de les PAs en els peroxisomes està mediada exclusivament per CuAOs, concretament AtCuAO2 i AtCuAO3, que d'aquesta manera evitaran l'acumulació de Put, la qual s'ha descrit que té un efecte inhibidor sobre el procés de retroconversió (Moschou i col., 2008).

Les AOs de plantes estan implicades en diferents processos fisiològics a través dels seus productes de reacció com són el H₂O₂ o l'àcid γ -aminobutíric (GABA) (Cona i col., 2006). El H₂O₂ és un producte comú en totes les reaccions del catabolisme de PAs, que es produeix a l'apoplast i en compartiments intracel·lulars, i té un paper clau en el desenvolupament vegetal i en la defensa (Yesbergenova i col., 2005; Apel i Hirt, 2004; Mittler, 2002). El GABA es forma a partir del 4-aminobutanal, produït per l'oxidació de la Put i de la Spd mediada, respectivament, per CuAOs o PAOs que duen a terme l'oxidació terminal. El 4-aminobutanal cicle espontàniament a Δ^1 -pirrolina, que posteriorment pot ser metabolitzada a GABA per l'acció d'una aldehid deshidrogenasa (ADH) (Sebela i col., 2000). Cap de les PAOs d'*Arabidopsis* descrites fins al moment catalitza l'oxidació terminal de la Spd, per tant, per aquesta ruta metabòlica, el GABA només es podria formar a partir de l'oxidació de la Put mediada per CuAOs. Aquest procés es podria dur a terme en els peroxisomes, on AtCuAO2 i AtCuAO3 poden oxidar la Put, i la formació del GABA pot ser catalitzada per una betaïna-ADH (BADH) localitzada en aquest orgànel (ALDH10A9) (Missihoun i col., 2011; Reumann i col., 2009) que té activitat tan betaïna com amino-aldehid deshidrogenasa, i pot oxidar 4-aminobutanal (Missihoun i col., 2011) (Figura D.2). El GABA, que també es sintetitza al citosol per acció de l'enzim glutamat descarboxilasa (Bouché i col., 2004), es produeix ràpidament i en gran quantitat en resposta a estrès biòtic i abiòtic, i s'ha associat a diferents processos fisiològics, incloent la dissuasió davant dels insectes, protecció contra l'estrès oxidatiu i senyalització. Per exemple, en la soja, el GABA produït pel catabolisme mediat per les CuAOs s'ha relacionat amb la protecció de les plantes davant l'estrès salí (Xing i col., 2007).

En conjunt, aquests resultats suggereixen que, en els peroxisomes, es dona una cooperació entre les dos rutes catabòliques de PAs (PAOs i CuAOs) que permet mantenir la seva homeòstasi. La idea de la cooperació entre aquestes dos vies metabòliques ja s'havia descrit anteriorment en l'apoplast de tabac (Tisi i col., 2011, 2008; Paschalidis i Roubelakis-Angelakis, 2005) però, aquesta és la primera vegada que es descriu en un orgànel·lular intracel·lular.

5.10 En l'apoplast d'Arabidopsis l'oxidació de les PAs es porta a terme principalment per CuAOs

L'anàlisi de l'estructura primària d'AtCuAO1, prediu una localització extracel·lular, que s'ha confirmat experimentalment *in vivo* amb la proteïna de fusió AtCuAO1-YFP (Figura R.30.A). La proteïna de fusió AtCuAO-MYC9-HIS6 sembla ser igual d'activa amb Put que amb Spd com a substrat (Figura R.27). ATAO1, l'única isoforma d'AtCuAO caracteritzada fins al moment, també s'ha proposat com a proteïna extracel·lular que oxida preferentment Put, però també reconeix Spd com a substrat (Møller i McPherson, 1998).

A l'apoplast de blat de moro i arròs s'ha descrit la presència de PAOs que catalitzen l'oxidació terminal de les PAs (Ono i col., 2012; Cervelli i col., 2000). Però, com s'ha indicat prèviament, ninguna de les isoformes de PAO caracteritzades en Arabidopsis es localitza a l'espai extracel·lular. Per tant, la presència de CuAOs funcionals a l'apoplast d'Arabidopsis suggereix que, en la paret cel·lular d'aquesta planta, l'oxidació de les PAs es du a terme principalment (o exclusivament) per aquest tipus d'enzims, tot i que no es pot descartar completament la implicació d'altres AOs.

5.11 Possible especialització cel·lular d'AtCuAO1, AtCuAO2 i AtCuAO3

Les dos CuAOs peroxisomals mostren diferent preferència pel que fa al substrat. Mentre que AtCuAO3 mostra major activitat amb Put que amb Spd com a substrat, AtCuAO2 no presenta diferències (Figura R.27). El patró d'expressió dels dos gens que codifiquen aquestes proteïnes, al llarg del desenvolupament (Figura R.28) i en resposta a diferents estímuls externs (Figura R.29), es també diferent, el que suggereix que les dos AtCuAOs peroxisomals poden tenir funcions diferents. L'expressió d'*AtCuAO3* en

plàntules augmenta des de els 4 dies d'edat fins als 28, però aquest increment no s'observa en el cas d'*AtCuAO2* (Figura R.28), el que porta a pensar que *AtCuAO3* podria tenir més importància en el desenvolupament que *AtCuAO2*. Per altra banda, l'expressió d'*AtCuAO3* augmenta en resposta al tractament amb ABA, MeJa, SA i flagel·lina, mentre que la d'*AtCuAO2* s'indueix marcadament per ferida i tractament amb MeJa (Figura R.29), per tan aquests enzims podrien tenir rellevància en la resposta de defensa de la planta enfront situacions estrès, essent *AtCuAO2* més específicament involucrada en la resposta a l'estrès mecànic i a l'atac per herbívors. El paper de les CuAOs en la resposta a ferides ja ha estat descrita en diverses espècies vegetals. Així, en plàntules de cigrò l'expressió de *CuAO* es veu fortament induïda per ferida i àcid jasmònic (Rea i col., 2002). Mentre que, en plàntules de cacauet, les ferides comporten un augment en els nivells d'activitat de CuAO, ADH i peroxidasa, així com en els nivells de Put, Spd i GABA (Petrivalsky i col., 2007). En tabac, tan PAO com CuAO s'ha descrit que participen en el procés de cicatrització de ferides (Tisi i col., 2008; Yoda i col., 2006).

Cal remarcar que, en plantes adultes, el patró d'expressió d'*AtCuAO3* (Figura R.28) és semblant al descrit per *AtPAO3*, un gen que codifica una de les tres *AtPAOs* peroxisomals (Takahashi i col., 2010). La major expressió d'aquest dos gens s'ha detectat en flors, i es induïda per MeJa, SA, flagel·lina i ABA (Moschou i col., 2008). La inducció per ABA s'ha vist també en els altres dos gens que codifiquen *AtPAOs* peroxisomals (*AtPAO2* i *AtPAO4*) (Moschou i col., 2008). Totes aquestes dades donen suport a la idea d'una cooperació entre les dos vies metabòliques de les PAs (PAO i CuAO) en els peroxisomes d'*Arabidopsis*, i suggereixen una rellevància del catabolisme de les PAs en aquest orgànel en la defensa de la planta i en la resposta a diferents tipus d'estrès.

Pel que fa a la *AtCuAO* apoplàstica, en plantes adultes, es troba expressió d'*AtCuAO1* en tots els òrgans examinats (Figura R.28), mentre que en plàntules es va veure un increment des dels 4 dies fins als 28 (Figura R.28), el que suggereix que aquest gen podria tenir un paper en el desenvolupament de la planta. D'altra banda, l'expressió d'*AtCuAO1* es va veure augmentada en resposta a ABA, MeJA, flagel·lina 22 i SA (Figura R.29), el que indicaria que *AtCuAO1*, igual que les CuAOs peroxisomals, podria tenir una funció en la resposta de defensa a l'estrès. La inducció

d'aquest gen per ABA havia estat descrita per Wimalasekera i col. (2011). Aquests autors van observar que, els mutants *cuao1*, tenien un fenotip de hiposensibilitat a ABA i una disminució en la producció de H₂O₂ i NO induïda per ABA. A més aquests mutants son també hiposensibles a estrès osmòtic, el que dona suport a la idea de que AtCuAO1 participa en la resposta de les plantes a l'estrès abiòtic. L'augment de l'activitat CuAO després del tractament amb ABA també s'ha observat en fulles de fava i arrels d'arròs (An i col., 2008; Lin i Kao, 2001). En el cas de fava, l'increment de l'activitat CuAO induïa un augment de la producció de H₂O₂, que es traduïa en major tancament estomàtic (An i col., 2008), una resposta de defensa molt comuna enfront de la majoria de tipus d'estrès. Amb tot això, els resultats del present treball suggereixen una implicació d'AtCuAO1 en la resposta de les plantes a l'estrès, tot i que són necessaris més estudis per saber quin és el seu paper en aquest procés.

Es important assenyalar que l'expressió d'*AtCuAO1* va ser fortament induïda per SA, mentre que la d'*AtCuAO2* va augmentar notablement en resposta a MeJa (Figura R.29). L'àcid salicilic i l'àcid jasmònic indueixen resistència enfront patògens biotròfics i necrotròfics, respectivament (Thaler et al. 2012). Per tant la diferent resposta d'*AtCuAO1* i *AtCuAO2* a aquests compostos, juntament amb la diferent localització de les proteïnes corresponents (Figura R.30), podria suggerir una evolució divergent dels membres de la família CuAO que condueixen a una especificitat en la resposta davant de patògens biotròfics i necrotròfics. De fet, a l'apoplast de fulla de tabac, s'ha descrit que l'oxidació de PAs pot tenir un efecte beneficiós en la defensa contra patògens biotròfics, mentre que el contrari es va observar per als patògens necrotròfics (Marina et al. 2008).

5.12 Integració de les dos rutes catabòliques de PAs en Arabidopsis

Considerats conjuntament, els resultats generats en aquest treball, donen suport a la hipòtesis de que en Arabidopsis, el catabolisme de les PAs es du a terme en diferents compartiments cel·lulars a través de diferents AOs que, considerant les dades disponibles fins al moment, podria ser tal com s'indica en la Figura D.2. Així, en l'apoplast, s'oxidarien els grups amino primaris de la Put i la Spd a través d'un procés terminal irreversible dut a terme per CuAOs (ATAO1, CuAO1). En peroxisomes, aquesta oxidació la portarien a terme AtCuAO2 i AtCuAO3, però en aquest orgànuls

també es podrien oxidar els grups amino secundaris de les PAs a través de la via de retroconversió mediada per PAOs (AtPAO2, AtPAO3, i AtPAO4). La via de la retroconversió també es podria donar en el citoplasma via AtPAO1 i, probablement, AtPAO5 (Fincato i col., 2011). Algunes de les altres sis putatives AtCuAOs apareixen anotades com citoplasmàtiques en la base de dades *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR), però no hi ha dades experimentals que facin referència a la seva funció ni a la seva localització intracel·lular. Per això no es pot descartar una degradació de les PAs al citosol a través d'alguna de les isoformes de CuAO d'Arabidopsis. La redundància d'AOs observada en aquesta planta suggeriria la necessitat de produir H₂O₂ en compartiments específics durant les diferents fases del desenvolupament i la diferenciació, així com quant s'activen els diferents mecanismes de defensa de la planta, tal com ja van esmentar Angelini i col (2008).

Aquest treball representa un punt de partida per a futurs estudis sobre la funció fisiològica i la possible cooperació de les AOs (PAOs i CuAOs) en els diferents compartiments cel·lulars de la planta.

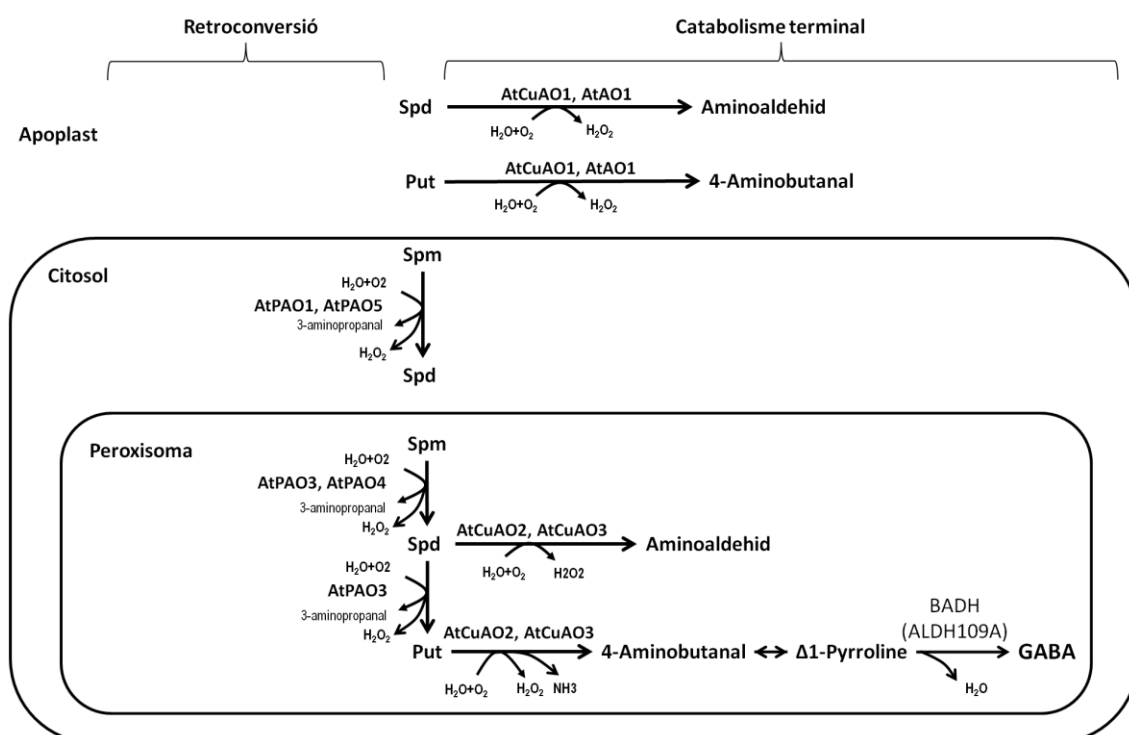


Figura D.2. Representació esquemàtica de les possibles vies catabòliques de les PAs en Arabidopsis. A la paret de la cèl·lula, Put i Spd podrien ser desaminades per oxidació a través de CuAOs (ATAO1 i AtCuAO1) per produir els corresponents aminoaldehids, amb la consegüent

producció de H₂O₂ i NH₃⁻. En els peroxisomes, Spm i Spd són substrats de PAO (PAO2-4) que catalitzen la retroconversió seqüencial de Spm a Spd i de Spd a Put, s'ha descrit que aquestes reaccions poden ser inhibides, per un mecanisme retroactiu, per el seu producte final de reacció, la Put. Les CuAOs (AtCuAO2 and AtCuAO3) poden catalitzar l'oxidació terminal de Put i Spd, donant lloc, entre d'altres productes, a H₂O₂. El producte de l'oxidació de la Put, el 4-aminobutanal, pot ser substracte per la BADH (ALDH10A9) peroxisomal, la qual pot catalitzar la seva conversió a GABA. En el citosol, les PAOS (AtPAO1 i AtPAO5) oxiden Spm i Spd per la via de la retroconversió. Algunes AtCuAOs, anotades com a citosoliques en el TAIR, podrien dur a terme el catabolisme terminal de les PA en aquest compartiment cel·lular.

6 Conclusions

6 Conclusions

- 1) Les plantes sobreexpressores d'*ADC1* o d'*ADC2*, són més tolerants a temperatures de congelació que les plantes control, essent més marcat aquest efecte en plantes que han estat aclimatades, fet que demostra que la Put té un paper important en el procés d'aclimatació de les plantes a fred.
- 2) L'augment en la producció de putrescina endògena per sobreexpressió d'*ADC1* o *ADC2* es mostra com una alternativa per l'obtenció d'espècies vegetals tolerants a fred i glaçades.
- 3) Els resultats obtinguts amb línies transgèniques d'*Arabidopsis* que sobreexpressen el gen homòleg *ADC1* (*35S::ADC1*) demostren que la acumulació de Put mediada per aquesta isoforma d'ADC no induïx tolerància a deshidratació.
- 4) Els resultats obtinguts amb línies transgèniques d'*Arabidopsis* que expressen constitutivament el gen homòleg *ADC2* (*35S::ADC2*) ens permeten concloure que la putrescina produïda per aquesta isoforma de l'enzim té un efecte protector intrínsec en situacions d'estrès hídric, encara que per això s'han d'assolir uns nivells mínims de la diamina.
- 5) La tolerància a deshidratació de les plantes transgèniques sobreexpressores d'*ADC2* podria explicar-se en part pels baixos nivells de GAs bioactives detectats en aquestes plantes.
- 6) L'acumulació d'elevats nivells de Put per sobreexpressió d'*ADC2* induïx un increment de la sensibilitat a ABA i una disminució de l'obertura estomàtica, això es tradueix en una menor pèrdua d'aigua per transpiració, que explicaria la tolerància a deshidratació observada en les línies transgèniques *35S::ADC2* sobreproductores de la diamina.

- 7) La proteïna ADC1 es localitza al nucli, mentre que ADC2 es troba en cloroplasts, això podria explicar la diferent resposta a deshidratació observada en les plantes transgèniques sobreexpressores d'*ADC1* o *ADC2*.
- 8) Els gens d'Arabidopsis AT1G62810, AT1G31710 i AT2G42490, que hem anomenat *AtCuAO1*, *AtCuAO2* i *AtCuAO3*, codifiquen enzims funcionals amb activitat amino oxidasa dependent de coure capaços d'oxidar Put i Spd, però no Spm.
- 9) Els gens *AtCuAO1*, *AtCuAO2* i *AtCuAO3* tenen un patró d'expressió diferent en resposta a diversos tractaments relacionats amb l'estrès (ferida, aplicació exògena de flagel·lina, ACC, MeJA, SA o ABA), fet que suggeriria que aquests gens poden tenir funcions diferents en la resposta de les plantes a estrès biòtic i/o abiòtic.
- 10) A l'apoplast d'Arabidopsis, el catabolisme de PAs es porta a terme per CuAOs que catalitzen l'oxidació terminal, entre les que es troba *AtCuAO1* caracteritzada en aquest treball.
- 11) *AtCuAO2* i *AtCuAO3* es localitzen en peroxisomes, això indica que en aquests orgànuls es dona una cooperació de les dues rutes catabòliques de PAs, la retroconversió mediada per PAOs i l'oxidació terminal catalitzada per CuAOs, això permet regular l'homeòstasi de PAs.

7 Bibliografia

7 Bibliografía

Abebe T, Guenzi AC, Martin B, Cushman JC. 2003. Tolerance of Mannitol-Accumulating Transgenic Wheat to Water Stress and Salinity. *Plant Physiology* **131**, 1748-1755.

Achard P, Cheng H, De Grauwe L, Decat J, Schoutteten H, Moritz T, Van Der Straeten D, Peng J, Harberd NP. 2006. Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* **311**, 91-94.

Achard P, Renou J-P, Berthomé R, Harberd NP, Genschik P. 2008. Plant DELLAs Restrain Growth and Promote Survival of Adversity by Reducing the Levels of Reactive Oxygen Species. *Current biology : CB* **18**, 656-660.

Alcazar R, Altabella T, Marco F, Bortolotti C, Reymond M, Koncz C, Carrasco P, Tiburcio AF. 2010. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta* **231**, 1237-1249.

Alcázar R, Cuevas JC, Patrón M, Altabella T, Tiburcio AF. 2006a. Abscisic acid modulates polyamine metabolism under water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plantarum* **128**, 448-455.

Alcazar R, Cuevas JC, Planas J, Zarza X, Bortolotti C, Carrasco P, Salinas J, Tiburcio AF, Altabella T. 2011. Integration of polyamines in the cold acclimation response. *Plant Science* **180**, 31-38.

Alcázar R, García-Martínez JL, Cuevas JC, Tiburcio AF, Altabella T. 2005. Overexpression of *ADC2* in *Arabidopsis* induces dwarfism and late-flowering through GA deficiency. *Plant Journal* **43**, 425-436.

Alcázar R, Marco F, Cuevas JC, Patrón M, Ferrando A, Carrasco P, Tiburcio AF, Altabella T. 2006b. Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnology Letters* **28**, 1867-1876.

Alia, Kondo Y, Sakamoto A, Nonaka H, Hayashi H, Saradhi PP, Chen TH, Murata N. 1999. Enhanced tolerance to light stress of transgenic *Arabidopsis* plants that express the *codA* gene for a bacterial choline oxidase. *Plant Molecular Biology* **40**, 279-288.

- An ZF, Jing W, Liu YL, Zhang WH.** 2008. Hydrogen peroxide generated by copper amine oxidase is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Journal of Experimental Botany* **59**, 815-825.
- Angelini R, Bragaloni M, Federico R, Infantino A, Porta-Pugua A.** 1993. Involvement of Polyamines, Diamine Oxidase and Peroxidase in Resistance of Chickpea to *Ascochyta rabiei*. *Journal of Plant Physiology* **142**, 704-709.
- Angelini R, Cona A, Federico R, Fincato P, Tavladoraki P, Tisi A.** 2010. Plant amine oxidases “on the move”: An update. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**, 560-564.
- Angelini R, Manes F, Federico R.** 1990. Spatial and functional correlation between diamine-oxidase and peroxidase activities and their dependence upon de-etiolation and wounding in chick-pea stems. *Planta* **182**, 89-96.
- Angelini R, Tisi A, Rea G, Chen MM, Botta M, Federico R, Cona A.** 2008. Involvement of polyamine oxidase in wound healing. *Plant Physiology* **146**, 162-177.
- Apel K, Hirt H.** 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 373-399.
- Apelbaum A, Canellakis ZN, Applewhite PB, Kaursawhney R, Galston AW.** 1988. Binding of spermidine to a unique protein in thin-layer tobacco tissue-culture. *Plant Physiology* **88**, 996-998.
- Armengaud P, Breitling R, Amtmann A.** 2004. The potassium-dependent transcriptome of Arabidopsis reveals a prominent role of jasmonic acid in nutrient signaling. *Plant Physiology* **136**, 2556-2576.
- Ascenzi P, Fasano M, Marino M, Venturini G, Federico R.** 2002. Agmatine oxidation by copper amine oxidase. *European Journal of Biochemistry* **269**, 884-892.
- Avonce N, Leyman B, Mascorro-Gallardo JO, Van Dijck P, Thevelein JM, Iturriaga G.** 2004. The Arabidopsis trehalose-6-P synthase AtTPS1 gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. *Plant Physiology* **136**, 3649-3659.
- Azcón-Bieto J, Talón M.** 2008. *Fundamentos de Fisiología vegetal*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana
- Bagni N, Pistocchi R.** 1990. Binding, transport, and subcellular compartmentation of polyamines in plants. *Current topics in plant physiology* **5**, 62-72.

- Bagni N, Tassoni A.** 2001. Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* **20**, 301-317.
- Berdy SE, Kudla J, Gruissem W, Gillaspay GE.** 2001. Molecular characterization of At5PTase1, an inositol phosphatase capable of terminating inositol trisphosphate signaling. *Plant Physiology* **126**, 801-810.
- Besford RT, Richardson CM, Campos JL, Tiburcio AF.** 1993. Effect of polyamines on stabilization of molecular complexes in thylakoid membranes of osmotically stressed oat leaves. *Planta* **189**, 201-206.
- Bhatnagar P, Minocha R, Minocha SC.** 2002. Genetic Manipulation of the Metabolism of Polyamines in Poplar Cells. The Regulation of Putrescine Catabolism. *Plant Physiology* **128**, 1455-1469.
- Blatt MR, Thiel G, Trentham DR.** 1990. Reversible inactivation of K⁺ channels of Vicia stomatal guard-cells following the photolysis of caged Inositol 1,4,5-trisphosphate. *Nature* **346**, 766-769.
- Borrell A, Culianezmacia FA, Altabella T, Besford RT, Flores D, Tiburcio AF.** 1995. Arginine Decarboxylase Is Localized in Chloroplasts. *Plant Physiology* **109**, 771-776.
- Bortolotti C, Cordeiro A, Alcazar R, Borrell A, Culianez-Macia FA, Tiburcio AF, Altabella T.** 2004. Localization of arginine decarboxylase in tobacco plants. *Physiologia Plantarum* **120**, 84-92.
- Bouché N, Fait A, Zik M, Fromm H.** 2004. The root-specific glutamate decarboxylase (GAD1) is essential for sustaining GABA levels in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* **55**, 315-325.
- Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J.** 1999. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science* **140**, 103-125.
- Bray EA.** 1993. Molecular Responses to Water Deficit. *Plant Physiology* **103**, 1035-1040.
- Bray EA.** 2004. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **55**, 2331-2341.
- Burhenne K, Kristensen BK, Rasmussen SK.** 2003. A new class of N-hydroxycinnamoyltransferases. Purification, cloning, and expression of a barley

agmatine coumaroyltransferase (EC 2.3.1.64). *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 13919-13927.

Caemmerer S, Farquhar GD. 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* **153**, 376-387.

Capell T, Bassie L, Christou P. 2004. Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **101**, 9909-9914.

Cervelli M, Caro OD, Penta AD, Angelini R, Federico R, Vitale A, Mariottini P. 2004. A novel C-terminal sequence from barley polyamine oxidase is a vacuolar sorting signal. *Plant Journal* **40**, 410-418.

Cervelli M, Cona A, Angelini R, Polticelli F, Federico R, Mariottini P. 2001. A barley polyamine oxidase isoform with distinct structural features and subcellular localization. *European Journal of Biochemistry* **268**, 3816-3830.

Cervelli M, Tavladoraki P, Di Agostino S, Angelini R, Federico R, Mariottini P. 2000. Isolation and characterization of three polyamine oxidase genes from *Zea mays*. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**, 667-677.

Ciereszko I, Johansson H, Kleczkowski LA. 2001. Sucrose and light regulation of a cold-inducible UDP-glucose pyrophosphorylase gene via a hexokinase-independent and abscisic acid-insensitive pathway in *Arabidopsis*. *Biochemical Journal* **354**, 67-72.

Cona A, Rea G, Angelini R, Federico R, Tavladoraki P. 2006. Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in Plant Science* **11**, 80-88.

Cook D, Fowler S, Fiehn O, Thomashow MF. 2004. A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 15243-15248.

Cuevas JC, Lopez-Cobollo R, Alcázar R, Zarza X, Koncz C, Altabella T, Salinas J, Tiburcio AF, Ferrando A. 2008. Putrescine is involved in *Arabidopsis* freezing tolerance and cold acclimation by regulating abscisic acid levels in response to low temperature. *Plant Physiology* **148**, 1094-1105.

Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR. 2010. Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 651-679.

Chattopadhyay MK, Gupta S, Sengupta DN, Ghosh B. 1997. Expression of arginine decarboxylase in seedlings of indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars as affected by salinity stress. *Plant Molecular Biology* **34**, 477-483.

Chen TH, Gusta LV. 1983. Abscisic Acid-induced freezing resistance in cultured plant cells. *Plant Physiology* **73**, 71-75.

Chen WP, Li PH, Chen THH. 2000. Glycinebetaine increases chilling tolerance and reduces chilling-induced lipid peroxidation in *Zea mays* L. *Plant, Cell & Environment* **23**, 609-618.

Cheng L, Zou YJ, Ding SL, Zhang JJ, Yu XL, Cao JS, Lu G. 2009. Polyamine accumulation in transgenic tomato enhances the tolerance to high temperature stress. *Journal of Integrative Plant Biology* **51**, 489-499.

Cheng WH, Endo A, Zhou L, Penney J, Chen HC, Arroyo A, Leon P, Nambara E, Asami T, Seo M, Koshiba T, Sheen J. 2002. A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *Plant Cell* **14**, 2723-2743.

Christie P, Alfenito M, Walbot V. 1994. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta* **194**, 541-549.

Christmann A, Grill E, Meinhard M. 2004. Abscisic acid signalling. In: Hirt H, Shinozaki K, eds. *Plant Responses to Abiotic Stress*, Vol. 4: Springer Berlin Heidelberg, 39-71.

Datta N, Schell MB, Roux SJ. 1987. Spermine stimulation of a nuclear NII kinase from pea plumules and its role in the phosphorylation of a nuclear polypeptide. *Plant Physiology* **84**, 1397-1401.

Dejardin A, Sokolov LN, Kleczkowski LA. 1999. Sugar/osmoticum levels modulate differential abscisic acid-independent expression of two stress-responsive sucrose synthase genes in *Arabidopsis*. *Biochemical Journal* **344 Pt 2**, 503-509.

Del Duca S, Beninati S, Serafini-Fracassini D. 1995. Polyamines in chloroplasts: identification of their glutamyl and acetyl derivatives. *Biochemical Journal* **305 (Pt 1)**, 233-237.

- Del Duca S, Betti L, Trebbi G, Serafini-Fracassini D, Torrigiani P.** 2007. Transglutaminase activity changes during the hypersensitive reaction, a typical defense response of tobacco NN plants to TMV. *Physiologia Plantarum* **131**, 241-250.
- Del Duca S, Faleri C, Iorio RA, Cresti M, Serafini-Fracassini D, Cai G.** 2013. Distribution of transglutaminase in pear pollen tubes in relation to cytoskeleton and membrane dynamics. *Plant Physiology*.
- Del Duca S, Tidu V, Bassi R, Serafini-Fracassini D, Esposito C.** 1994. Identification of transglutaminase activity and its substrates in isolated chloroplast of *Helianthus tuberosus*. *Planta* **193**, 283-289.
- Delhaize E, Webb J.** 1987. Purification and characterization of diamine oxidase from clover leaves. *Phytochemistry* **26**, 641-643.
- Della Mea M, Caparrós-Ruiz D, Claparols I, Serafini-Fracassini D, Rigau J.** 2004. AtPng1p. The First Plant Transglutaminase. *Plant Physiology* **135**, 2046-2054.
- Della Mea M, De Filippis F, Genovesi V, Serafini Fracassini D, Del Duca S.** 2007. The Acropetal Wave of Developmental Cell Death of Tobacco Corolla Is Preceded by Activation of Transglutaminase in Different Cell Compartments. *Plant Physiology* **144**, 1211-1222.
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C.** 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585-588.
- DeWald DB, Torabinejad J, Jones CA, Shope JC, Cangelosi AR, Thompson JE, Prestwich GD, Hama H.** 2001. Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate correlates with calcium mobilization in salt-stressed Arabidopsis. *Plant Physiology* **126**, 759-769.
- Dondini L, Bonazzi S, Serafini-Fracassini D.** 2000. Recovery of growth capacity and of chloroplast transglutaminase activity induced by polyamines in a polyamine-deficient variant strain of *Dunaliella salina*. *Journal of Plant Physiology* **157**, 473-480.
- Dondini L, Del Duca S, Dall'Agata L, Bassi R, Gastaldelli M, Della Mea M, Di Sandro A, Claparols I, Serafini-Fracassini D.** 2003. Suborganellar localisation and effect of light on *Helianthus tuberosus* chloroplast transglutaminases and their substrates. *Planta* **217**, 84-95.
- Drobak BK, Watkins PAC.** 2000. Inositol(1,4,5)trisphosphate production in plant cells: an early response to salinity and hyperosmotic stress. *FEBS Letters* **481**, 240-244.

Dunn MA, Goddard NJ, Zhang L, Pearce RS, Hughes MA. 1994. Low-temperature-responsive barley genes have different control mechanisms. *Plant Molecular Biology* **24**, 879-888.

Earley KW, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, Pikaard CS. 2006. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant Journal* **45**, 616-629.

El Ghachtouli N, Martin-Tanguy J, Paynot M, Gianinazzi S. 1996. First report of the inhibition of arbuscular mycorrhizal infection of *Pisum sativum* by specific and irreversible inhibition of polyamine biosynthesis or by gibberellic acid treatment. *FEBS Letters* **385**, 189-192.

Eubel H, Meyer EH, Taylor NL, Bussell JD, O'Toole N, Heazlewood JL, Castleden I, Small ID, Smith SM, Millar AH. 2008. Novel proteins, putative membrane transporters, and an integrated metabolic network are revealed by quantitative proteomic analysis of *Arabidopsis* cell culture peroxisomes. *Plant Physiology* **148**, 1809-1829.

Evans PT, Malmberg RL. 1989. Do Polyamines Have Roles in Plant Development? *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**, 235-269.

Facchini PJ. 2001. ALKALOID BIOSYNTHESIS IN PLANTS: Biochemistry, Cell Biology, Molecular Regulation, and Metabolic Engineering Applications. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 29-66.

Falcone P, Serafini-Fracassini D, Del Duca S. 1993. Comparative Studies of Transglutaminase Activity and Substrates in Different Organs of *Helianthus tuberosus*. *Journal of Plant Physiology* **142**, 265-273.

Federico R, Alisi C, Forlani F. 1989. Properties of the polyamine oxidase from the cell wall of maize seedlings. *Phytochemistry* **28**, 45-46.

Federico R, Angelini R. 1991. *Polyamine catabolism in plants.*

Ferrando A, Carrasco P, Cuevas J, Altabella T, Tiburcio A. 2004. Integrated Molecular Analysis of the Polyamine Metabolic Pathway in Abiotic Stress Signalling. In: Amâncio S, Stulen I, eds. *Nitrogen Acquisition and Assimilation in Higher Plants*, Vol. 3: Springer Netherlands, 207-230.

Fincato P, Moschou PN, Ahou A, Angelini R, Roubelakis-Angelakis KA, Federico R, Tavladoraki P. 2011. The members of *Arabidopsis thaliana* PAO gene

family exhibit distinct tissue- and organ-specific expression pattern during seedling growth and flower development. *Amino Acids* **42**, 831-841.

Fincato P, Moschou PN, Spedaletti V, Tavazza R, Angelini R, Federico R, Roubelakis-Angelakis KA, Tavladoraki P. 2010. Functional diversity inside the Arabidopsis polyamine oxidase gene family. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1155-1168.

Flores H. 1991. Changes in polyamine metabolism in response to abiotic stress. *Slocum R, Flores HE (eds): The biochemistry and physiology of polyamines in plants, Boca de Raton FL, CRC Press.*

Flores HE, Galston AW. 1984. Osmotic stress-induced polyamine accumulation in cereal leaves : I. Physiological parameters of the response. *Plant Physiology* **75**, 102-109.

Folk JE. 1980. Transglutaminases. *Annual Review of Biochemistry* **49**, 517-531.

Fowler S, Thomashow MF. 2002. Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell* **14**, 1675-1690.

Fujita Y, Fujita M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2011. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of Plant Research* **124**, 509-525.

Galis I, Simek P, Narisawa T, Sasaki M, Horiguchi T, Fukuda H, Matsuoka K. 2006. A novel R2R3 MYB transcription factor NtMYBJS1 is a methyl jasmonate-dependent regulator of phenylpropanoid-conjugate biosynthesis in tobacco. *Plant Journal* **46**, 573-592.

Galston AW, Kaur-Sawhney R. 1995. Polyamines as endogeneous growth regulators. In: Davies PJ, ed, ed. *Plant hormones*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 158–178.

Galston AW, Sawhney RK. 1990. Polyamines in plant physiology. *Plant Physiology* **94**, 406-410.

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* **50**, 151-158.

Garg AK, Kim JK, Owens TG, Ranwala AP, Choi YD, Kochian LV, Wu RJ. 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15898-15903.

Gaxiola RA, Li J, Undurraga S, Dang LM, Allen GJ, Alper SL, Fink GR. 2001. Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11444-11449.

Gilmour S, Thomashow M. 1991. Cold acclimation and cold-regulated gene expression in ABA mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **17**, 1233-1240.

Gilmour SJ, Sebolt AM, Salazar MP, Everard JD, Thomashow MF. 2000. Overexpression of the *Arabidopsis CBF3* transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiology* **124**, 1854-1865.

Gilmour SJ, Zarka DG, Stockinger EJ, Salazar MP, Houghton JM, Thomashow MF. 1998. Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced *COR* gene expression. *Plant Journal* **16**, 433-442.

Gilroy S, Read ND, Trewavas AJ. 1990. Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol trisphosphate initiates stomatal closure. *Nature* **346**, 769-771.

Gill S, Tuteja N. 2010. Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signal Behav* **5**.

Gillaspy GE, Keddie JS, Oda K, Gruissem W. 1995. Plant inositol monophosphatase is a lithium-sensitive enzyme encoded by a multigene family. *Plant Cell* **7**, 2175-2185.

Goytia E, Fernandez-Calvino L, Martinez-Garcia B, Lopez-Abella D, Lopez-Moya JJ. 2006. Production of plum pox virus HC-Pro functionally active for aphid transmission in a transient-expression system. *The Journal of general virology* **87**, 3413-3423.

Grienenberger E, Besseau S, Geoffroy P, Debayle D, Heintz D, Lapierre C, Pollet B, Heitz T, Legrand M. 2009. A BAHD acyltransferase is expressed in the

tapetum of *Arabidopsis* anthers and is involved in the synthesis of hydroxycinnamoyl spermidines. *Plant Journal* **58**, 246-259.

Groppa MD, Benavides MP. 2008. Polyamines and abiotic stress: Recent advances. *Amino Acids* **34**, 35-45.

Guo FQ, Okamoto M, Crawford NM. 2003. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* **302**, 100-103.

Hajela RK, Horvath DP, Gilmour SJ, Thomashow MF. 1990. Molecular Cloning and Expression of *cor* (Cold-Regulated) Genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **93**, 1246-1252.

Hanfrey C, Franceschetti M, Mayer MJ, Illingworth C, Michael AJ. 2002. Abrogation of upstream open reading frame-mediated translational control of a plant S-adenosylmethionine decarboxylase results in polyamine disruption and growth perturbations. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 44131-44139.

Hanfrey C, Sommer S, Mayer MJ, Burtin D, Michael AJ. 2001. Arabidopsis polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. *Plant Journal* **27**, 551-560.

Hannah MA, Heyer AG, Hinch DK. 2005. A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics* **1**, 179-196.

Hashimoto T, Tamaki K, Suzuki K-i, Yamada Y. 1998. Molecular Cloning of Plant Spermidine Synthases. *Plant and Cell Physiology* **39**, 73-79.

Hayashi H, Alia, Mustardy L, Deshniem P, Ida M, Murata N. 1997. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *Plant Journal* **12**, 133-142.

He LX, Nada K, Tachibana S. 2002. Effects of spermidine pretreatment through the roots on growth and photosynthesis of chilled cucumber plants (*Cucumis sativus* L.). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **71**, 490-498.

Hedberg C, Hesse M, Werner C. 1996. Spermine and spermidine hydroxycinnamoyl transferases in *Aphelandra tetragona*. *Plant Science* **113**, 149-156.

Hedden P, Phillips AL. 2000. Manipulation of hormone biosynthetic genes in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology* **11**, 130-137.

- Hedekov CJ, Thams P, Gembal M, Malik T, Capito K.** 1991. Characteristics of phosphoinositide-specific Phospholipase-C activity from mouse pancreatic-islets. *Molecular and Cellular Endocrinology* **78**, 187-195.
- Hirasawa E, Suzuki Y.** 1985. Occurrence of spermine in chromatin of *Zea mays*. *Plant Growth Regulation* **3**, 239-245.
- Hirt H, Shinozaki K.** 2004. Plant responses to abiotic stress. *Springer*.
- Hoagland DR, Arnon DI.** 1938. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agric. Exp. Sta. Circ.* **357**, 1-39.
- Hoth S, Morgante M, Sanchez J-P, Hanafey MK, Tingey SV, Chua N-H.** 2002. Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abi1-1* mutant. *Journal of Cell Science* **115**, 4891-4900.
- Hsieh TH, Lee JT, Yang PT, Chiu LH, Charng YY, Wang YC, Chan MT.** 2002. Heterology expression of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. *Plant Physiology* **129**, 1086-1094.
- Hur J, Jung K-H, Lee C-H, An G.** 2004. Stress-inducible *OsP5CS2* gene is essential for salt and cold tolerance in rice. *Plant Science* **167**, 417-426.
- Iglesias A.** 1995. La influencia del cambio climático sobre los cultivos. *El Boletín, M° de Agricultura, Pesca y Alimentación*, Vol. 21, 16-24. Madrid.
- Imai A, Matsuyama T, Hanzawa Y, Akiyama T, Tamaoki M, Saji H, Shirano Y, Kato T, Hayashi H, Shibata D, Tabata S, Komeda Y, Takahashi T.** 2004. Spermidine synthase genes are essential for survival of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **135**, 1565-1573.
- IPCC.** 2007. *Cambio climático 2007. Informe de síntesis*. Cambridge, U.K.: IPCC, Ginebra, Suiza, .
- Iyer S, Caplan A.** 1998. Products of Proline Catabolism Can Induce Osmotically Regulated Genes in Rice. *Plant Physiology* **116**, 203-211.
- Janes SM, Palcic MM, Scaman CH, Smith AJ, Brown DE, Dooley DM, Mure M, Klinman JP.** 1992. Identification of topaquinone and its consensus sequence in copper amine oxidases. *Biochemistry* **31**, 12147-12154.
- Jang JC, Sheen J.** 1994. Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell* **6**, 1665-1679.

Janowitz T, Kneifel H, Piotrowski M. 2003. Identification and characterization of plant agmatine iminohydrolase, the last missing link in polyamine biosynthesis of plants. *FEBS Letters* **544**, 258-261.

Kakkar RK, Sawhney VK. 2002. Polyamine research in plants – a changing perspective. *Physiologia Plantarum* **116**, 281-292.

Kamada-Nobusada T, Hayashi M, Fukazawa M, Sakakibara H, Nishimura M. 2008. A putative peroxisomal polyamine oxidase, AtPAO4, is involved in polyamine catabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **49**, 1272-1282.

Kaplan F, Kopka J, Haskell DW, Zhao W, Schiller KC, Gatzke N, Sung DY, Guy CL. 2004. Exploring the temperature-stress metabolome of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **136**, 4159-4168.

Kaplan F, Kopka J, Sung DY, Zhao W, Popp M, Porat R, Guy CL. 2007. Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of *Arabidopsis* reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content. *Plant Journal* **50**, 967-981.

Kasinathan V, Wingler A. 2004. Effect of reduced arginine decarboxylase activity on salt tolerance and on polyamine formation during salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **121**, 101-107.

Kasukabe Y, He LX, Nada K, Misawa S, Ihara I, Tachibana S. 2004. Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **45**, 712-722.

Kim TE, Kim SK, Han TJ, Lee JS, Chang SC. 2002. ABA and polyamines act independently in primary leaves of cold-stressed tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Physiologia Plantarum* **115**, 370-376.

Kinoshita T, Shimazaki K. 1999. Blue light activates the plasma membrane H(+)-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells. *EMBO Journal* **18**, 5548-5558.

Kishitani S, Watanabe K, Yasuda S, Arakawa K, Takabe T. 1994. Accumulation of glycinebetaine during cold acclimation and freezing tolerance in leaves of winter and spring barley plants. *Plant, Cell & Environment* **17**, 89-95.

- Knight H.** 1999. Calcium Signaling during Abiotic Stress in Plants. In: Kwang WJ, ed. *International Review of Cytology*, Vol. Volume 195: Academic Press, 269-324.
- Knight H, Zarka DG, Okamoto H, Thomashow ME, Knight MR.** 2004. Abscisic acid induces CBF gene transcription and subsequent induction of cold-regulated genes via the CRT promoter element. *Plant Physiology* **135**, 1710-1717.
- Knott JM, Romer P, Sumper M.** 2007. Putative spermine synthases from *Thalassiosira pseudonana* and *Arabidopsis thaliana* synthesize thermospermine rather than spermine. *FEBS Letters* **581**, 3081-3086.
- Koornneef M, Alonso-Blanco C, Vreugdenhil D.** 2004. Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana*. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 141-172.
- Kotzabasis K, Fotinou C, Roubelakis-Angelakis K, Ghanotakis D.** 1993. Polyamines in the photosynthetic apparatus. *Photosynthesis Research* **38**, 83-88.
- Kramer GF, Wang CY.** 1989. Correlation of reduced chilling injury with increased spermine and spermidine levels in zucchini squash. *Physiologia Plantarum* **76**, 479-484.
- Krapp A, Hofmann B, Schäfer C, Stitt M.** 1993. Regulation of the expression of rbcS and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for the 'sink regulation' of photosynthesis? *Plant Journal* **3**, 817-828.
- Kreps JA, Wu Y, Chang H-S, Zhu T, Wang X, Harper JF.** 2002. Transcriptome Changes for Arabidopsis in Response to Salt, Osmotic, and Cold Stress. *Plant Physiology* **130**, 2129-2141.
- Kuehn GD R-GB, Bagga S, Phillips GC.** 1990. Novel Occurrence of Uncommon Polyamines in Higher Plants. *Plant Physiology* **94**: 855-57.
- Kumar V, Dooley DM, Freeman HC, Guss JM, Harvey I, McGuirl MA, Wilce MCJ, Zubak VM.** 1996. Crystal structure of a eukaryotic (pea seedling) copper-containing amine oxidase at 2.2 Å resolution. *Structure* **4**, 943-955.
- Kumria R, Rajam MV.** 2002. *Ornithine decarboxylase* transgene in tobacco affects polyamines, in vitro-morphogenesis and response to salt stress. *Journal of Plant Physiology* **159**, 983-990.
- Kusano T, Berberich T, Tateda C, Takahashi Y.** 2008. Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* **228**, 367-381.

Kusano T, Yamaguchi K, Berberich T, Takahashi Y. 2007. The polyamine spermine rescues Arabidopsis from salinity and drought stresses. *Plant Signal Behav* **2**, 251-252.

Kwak JM, Mori IC, Pei ZM, Leonhardt N, Torres MA, Dangl JL, Bloom RE, Bodde S, Jones JDG, Schroeder JI. 2003. NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis. *EMBO Journal* **22**, 2623-2633.

Lam TBT, Iiyama K, Stone BA. 1992. Changes in phenolic acids from internode walls of wheat and phalaris during maturation. *Phytochemistry* **31**, 2655-2658.

Lang V, Mantyla E, Welin B, Sundberg B, Palva ET. 1994. Alterations in water status, endogenous abscisic acid content, and expression of *RAB18* gene during the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **104**, 1341-1349.

Lee BH, Henderson DA, Zhu JK. 2005. The Arabidopsis cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *Plant Cell* **17**, 3155-3175.

Lee TM. 1997. Polyamine regulation of growth and chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L) roots cultured in vitro. *Plant Science* **122**, 111-117.

Legocka J, Zajchert I. 1999. Role of spermidine in the stabilization of the apoprotein of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex of photosystem II during leaf senescence process. *Acta Physiologiae Plantarum* **21**, 127-132.

Levitt J. 1980. Response of plants to environmental stresses. Water, Salt and other Stresses. *Academic Press, NY.*, Vol. Vol I. New York, pp 129 - 186.

Li Y, Lee KK, Walsh S, Smith C, Hadingham S, Sorefan K, Cawley G, Bevan MW. 2006. Establishing glucose- and ABA-regulated transcription networks in Arabidopsis by microarray analysis and promoter classification using a Relevance Vector Machine. *Genome Res* **16**, 414-427.

Lichtenthaler HK. 1998. The Stress Concept in Plants: An Introduction. *Annals of the New York Academy of Sciences* **851**, 187-198.

Lin CC, Kao CH. 2001. Cell wall peroxidase activity, hydrogen peroxide level and NaCl-inhibited root growth of rice seedlings. *Plant and Soil* **230**, 135-143.

- Liu K, Fu H, Bei Q, Luan S.** 2000. Inward potassium channel in guard cells as a target for polyamine regulation of stomatal movements. *Plant Physiology* **124**, 1315-1326.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**, 1391-1406.
- Lorand L, Conrad SM.** 1984. Transglutaminases. *Mol Cell Biochem* **58**, 9-35.
- Løvaas E.** 1996. Antioxidative and Metal-Chelating Effects of Polyamines. In: Helmut S, ed. *Advances in Pharmacology*, Vol. Volume 38: Academic Press, 119-149.
- Luo J, Fuell C, Parr A, Hill L, Bailey P, Elliott K, Fairhurst SA, Martin C, Michael AJ.** 2009. A novel polyamine acyltransferase responsible for the accumulation of spermidine conjugates in Arabidopsis seed. *Plant Cell* **21**, 318-333.
- Llorente F, Lopez-Cobollo RM, Catala R, Martinez-Zapater JM, Salinas J.** 2002. A novel cold-inducible gene from Arabidopsis, RCI3, encodes a peroxidase that constitutes a component for stress tolerance. *Plant Journal* **32**, 13-24.
- Llorente F, Oliveros JC, Martínez-Zapater JM, Salinas J.** 2000. A freezing-sensitive mutant of Arabidopsis, frs1, is a new aba3 allele. *Planta* **211**, 648-655.
- MacRobbie EA.** 2006. Osmotic effects on vacuolar ion release in guard cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1135-1140.
- Mach M, Ebert P, Popp R, Ogilvie A.** 1982. Compartmentalization of polyamines in mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **104**, 1327-1334.
- Magome H, Yamaguchi S, Hanada A, Kamiya Y, Oda K.** 2004. dwarf and delayed-flowering 1, a novel Arabidopsis mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor. *Plant Journal* **37**, 720-729.
- Magome H, Yamaguchi S, Hanada A, Kamiya Y, Oda K.** 2008. The DDF1 transcriptional activator upregulates expression of a gibberellin-deactivating gene, GA2ox7, under high-salinity stress in Arabidopsis. *Plant Journal* **56**, 613-626.

- Mahajan S, Tuteja N.** 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **444**, 139-158.
- Marce M, Brown DS, Capell T, Figueras X, Tiburcio AF.** 1995. Rapid High-Performance Liquid-Chromatographic method for the quantitation of polyamines as their dansyl derivatives - application to plant and animal-tissues. *Journal of Chromatography B* **666**, 329-335.
- Margosiak SA, Dharma A, Bruce-Carver MR, Gonzales AP, Louie D, Kuehn GD.** 1990. Identification of the Large Subunit of Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase as a Substrate for Transglutaminase in *Medicago sativa* L. (Alfalfa). *Plant Physiology* **92**, 88-96.
- Markwalder HU, Neukom H.** 1976. Diferulic acid as a possible crosslink in hemicelluloses from wheat germ. *Phytochemistry* **15**, 836-837.
- Martin-Tanguy J.** 1997. Conjugated polyamines and reproductive development: Biochemical, molecular and physiological approaches. *Physiologia Plantarum* **100**, 675-688.
- Martin-Tanguy J.** 2001. Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Regulation* **34**, 135-148.
- Masgrau C, Altabella T, Farrás R, Flores D, Thompson AJ, Besford RT, Tiburcio AF.** 1997. Inducible overexpression of oat arginine decarboxylase in transgenic tobacco plants. *Plant Journal* **11**, 465-473.
- Medda R, Padiglia A, Floris G.** 1995. Plant copper-amine oxidases. *Phytochemistry* **39**, 1-9.
- Medina J, BARGUES M, Terol J, Perez-Alonso M, Salinas J.** 1999. The Arabidopsis CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiology* **119**, 463-469.
- Meksuriyen D, Fukuchi-Shimogori T, Tomitori H, Kashiwagi K, Toida T, Imanari T, Kawai G, Igarashi K.** 1998. Formation of a Complex Containing ATP, Mg²⁺, and Spermine: STRUCTURAL EVIDENCE AND BIOLOGICAL SIGNIFICANCE. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 30939-30944.

Missihoun T, Schmitz J, Klug R, Kirch H-H, Bartels D. 2011. Betaine aldehyde dehydrogenase genes from Arabidopsis with different sub-cellular localization affect stress responses. *Planta* **233**, 369-382.

Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**, 405-410.

Møller SG, McPherson MJ. 1998. Developmental expression and biochemical analysis of the Arabidopsis *atao1* gene encoding an H₂O₂-generating diamine oxidase. *Plant Journal* **13**, 781-791.

Møller SG, Urwin PE, Atkinson HJ, McPherson MJ. 1998. Nematode-induced expression of *atao1*, a gene encoding an extracellular diamine oxidase associated with developing vascular tissue. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **53**, 73-79.

Moschou PN, Sanmartin M, Andriopoulou AH, Rojo E, Sanchez-Serrano JJ, Roubelakis-Angelakis KA. 2008. Bridging the gap between plant and mammalian polyamine catabolism: A novel peroxisomal polyamine oxidase responsible for a full back-conversion pathway in Arabidopsis. *Plant Physiology* **147**, 1845-1857.

Mu D, Janes SM, Smith AJ, Brown DE, Dooley DM, Klinman JP. 1992. Tyrosine codon corresponds to topa quinone at the active site of copper amine oxidases. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 7979-7982.

Munnik T, van Himbergen JAJ, ter Riet B, Braun FJ, Irvine RF, van den Ende H, Musgrave AR. 1998. Detailed analysis of the turnover of polyphosphoinositides and phosphatidic acid upon activation of phospholipases C and D in *Chlamydomonas* cells treated with non-permeabilizing concentrations of mastoparan. *Planta* **207**, 133-145.

Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* **25**, 239-250.

Mura A, Anedda R, Pintus F, Casu M, Padiglia A, Floris G, Medda R. 2007. An important lysine residue in copper/quinone-containing amine oxidases. *FEBS Journal* **274**, 2585-2595.

Murashige T, Skoog F. 1962. A Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.

Murata Y, Pei ZM, Mori IC, Schroeder J. 2001. Abscisic acid activation of plasma membrane Ca(2+) channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is

differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants. *Plant Cell* **13**, 2513-2523.

Nadeau P, Delaney S, Chouinard L. 1987. Effects of cold hardening on the regulation of polyamine levels in wheat (*Triticum aestivum* L) and alfalfa (*Medicago sativa* L). *Plant Physiology* **84**, 73-77.

Nanjo T, Fujita M, Seki M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K. 2003. Toxicity of free proline revealed in an arabidopsis T-DNA-tagged mutant deficient in proline dehydrogenase. *Plant Cell Physiol* **44**, 541-548.

Nanjo T, Kobayashi M, Yoshiba Y, Sanada Y, Wada K, Tsukaya H, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1999. Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **18**, 185-193.

Negrel J. 1989. The biosynthesis of cinnamoylputrescines in callus tissue cultures of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* **28**, 477-481.

Nelson BK, Cai X, Nebenfuhr A. 2007. A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *Plant Journal* **51**, 1126-1136.

Norman SM, Poling SM, Maier VP. 1988. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for (+)-abscisic acid in *Citrus*, *Ricinus*, and *Xanthium* leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **36**, 225-231.

Nuccio ML, Russell BL, Nolte KD, Rathinasabapathi B, Gage DA, Hanson Andrew D. 1998. The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline monooxygenase. *Plant Journal* **16**, 487-496.

Nunes-Duby SE, Matsumoto L, Landy A. 1989. Half-att site substrates reveal the homology independence and minimal protein requirements for productive synapsis in lambda excisive recombination. *Cell* **59**, 197-206.

Olszewski N, Sun TP, Gubler F. 2002. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* **14 Suppl**, S61-80.

Ono Y, Kim D, Watanabe K, Sasaki A, Niitsu M, Berberich T, Kusano T, Takahashi Y. 2012. Constitutively and highly expressed *Oryza sativa* polyamine oxidases localize in peroxisomes and catalyze polyamine back conversion. *Amino Acids* **42**, 867-876.

Orcutt D, Nielsen E. 2000. *The Physiology of Plants under Stress*. New York: John Wiley.

Otterhag L, Sommarin M, Pical C. 2001. N-terminal EF-hand-like domain is required for phosphoinositide-specific phospholipase C activity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **497**, 165-170.

Padiglia A, Medda R, Scanu T, Longu S, Rossi A, Floris G. 2002. Structure and nucleotide sequence of *Euphorbia characias* copper/TPQ-containing amine oxidase gene. *Journal of Protein Chemistry* **21**, 435-441.

Pandey S, Zhang W, Assmann SM. 2007. Roles of ion channels and transporters in guard cell signal transduction. *FEBS Letters* **581**, 2325-2336.

Panicot M, Minguet EG, Ferrando A, Alcazar R, Blazquez MA, Carbonell J, Altabella T, Koncz C, Tiburcio AF. 2002. A polyamine metabolon involving aminopropyl transferase complexes in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**, 2539-2551.

Parsons MR, Convery MA, Wilmot CM, Yadav KDS, Blakeley V, Corner AS, Phillips SEV, McPherson MJ, Knowles PF. 1995. Crystal structure of a quinoenzyme: copper amine oxidase of *Escherichia coli* at 2 Å resolution. *Structure* **3**, 1171-1184.

Paschalidis KA, Roubelakis-Angelakis KA. 2005. Sites and regulation of polyamine catabolism in the tobacco plant. Correlations with cell division/expansion, cell cycle progression, and vascular development. *Plant Physiology* **138**, 2174-2184.

Pei ZM, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B, Allen GJ, Grill E, Schroeder JI. 2000. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406**, 731-734.

Peñuelas J. 2004. *El avance de la primavera y las asincronías entre especies llegan también a España*: Investigación y Ciencia.

Perez-Amador MA, Leon J, Green PJ, Carbonell J. 2002. Induction of the arginine decarboxylase *ADC2* gene provides evidence for the involvement of polyamines in the wound response in Arabidopsis. *Plant Physiology* **130**, 1454-1463.

Peters C, Li M, Narasimhan R, Roth M, Welti R, Wang X. 2010. Nonspecific Phospholipase C NPC4 Promotes Responses to Abscisic Acid and Tolerance to Hyperosmotic Stress in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* **22**, 2642-2659.

- Petrivalsky M, Brauner F, Luhova L, Gagneul D, Sebela M.** 2007. Aminoaldehyde dehydrogenase activity during wound healing of mechanically injured pea seedlings. *Journal of Plant Physiology* **164**, 1410-1418.
- Pietrangeli P, Federico R, Mondovì B, Morpurgo L.** 2007. Substrate specificity of copper-containing plant amine oxidases. *Journal of Inorganic Biochemistry* **101**, 997-1004.
- Pilon-Smits EAH, Terry N, Sears T, van Dun K.** 1999. Enhanced drought resistance in fructan-producing sugar beet. *Plant Physiology and Biochemistry* **37**, 313-317.
- Piotrowski M, Janowitz T, Kneifel H.** 2003. Plant C-N hydrolases and the identification of a plant N-carbamoylputrescine amidohydrolase involved in polyamine biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 1708-1712.
- Pohjanpelto P, Holtta E.** 1996. Phosphorylation of Okazaki-like DNA fragments in mammalian cells and role of polyamines in the processing of this DNA. *EMBO Journal* **15**, 1193-1200.
- Popescu SC, Popescu GV, Bachan S, Zhang Z, Seay M, Gerstein M, Snyder M, Dinesh-Kumar SP.** 2007. Differential binding of calmodulin-related proteins to their targets revealed through high-density Arabidopsis protein microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 4730-4735.
- Quintero FJ, Garcíadeblas B, RodríguezNavarro A.** 1996. The *SAL1* gene of Arabidopsis, encoding an enzyme with 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase and inositol polyphosphate 1-phosphatase activities, increases salt tolerance in yeast. *Plant Cell* **8**, 529-537.
- Raghavendra AS, Gonugunta VK, Christmann A, Grill E.** 2010. ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci* **15**, 395-401.
- Ramanjulu S, Bartels D.** 2002. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant, Cell & Environment* **25**, 141-151.
- Rea G, de Pinto MC, Tavazza R, Biondi S, Gobbi V, Ferrante P, De Gara L, Federico R, Angelini R, Tavladoraki P.** 2004. Ectopic expression of maize polyamine oxidase and pea copper amine oxidase in the cell wall of tobacco plants. *Plant Physiology* **134**, 1414-1426.

- Rea G, Laurenzi M, Tranquilli E, D'Ovidio R, Federico R, Angelini R.** 1998. Developmentally and wound-regulated expression of the gene encoding a cell wall copper amine oxidase in chickpea seedlings. *FEBS Letters* **437**, 177-182.
- Rea G, Metoui O, Infantino A, Federico R, Angelini R.** 2002. Copper amine oxidase expression in defense responses to wounding and ascochyta rabiei invasion. *Plant Physiology* **128**, 865-875.
- Reumann S, Quan S, Aung K, Yang P, Manandhar-Shrestha K, Holbrook D, Linka N, Switzenberg R, Wilkerson CG, Weber APM, Olsen LJ, Hu J.** 2009. In-Depth proteome analysis of arabidopsis leaf peroxisomes combined with in vivo subcellular targeting certification indicates novel metabolic and regulatory functions of peroxisomes. *Plant Physiology* **150**, 125-143.
- Ristic Z, Ashworth EN.** 1994. Response of Xylem Ray Parenchyma Cells of Red Osier Dogwood (*Cornus sericea* L.) to Freezing Stress (Microscopic Evidence of Protoplasm Contraction). *Plant Physiology* **104**, 737-746.
- Rock CD.** 2000. Tansley Review No. 120. *New Phytologist* **148**, 357-396.
- Rodrigues A, Santiago J, Rubio S, Saez A, Osmont KS, Gadea J, Hardtke CS, Rodriguez PL.** 2009. The Short-Rooted Phenotype of the brevis radix Mutant Partly Reflects Root Abscisic Acid Hypersensitivity. *Plant Physiology* **149**, 1917-1928.
- Rojo E, Titarenko E, León J, Berger S, Vancanneyt G, Sánchez-Serrano JJ.** 1998. Reversible protein phosphorylation regulates jasmonic acid-dependent and -independent wound signal transduction pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **13**, 153-165.
- Roy M, Wu R.** 2001. *Arginine decarboxylase* transgene expression and analysis of environmental stress tolerance in transgenic rice. *Plant Science* **160**, 869-875.
- Roy M, Wu R.** 2002. Overexpression of S-adenosylmethionine decarboxylase gene in rice increases polyamine level and enhances sodium chloride-stress tolerance. *Plant Science* **163**, 987-992.
- Rubio V, Shen Y, Saijo Y, Liu Y, Gusmaroli G, Dinesh-Kumar SP, Deng XW.** 2005. An alternative tandem affinity purification strategy applied to Arabidopsis protein complex isolation. *Plant Journal* **41**, 767-778.
- Saez A, Apostolova N, Gonzalez-Guzman M, Gonzalez-Garcia MP, Nicolas C, Lorenzo O, Rodriguez PL.** 2004. Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of

the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling. *Plant Journal* **37**, 354-369.

Saez A, Robert N, Maktabi MH, Schroeder JI, Serrano R, Rodriguez PL. 2006. Enhancement of Abscisic Acid Sensitivity and Reduction of Water Consumption in Arabidopsis by Combined Inactivation of the Protein Phosphatases Type 2C ABI1 and HAB1. *Plant Physiology* **141**, 1389-1399.

Sakamoto A, Murata A. 1998. Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold. *Plant Molecular Biology* **38**, 1011-1019.

Sauter JJ, Wisniewski M, Witt W. 1996. Interrelationships between ultrastructure, sugar levels, and frost hardiness of ray parenchyma cells during frost acclimation and deacclimation in poplar (*Populus × canadensis* Moench «robusta») Wood. *Journal of Plant Physiology* **149**, 451-461.

Scalet M, Federico R, Angelini R. 1991. Time Courses of Diamine Oxidase and Peroxidase Activities, and Polyamine Changes after Mechanical Injury of Chick-pea Seedlings. *Journal of Plant Physiology* **137**, 571-575.

Scoccianti V, Torrigiani P, Bagni N. 1991. Occurrence of Diamine Oxidase Activity in Protoplasts and Isolated Mitochondria of *Helianthus tuberosus* Tuber. *Journal of Plant Physiology* **138**, 752-756.

Schmidt A, Grimm R, Schmidt J, Scheel D, Strack D, Rosahl S. 1999. Cloning and expression of a potato cDNA encoding hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine N-(hydroxycinnamoyl)transferase. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 4273-4280.

Schrader M, Fahimi HD. 2004. Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochemistry and Cell Biology* **122**, 383-393.

Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waner D. 2001. GUARD CELL SIGNAL TRANSDUCTION. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 627-658.

Schuber F. 1989. Influence of polyamines on membrane functions. *Biochemical Journal* **260**, 1-10.

Sebela M, Brauner F, Radova A, Jacobsen S, Havlis J, Galuszka P, Pec P. 2000. Characterisation of a homogeneous plant aminoaldehyde dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1480**, 329-341.

Sebela M, Radova A, Angelini R, Tavladoraki P, Frebort I, Pec P. 2001. FAD-containing polyamine oxidases: a timely challenge for researchers in biochemistry and physiology of plants. *Plant Science* **160**, 197-207.

Seiler N. 2004. Catabolism of polyamines. *Amino Acids* **26**, 217-233.

Seki M, Ishida J, Narusaka M, Fujita M, Nanjo T, Umezawa T, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K. 2002. Monitoring the expression pattern of around 7,000 Arabidopsis genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. *Functional & Integrative Genomics* **2**, 282-291.

Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K. 2001. Monitoring the Expression Pattern of 1300 Arabidopsis Genes under Drought and Cold Stresses by Using a Full-Length cDNA Microarray. *The Plant Cell Online* **13**, 61-72.

Seki M, Umezawa T, Urano K, Shinozaki K. 2007. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 296-302.

Serafini-Fracassini D, Del Duca S. 2008. Transglutaminases: widespread cross-linking enzymes in plants. *Annals of Botany* **102**, 145-152.

Seyfred MA, Farrell LE, Wells WW. 1984. Characterization of D-myo-Inositol 1,4,5-trisphosphate phosphatase in rat-liver plasma-membranes. *The Journal of Biological Chemistry* **259**, 3204-3208.

Shabala S, Cuin TA, Pottosin I. 2007. Polyamines prevent NaCl-induced K⁺ efflux from pea mesophyll by blocking non-selective cation channels. *FEBS Letters* **581**, 1993-1999.

Shao H-B, Chu L-Y, Jaleel CA, Zhao C-X. 2008. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus Biologies* **331**, 215-225.

Sheen J. 1990. Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell* **2**, 1027-1038.

Shen WY, Nada K, Tachibana S. 2000. Involvement of polyamines in the chilling tolerance of cucumber cultivars. *Plant Physiology* **124**, 431-439.

Sheveleva E, Chmara W, Bohnert HJ, Jensen RG. 1997. Increased Salt and Drought Tolerance by D-Ononitol Production in Transgenic *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiology* **115**, 1211-1219.

Shimazaki K, Iino M, Zeiger E. 1986. Blue light-dependent proton extrusion by guard-cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* **319**, 324-326.

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 1999. *Molecular responses to drought stress*

Austin, Texas.

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M. 2003. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 410-417.

Signorini M, Beninati S, Bergamini CM. 1991. Identification of Transglutaminase Activity in the Leaves of Silver Beet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Plant Physiology* **137**, 547-552.

Singh SS, Chauhan A, Brockerhoff H, Chauhan VPS. 1995. Differential-effects of spermine on Phosphatidylinositol 3-kinase and Phosphatidylinositol phosphate 5-kinase. *Life Sciences* **57**, 685-694.

Slocum RD, Furey MJ, 3rd. 1991. Electron-microscopic cytochemical localization of diamine and polyamine oxidases in pea and maize tissues. *Planta* **183**, 443-450.

Smith T, Negrel J, Bird C. 1983. The cinnamic acid amides of the di- and polyamines. *Advances in Polyamine Research*, Vol. Vol 4. New York: Raven Press: Bachrach U, Kaye A and Chayen R, eds, pp 347-370.

Smith TA, Barker JH. 1988. The DI- and polyamine oxidases of plants. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **250**, 573-587.

Soyka S, Heyer AG. 1999. Arabidopsis knockout mutation of ADC2 gene reveals inducibility by osmotic stress. *FEBS Letters* **458**, 219-223.

Spath M, Woscholski R, Schachtele C. 1991. Characterization of multiple forms of phosphoinositide-specific phospholipase-C from bovine aorta. *Cell Signaling* **3**, 305-310.

Strand A, Hurry V, Gustafsson P, Gardstrom P. 1997. Development of *Arabidopsis thaliana* leaves at low temperatures releases the suppression of photosynthesis and photosynthetic gene expression despite the accumulation of soluble carbohydrates. *Plant Journal* **12**, 605-614.

- Szalai G, Janda T, Bartok T, Paldi E.** 1997. Role of light in changes in free amino acid and polyamine contents at chilling temperature in maize (*Zea mays*). *Physiologia Plantarum* **101**, 434-438.
- Szalai G, Pap M, Janda T.** 2009. Light-induced frost tolerance differs in winter and spring wheat plants. *Journal of Plant Physiology* **166**, 1826-1831.
- Tabaei-Aghdaei SR, Pearce RS, Harrison P.** 2003. Sugars regulate cold-induced gene expression and freezing-tolerance in barley cell cultures. *Journal of Experimental Botany* **54**, 1565-1575.
- Tabor CW, Tabor H.** 1984. Polyamines. *Annual Review of Biochemistry* **53**, 749-790.
- Taiz L, Zeiger E.** 1998. Plant Physiology. *Sinauer Associates, Inc. Publishers. Second Edition Sunderland, Massachusetts.*, p. 69.
- Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** 2002. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **29**, 417-426.
- Takahashi T, Kakehi J.** 2010. Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Ann Bot* **105**, 1-6.
- Takahashi Y, Cong R, Sagor GH, Niitsu M, Berberich T, Kusano T.** 2010. Characterization of five polyamine oxidase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* **29**, 955-965.
- Tassoni A, Antognoni F, Bagni N.** 1996. Polyamine Binding to Plasma Membrane Vesicles Isolated from Zucchini Hypocotyls. *Plant Physiology* **110**, 817-824.
- Tavladoraki P, Rossi MN, Saccuti G, Perez-Amador MA, Polticelli F, Angelini R, Federico R.** 2006. Heterologous expression and biochemical characterization of a polyamine oxidase from *Arabidopsis* involved in polyamine back conversion. *Plant Physiology* **141**, 1519-1532.
- Thomashow MF.** 1999. Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology* **50**, 571-599.
- Tiburcio AF, Altabella T, Borrell A, Masgrau C.** 1997. Polyamine metabolism and its regulation. *Physiologia Plantarum* **100**, 664-674.

Tiburcio AF, Masdeu MA, Dumortier FM, Galston AW. 1986. Polyamine metabolism and osmotic stress. I. Relation to protoplast viability. *Plant Physiology* **82**, 369-374.

Tipping AJ, McPherson MJ. 1995. Cloning and molecular analysis of the pea seedling copper amine oxidase. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 16939-16946.

Tisi A, Angelini R, Cona A. 2008. Wound healing in plants: Cooperation of copper amine oxidase and flavin-containing polyamine oxidase. *Plant signaling & behavior* **3**, 204-206.

Tisi A, Angelini R, Cona A. 2011. Does polyamine catabolism influence root development and xylem differentiation under stress conditions? *Plant signaling & behavior* **6**, 1844-1847.

Tognetti J, Salerno G. 1998. *Las Plantas y el Frío.*

Torrent M, Llop-Tous I, Ludevid MD. 2009. Protein body induction: a new tool to produce and recover recombinant proteins in plants. *Methods in molecular biology* **483**, 193-208.

Torrigiani P, Altamura MM, Pasqua G, Monacelli B, Serafini-Fracassini D, Bagni N. 1987. Free and conjugated polyamines during de novo floral and vegetative bud formation in thin cell layers of tobacco. *Physiologia Plantarum* **70**, 453-460.

Uemura M, Steponkus PL. 1999. Cold Acclimation in Plants: Relationship Between the Lipid Composition and the Cryostability of the Plasma Membrane. *Journal of Plant Research* **112**, 245-254.

Urano K, Yoshiba Y, Nanjo T, Igarashi Y, Seki M, Sekiguchi F, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2003. Characterization of Arabidopsis genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages. *Plant, Cell & Environment* **26**, 1917-1926.

Urano K, Yoshiba Y, Nanjo T, Ito T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2004. Arabidopsis stress-inducible gene for arginine decarboxylase *AtADC2* is required for accumulation of putrescine in salt tolerance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **313**, 369-375.

Valladares F, Niinemets Ü. 2008. Shade Tolerance, a Key Plant Feature of Complex Nature and Consequences. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **39**, 237-257.

Van Kirk CA, Raschke K. 1978. Presence of Chloride Reduces Malate Production in Epidermis during Stomatal Opening. *Plant Physiology* **61**, 361-364.

VanEtten CH, Miller RW, Wolff IA, Jones Q. 1963. Nutrients in Seeds, Amino Acid Composition of Seeds from 200 Angiospermous Plant Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **11**, 399-410.

Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu JH, Zhu JK. 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant Journal* **45**, 523-539.

Verslues PE, Ober ES, Sharp RE. 1998. Root growth and oxygen relations at low water potentials. Impact of oxygen availability in polyethylene glycol solutions. *Plant Physiology* **116**, 1403-1412.

Vettakkorumakankav NN, Falk D, Saxena P, Fletcher RA. 1999. A Crucial Role for Gibberellins in Stress Protection of Plants. *Plant and Cell Physiology* **40**, 542-548.

Villalobos E, Santos M, Talavera D, Rodríguez-Falcón M, Torné JM. 2004. Molecular cloning and characterization of a maize transglutaminase complementary DNA. *Gene* **336**, 93-104.

Vinocur B, Altman A. 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology* **16**, 123-132.

Vogel JT, Zarka DG, Van Buskirk HA, Fowler SG, Thomashow MF. 2005. Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of Arabidopsis. *Plant Journal* **41**, 195-211.

Waditee R, Bhuiyan MN, Rai V, Aoki K, Tanaka Y, Hibino T, Suzuki S, Takano J, Jagendorf AT, Takabe T. 2005. Genes for direct methylation of glycine provide high levels of glycinebetaine and abiotic-stress tolerance in *Synechococcus* and *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1318-1323.

Waie B, Rajam MV. 2003. Effect of increased polyamine biosynthesis on stress responses in transgenic tobacco by introduction of human S-adenosylmethionine gene. *Plant Science* **164**, 727-734.

Walker-Simmons M. 1987. ABA Levels and Sensitivity in Developing Wheat Embryos of Sprouting Resistant and Susceptible Cultivars. *Plant Physiology* **84**, 61-66.

Walters DR. 2003. Polyamines and plant disease. *Phytochemistry* **64**, 97-107.

Wanner LA, Junttila O. 1999. Cold-induced freezing tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiology* **120**, 391-400.

Watson MB, Emory KK, Piatak RM, Malmberg RL. 1998. Arginine decarboxylase (polyamine synthesis) mutants of Arabidopsis thaliana exhibit altered root growth. *Plant Journal* **13**, 231-239.

Weiler E. 1980. Radioimmunoassays for the differential and direct analysis of free and conjugated abscisic acid in plant extracts. *Planta* **148**, 262-272.

Wen XP, Ban Y, Inoue H, Matsuda N, Moriguchi T. 2009. Aluminum tolerance in a spermidine synthase-overexpressing transgenic European pear is correlated with the enhanced level of spermidine via alleviating oxidative status. *Environmental and Experimental Botany* **66**, 471-478.

West M, Harada JJ. 1993. Embryogenesis in Higher Plants: An Overview. *Plant Cell* **5**, 1361-1369.

Wi SJ, Kim WT, Park KY. 2006. Overexpression of carnation *S-adenosylmethionine decarboxylase* gene generates a broad-spectrum tolerance to abiotic stresses in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Reports* **25**, 1111-1121.

Wi SJ, Park KY. 2002. Antisense expression of carnation cDNA encoding ACC synthase or ACC oxidase enhances polyamine content and abiotic stress tolerance in transgenic tobacco plants. *Mol Cells* **13**, 209-220.

Wilmot CM, Murray JM, Alton G, Parsons MR, Convery MA, Blakeley V, Corner AS, Palcic MM, Knowles PF, McPherson MJ, Phillips SE. 1997. Catalytic mechanism of the quinoenzyme amine oxidase from *Escherichia coli*: exploring the reductive half-reaction. *Biochemistry* **36**, 1608-1620.

Wilson PB, Estavillo GM, Field KJ, Pornsiriwong W, Carroll AJ, Howell KA, Woo NS, Lake JA, Smith SM, Millar AH, von Caemmerer S, Pogson BJ. 2009. The nucleotidase/phosphatase SAL1 is a negative regulator of drought tolerance in Arabidopsis. *Plant Journal* **58**, 299-317.

Wimalasekera R, Villar C, Begum T, Scherer GF. 2011. COPPER AMINE OXIDASE1 (CuAO1) of *Arabidopsis thaliana* contributes to abscisic acid- and polyamine-induced nitric oxide biosynthesis and abscisic acid signal transduction. *Molecular plant* **4**, 663-678.

- Wolfrain LA, Langis R, Tyson H, Dhindsa RS.** 1993. cDNA sequence, expression, and transcript stability of a cold acclimation-specific gene, cas18, of alfalfa (*Medicago falcata*) cells. *Plant Physiology* **101**, 1275-1282.
- Xin Z, Browse J.** 1998. Eskimo1 mutants of *Arabidopsis* are constitutively freezing-tolerant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7799-7804.
- Xing SG, Jun YB, Hau ZW, Liang LY.** 2007. Higher accumulation of γ -aminobutyric acid induced by salt stress through stimulating the activity of diamine oxidases in *Glycine max* (L.) Merr. roots. *Plant Physiology and Biochemistry* **45**, 560-566.
- Xiong L, Ishitani M, Lee H, Zhu J-K.** 2001. The *Arabidopsis* LOS5/ABA3 Locus Encodes a Molybdenum Cofactor Sulfurase and Modulates Cold Stress- and Osmotic Stress-Responsive Gene Expression. *The Plant Cell Online* **13**, 2063-2083.
- Xue B, Zhang A, Jiang M.** 2009. Involvement of polyamine oxidase in abscisic acid-induced cytosolic antioxidant defense in leaves of maize. *Journal of Integrative Plant Biology* **51**, 225-234.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 781-803.
- Yamaguchi S.** 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 225-251.
- Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN.** 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**, 1214-1222.
- Yang JC, Zhang JH, Liu K, Wang ZQ, Liu LJ.** 2007. Involvement of polyamines in the drought resistance of rice. *Journal of Experimental Botany* **58**, 1545-1555.
- Yang Q, Reinhard K, Schiltz E, Matern U.** 1997. Characterization and heterologous expression of hydroxycinnamoyl/benzoyl-CoA:anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase from elicited cell cultures of carnation, *Dianthus caryophyllus* L. *Plant Molecular Biology* **35**, 777-789.
- Yang R, Chen H, Gu Z.** 2011. Factors Influencing Diamine Oxidase Activity and γ -Aminobutyric Acid Content of Fava Bean (*Vicia faba* L.) during Germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 11616-11620.

Yesbergenova Z, Yang G, Oron E, Soffer D, Fluhr R, Sagi M. 2005. The plant Mo-hydroxylases aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase have distinct reactive oxygen species signatures and are induced by drought and abscisic acid. *Plant Journal* **42**, 862-876.

Yoda H, Hiroi Y, Sano H. 2006. Polyamine oxidase is one of the key elements for oxidative burst to induce programmed cell death in tobacco cultured cells. *Plant Physiology* **142**, 193-206.

Zeevaart JAD, Creelman RA. 1988. METABOLISM AND PHYSIOLOGY OF ABSCISIC-ACID. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **39**, 439-473.

Zeidler D, Zahringer U, Gerber I, Dubery I, Hartung T, Bors W, Hutzler P, Durner J. 2004. Innate immunity in Arabidopsis thaliana: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15811-15816.

Zentella R, Zhang Z-L, Park M, Thomas SG, Endo A, Murase K, Fleet CM, Jikumaru Y, Nambara E, Kamiya Y, Sun T-p. 2007. Global Analysis of DELLA Direct Targets in Early Gibberellin Signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* **19**, 3037-3057.

Zhao FG, Song CP, He JQ, Zhu H. 2007. Polyamines improve K⁺/Na⁺ homeostasis in barley seedlings by regulating root ion channel activities. *Plant Physiology* **145**, 1061-1072.

Zhu JK. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 247-273.

Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W. 2004. GENEVESTIGATOR. arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology* **136**, 2621-2632.