



TRABAJO DE FIN DE GRADO

Raquel Sanahuja Irene

Grado en Biotecnología

**Estudio de la importancia de la ruta de señalización del
ácido abscísico en la respuesta de *Arabidopsis thaliana*
frente a la infestación por *Tetranychus urticae***

Tutor académico (URV): Dr. Cristina Reguant Miranda

Tutor profesional (UJI): Dr. Miguel González Guzmán

Tarragona, 12 de septiembre de 2019

Índice

1. Resumen	3
Abstract	3
2. Datos del centro	5
3. Introducción.....	6
4. Hipótesis y objetivos.....	11
5. Materiales y métodos	12
5.1. Material vegetal	12
5.1.1. Germinación y crecimiento de <i>A. thaliana</i>	12
5.1.2. Cultivo de <i>Phaseolus vulgaris</i> variedad California Red Kidney	13
5.1.3. Mutantes de <i>A. thaliana</i> utilizados.....	13
5.2. Material no vegetal.....	15
5.3. Generación e identificación de mutantes combinados de pérdida de función	15
5.3.1. Recogida de material vegetal	16
5.3.2. Extracción de DNA.....	16
5.3.3. Identificación mediante PCR y secuenciación.....	18
5.4. Bioensayos con <i>T. urticae</i> de elementos de la ruta de señalización de ABA	19
5.5. Ensayo de germinación y establecimiento de plántulas en diferentes concentraciones de ABA y/o JA.....	22
6. Resultados	23
6.2. Estudio de los elementos de la ruta de señalización de ABA implicados en la interacción <i>A. thaliana</i> - <i>T. urticae</i>	24
6.3. Ensayo de germinación y establecimiento de plántulas en diferentes concentraciones de ABA y/o JA.....	28
7. Conclusión.....	32
8. Bibliografía	33
9. Anexo	33
9.1. Protocolo realización de cruces	35
9.2. Protocolo de extracción de DNA.....	37
10. Autoevaluación.....	38

1. Resumen

El ácaro fitófago *Tetranychus urticae* es capaz de alimentarse de más de 150 especies de cultivos, constituyendo una gran amenaza para la producción de las zonas del arco Mediterráneo donde se dan las mejores condiciones para su crecimiento. Estudios recientes afirman que el estrés hídrico, que es acentuado por el cambio climático, disminuye la resistencia de las plantas a plagas como la de este ácaro. Esto hace necesaria la mejora de la resistencia de las plantas de cultivo a *T. urticae*, respuesta que es controlada por la interacción de diversas hormonas vegetales. En este trabajo se utilizan mutantes de *Arabidopsis thaliana* de las rutas de señalización del ácido abscísico, fitohormona clave en la resistencia a estreses abióticos, y del ácido jasmónico, clave en la resistencia a estreses bióticos, para determinar el papel del ácido abscísico y los elementos de su ruta de señalización en la interacción *A. thaliana*-*T. urticae*. También se han creado e identificado mutantes combinados de *A. thaliana* de las rutas de señalización del ácido abscísico y del ácido jasmónico con el objetivo de identificar posibles puntos de interacción entre las dos rutas de señalización en la interacción *A. thaliana*-*T. urticae* en futuras investigaciones. Los resultados obtenidos demuestran que el ácido abscísico sí desarrolla un papel en la respuesta a la infestación por *T. urticae*. Sin embargo, son necesarios estudios posteriores que amplíen el conocimiento sobre los puntos de interacción entre las dos rutas de señalización y la importancia de los elementos de la ruta de señalización del ácido abscísico.

Palabras clave: *Arabidopsis thaliana*, *Tetranychus urticae*, respuesta a estrés, ácido abscísico, ácido jasmónico, mutantes de pérdida o ganancia de función.

Abstract

The phytophagous mite *Tetranychus urticae* can feed on more than 150 crop species. This constitutes a great threat to the production of the Mediterranean arch areas where the best conditions for growth occur. Recent studies affirm that water stress, which is accentuated by climate change, decreases the resistance of plants to pests such as this mite. This makes it necessary to improve the resistance of crop plants to *T. urticae*, a response that is controlled by the

interaction of various plant hormones. *Arabidopsis thaliana* mutants of the signaling pathways of abscisic acid, very important phytohormone in resistance to abiotic stresses, and jasmonic acid, key in resistance to biotic stresses, are used to determine the role of abscisic acid and the elements of its signaling path in the *A. thaliana*-*T. urticae* interaction. Combined mutants of *A. thaliana* from the signaling pathways of abscisic acid and jasmonic acid have also been created and identified in order to identify possible interaction points between the two signaling pathways in the *A. thaliana*-*T. urticae* interaction in future research. The results obtained show that abscisic acid does play a role in the response to infestation by *T. urticae*. However, further studies are needed to expand knowledge about the interaction points between the two signaling pathways and the importance of the elements of the abscisic acid signaling pathway.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, *Tetranychus urticae*, *stress response*, *abscisic acid*, *jasmonic acid*, *gain-of-function or loss-of-function mutants*.

2. Datos del centro

Este trabajo se ha realizado a partir de las prácticas realizadas en el grupo de Ecofisiología y Biotecnología del Departamento de Ciencias Experimentales de la Universitat Jaume I en Castellón de la Plana dirigido por el catedrático Dr. Aurelio Gómez Cadenas. El objetivo principal del grupo es estudiar y mejorar las respuestas de cultivos importantes en el área mediterránea como tomates o cítricos a los actuales desafíos ambientales causados por el cambio climático. Además de tomates y cítricos, el grupo trabaja con la planta modelo *Arabidopsis thaliana* que permite obtener un conocimiento molecular de los mecanismos implicados en la respuesta a estreses. Las prácticas fueron supervisadas por el Dr. Miguel González-Guzmán, investigador Ramon y Cajal del grupo.

3. Introducción

La agricultura actual se encuentra en peligro debido a los graves efectos del cambio climático, los cuales no solo aumentan el estrés hídrico que sufren sino que además las plantas sometidas a estrés hídrico son menos resistentes a plagas como el ácaro fitófago *Tetranychus urticae* (Ximénez-Embún et al., 2016). Esto puede estar relacionado con los cambios metabólicos y fisiológicos que sufren las plantas al elaborar una respuesta frente al estrés hídrico y que dan lugar a un aumento de los niveles de azúcares y aminoácidos libres (Ximénez-Embún et al., 2017). Los efectos del cambio climático junto con el crecimiento exponencial de la población, que demanda cada vez más alimento, hacen que la mejora de la eficiencia de la agricultura y de la resistencia de las plantas de cultivo para una mayor producción sea cada vez más necesaria. Las plantas, para hacer frente a los estreses tanto bióticos (causados por los organismos con los que conviven) como abióticos (causados por las condiciones ambientales), han desarrollado una serie de mecanismos de defensa que les permiten sobrevivir y reproducirse. En el caso del estrés biótico los mecanismos se basan en la prevención y/o disuasión de organismos que se alimentan de ellas, e incluyen tanto defensas estructurales como hormonales. De este modo, el estudio de estos mecanismos de defensa y su regulación es esencial para el desarrollo biotecnológico de plantas más resistentes.

Para estos estudios se puede recurrir a la planta *Arabidopsis thaliana*, que se presenta como un buen modelo de estudio debido a su pequeño genoma (150 Mb), su ciclo de vida que facilita el análisis genético rápido (de seis a ocho semanas), cada planta produce una gran cantidad de semillas, es diploide (permite identificar caracteres recesivos), es fácilmente transformable utilizando *Agrobacterium tumefaciens*, es de pequeño tamaño, es autofecundable (permite el mantenimiento de líneas homocigotas) y, además, se han generado una gran variedad de mutantes de pérdida de función génica utilizando diferentes métodos de mutagénesis. Todas estas características hacen de *Arabidopsis thaliana* un buen organismo en el que estudiar la respuesta hormonal de las plantas a la infestación por ácaros, que es un gran problema de la agricultura actual.

Tetranychus urticae (ácaro araña de dos manchas o araña roja) es capaz de alimentarse de más de 1100 especies de plantas diferentes, entre ellas más de 150 especies de cultivos ya que tiene la capacidad alimentarse y evadir las defensas de las plantas gracias a una inmensa batería de proteasas y otros compuestos que contiene en su saliva y tracto digestivo (Bensoussan et al., 2016). Además es capaz de desarrollar rápidamente resistencia a acaricidas usados para su control, siendo resistente actualmente a más de 150 de estos acaricidas (Van Leeuwen et al., 2015). Todo esto supone un gran problema para la agricultura, por lo que es necesario aumentar la resistencia de las plantas a este artrópodo. El ácaro *T. urticae* se alimenta del contenido celular de las células mesófilas de la hoja introduciendo su estilete en la célula sin dañar la capa epidérmica ya que penetra la epidermis a través de los estomas o de la unión entre las células epidérmicas del pavimento (Bensoussan et al., 2016). Este tipo de alimentación acaba formando manchas cloróticas en las hojas que pueden utilizar los investigadores para cuantificar la alimentación del ácaro. Cuando las plantas detectan al artrópodo fitófago por métodos mecánicos (rotura de tricomas) o reconocimiento de efectores provenientes del artrópodo, activan mecanismos de defensa coordinados por distintas fitohormonas. Los mecanismos de defensa de la planta incluyen la síntesis de metabolitos secundarios que actúan como armas químicas (inhibidores de proteasas y glucosinolatos) o que atraen a los depredadores naturales del ácaro.

Estudios como el de Zhurov et al. (2014) y Martel et al. (2015), demuestran que el hecho de que los ácaros se alimenten de la planta activa las enzimas necesarias para la biosíntesis del ácido jasmónico (JA). La ruta de señalización del JA induce la activación de la expresión de los inhibidores de proteasas y otros compuestos de defensa de la planta. Además de la ruta de señalización del JA, que es la principal vía de defensa de las plantas frente a herbívoros, también se activan las rutas de señalización del etileno (ET), del ácido salicílico (SA) y del ácido abscísico (ABA), entre otras. Aunque el ABA siempre se ha relacionado más fuertemente con la respuesta de defensa frente a estreses abióticos, actualmente se relaciona también con la respuesta de defensa frente a distintos patógenos y plagas (Ton et al., 2009; Barczak-Brzyżek et al., 2017).

Es muy habitual que en condiciones de campo las plantas han de hacer frente a diversos estreses a la vez. Es por ello que, a menudo, las diferentes fitohormonas se han de coordinar y actuar de manera conjunta para dar una respuesta efectiva. Por ejemplo, se ha demostrado que las rutas de señalización del JA y del ABA interaccionan en algunos puntos, como los receptores de ABA PYL4 (*Pyrabactin Resistance Receptors 4*) y PYL5 (Lackman et al., 2011), el receptor de ABA PYL6, que interacciona con MYC2 (Aleman et al., 2016) y la proteína E3 ubiquitina-ligasa KEG (Pauwels et al., 2015). Estos serían puntos de comunicación entre estas hormonas para coordinar su respuesta a diferentes estreses.

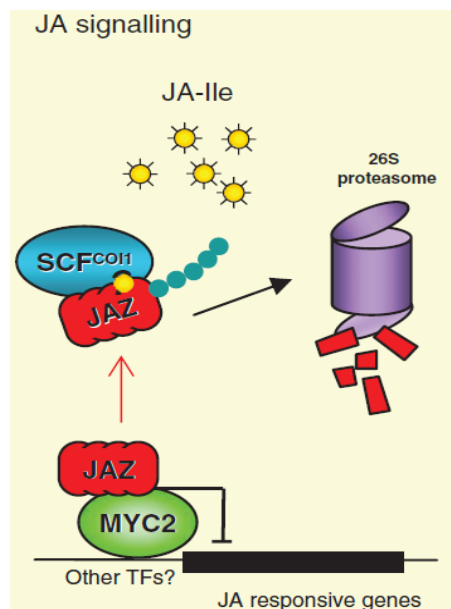


Figura 1: Ruta de señalización del JA simplificada. SCF^{COI1}: complejo formado por una ubiquitina quinasa y corantina insensible 1 (COI1). (Chini et al., 2009)

La ruta de señalización de JA (Figura 1) se activa no solo por señales de ataque por organismos, sino también por daño celular y otros estreses ambientales. Estas señales son captadas por receptores de la superficie celular que promueven la síntesis de la forma biológicamente activa jasmonoil-L-isoleucina (JA-Ile). La unión de JA-Ile al receptor COI1 (corantina insensible 1) promueve la unión de las proteínas JAZ al complejo SCF^{COI1} que es capaz de ubiquitinar y promover la degradación de las proteínas JAZ por el sistema proteosoma 26S. Las proteínas JAZ reprimían varios factores de transcripción como el MYC2. Al quedar liberado, los factores de transcripción como el MYC2

activan la expresión génica de genes relacionados con la elaboración de una respuesta frente al estrés que ha activado la ruta de señalización, como el ataque de patógenos (Howe et al., 2018).

En cuanto a la ruta de señalización del ABA (Figura 2 A), este trabajo se centra en la parte en la que interviene la familia de receptores *Pyrabactin Resistance / Pyrabactin Resistance Like / Regulatory Component of ABA Receptor* (PYR/PYL/RCAR). Diversos estudios han permitido definir un núcleo o core de

la ruta de señalización de ABA. Así en ausencia de ABA, las proteínas fosfatasa de tipo 2 C (PP2C) del clade A como HAB1 o ABI1, inhiben la activación de las proteínas quinasas de tipo SUCROSE NON-FERMENTING 1-RELATED SUBFAMILY 2 (SnRK2), concretamente las quinasas SnRK2.2, 2.3 y 2.6. En cambio, en presencia de ABA, este es reconocido por los receptores PYL/PYR/RCAR, que ahora con capaces de unirse a las PP2Cs. La unión de

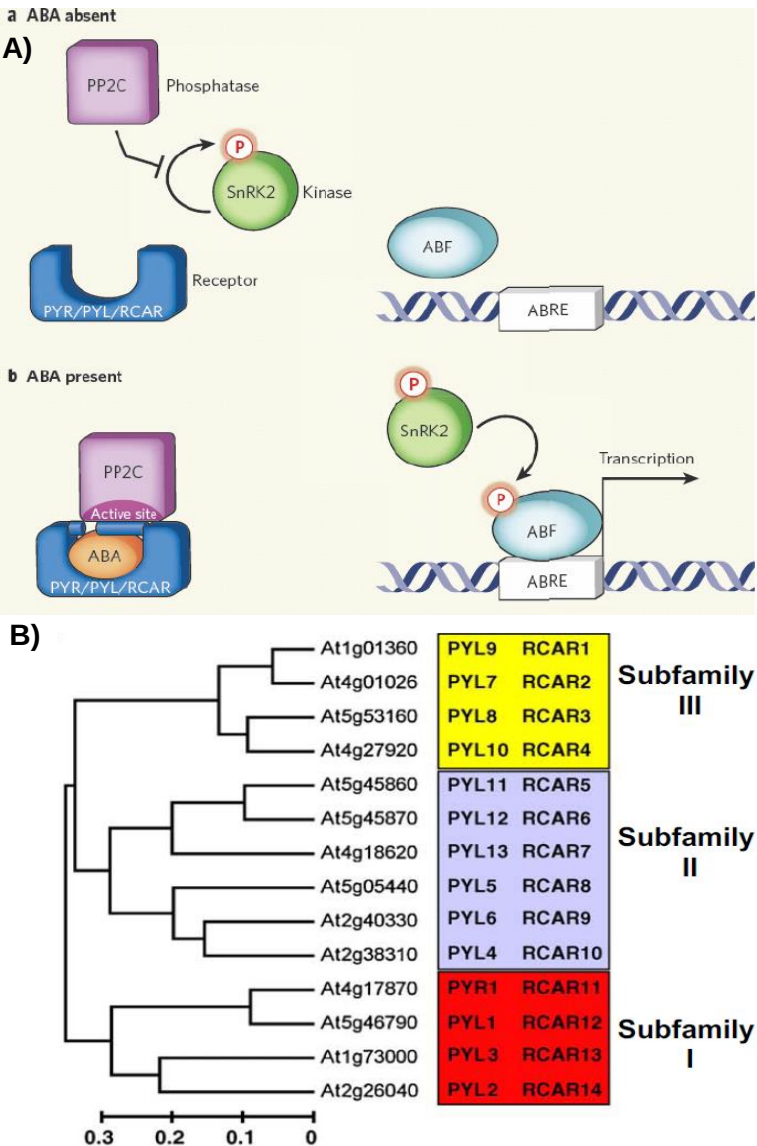


Figura 2: A) Ruta de señalización del ácido abscísico (ABA) simplificada. ABRE: elemento de respuesta a ABA, sitio de unión al DNA del factor de transcripción ABF. B) Familia de receptores PYR/PRL/RCAR.

PP2Cs con los receptores PYL/PYR/RCAR libera a las SnRK2s, que fosforilan y activan los elementos *aguas abajo*, como factores de transcripción del tipo ABF (factor de unión a elemento de respuesta a ABA), los cuales regulan la actividad transcripcional en respuesta al estrés. La familia está compuesta por 14 miembros en *A. thaliana* y se divide en tres subfamilias (Figura 2 B), que aunque han sido descritos como funcionalmente redundantes, diversos estudios indican que pueden tener diferencias funcionales. Este trabajo se centrará en los

receptores PYL4, PYL5 y PYL6, pertenecientes a la subfamilia II, ya que se ha comprobado que PYL4 y PYL5 tienen funciones específicas en los mecanismos

de defensa de las plantas (Lackman et al., 2011) y el receptor PYL6 puede unirse al factor de transcripción MYC2, clave en la defensa de las plantas frente a plagas dependiente de JA, y modular su actividad (Aleman et al., 2016).

Así pues, en este trabajo se estudiará la resistencia de diferentes mutantes de pérdida (*pyl4pyl5*, *pyl5*, *coi1-16*, *ao3-2*, *pyl6.1*, *hab1-1abi1-2* y *pyl5jin1-2*) o ganancia (*35S::HAB1* y *35S::SnRK2.3*) de función de elementos de las rutas de señalización del JA y del ABA a la infestación por ácaro. Esto permitirá empezar a descubrir qué elementos de estas rutas de señalización son esenciales en la regulación de las defensas de la planta frente al ácaro fitófago. Para este estudio se infestarán plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* con el ácaro *Tetranychus urticae*, utilizando como control el ecotipo Col-0.

También se estudiará la inhibición de la germinación dependiente de ABA de los mutantes *35S::SnRK2.3*, *snrk2.2snrk2.3*, *pyl4pyl5*, *hab1-1abi1-2*, *35S::HAB1*, *jin1-2*, *coi1-16*, *coi1-16hab1-1abi1-2*, *pyl4pyl5jin1-2* y *pyl6.1* a diferentes concentraciones de ABA, JA y ABA y JA combinadas durante la germinación y el establecimiento. Este estudio permite recabar información sobre como mutantes combinados de las rutas de señalización de JA y ABA responden e interaccionan a las dos hormonas tanto individualmente como combinadas.

4. Hipótesis y objetivos

La hipótesis de este trabajo de fin de grado es que el ABA juega un papel importante en la respuesta de la planta a la infestación por ácaro. Así pues, mediante el uso de mutantes de *A. thaliana* de las rutas de señalización del ABA y JA, la hormona principal en la respuesta de la planta frente a una infestación por ácaro, se intenta determinar el papel y la importancia del ABA en este escenario.

Para ello se proponen los siguientes objetivos principales:

1. Definir qué elementos de la ruta de señalización de ABA están implicados en la interacción *A. thaliana*-*T. urticae*.
2. Crear e identificar mutantes combinados de *Arabidopsis thaliana* de las rutas de señalización de ABA y JA que servirán para identificar posibles puntos de interacción entre las dos rutas de señalización en la respuesta de la planta al ácaro en futuras investigaciones.

5. Materiales y métodos

5.1. Material vegetal

5.1.1. Germinación y crecimiento de *A. thaliana*

Las semillas de *A. thaliana* destinadas tanto a ensayos como a la producción de más semillas se esterilizan en superficie con 500 μ L de solución etanol 70% Triton™ X-100 0.1% (Sigma-Aldrich) durante 10 minutos en agitación suave y posteriormente se hacen cuatro lavados con agua destilada. Las semillas esterilizadas se guardan en tubos eppendofrs con 500 μ L de agua destilada a 4 °C en oscuridad durante 24 horas.

Las semillas se germinan in vitro en placas Petri preparadas con medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con 1 % azúcar, 1 % European Bacteriological Agar (Laboratorios Conda) y ajustado a pH 5.7. Las placas en las que se realiza el ensayo de germinación y establecimiento se suplementan con ABA y JA de manera que se obtienen placas 0,5 μ M, 1 μ M y 3 μ M de ABA, 30 μ M y 50 μ M de JA y 0,5 μ M ABA 30 μ M JA y 1 μ M ABA 30 μ M JA.

Las semillas se depositan en las placas Petri con una micropipeta en líneas rectas, una a una y separadas. La germinación se lleva a cabo en cámara de cultivo con un fotoperiodo 16 horas de luz y ocho de oscuridad, a una intensidad fotónica entre 90 y 100 μ mol·m⁻²·s⁻¹, a 22±0.5°C y 60% de humedad relativa.

Las plántulas de siete días se trasplantan individualmente a Jiffy® (discos de turba prensados que al sumergirse en agua se hinchan, permitiendo su uso para germinar semillas o enraizar plántulas, Jiffy Group) y se guardan en una cámara de cultivo en las mismas condiciones a las que se ha llevado a cabo la germinación. Las plantas destinadas al estudio de la ruta de señalización de ABA implicados en la interacción *A. thaliana*-*T. urticae* se dejan crecer durante tres semanas, hasta que las hojas sean lo suficientemente grandes como para llevar a cabo la infestación por ácaros. Mientras que las plantas destinadas a producir semillas se dejan crecer, y una vez los tallos se hacen largos, estos se unen a

un soporte que les permita crecer más sin llegar a romperse y que separe los tallos de las diferentes plantas para facilitar la recolección de semillas.

5.1.2. Cultivo de *Phaseolus vulgaris* variedad California Red Kidney

La población de ácaros *T. urticae* (London strain, Grbic lab) se mantiene en plantas de judía *Phaseolus vulgaris* variedad California Red Kidney. Las semillas de *P. vulgaris* se esterilizan en superficie con una solución 50 % lejía, 50 % agua durante 2 minutos y se germinan en una cámara en oscuridad. Una vez germinadas, las plántulas se trasplantan a Jiffy® y crecen en cámara en condiciones fotoperiodo 16 horas de luz y ocho de oscuridad, intensidad fotónica entre 90 y 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a $22\pm0.5^{\circ}\text{C}$ y 60% de humedad relativa. Una vez establecidas y un poco crecidas, se trasplantan a maceta, donde continúan creciendo.

Las plantas de judía se van poniendo en contacto con plantas infestadas por ácaro, de manera que siempre hay, como mínimo, dos plantas de judías infestadas. Las plantas infestadas se mantienen aisladas del resto, en una cámara aparte en las condiciones detalladas anteriormente y dentro de una malla, de manera que los ácaros no puedan infestar otras plantas.

5.1.3. Mutantes de *A. thaliana* utilizados

Durante este trabajo se utilizó el ecotipo Col-0 de *A. thaliana* y los mutantes simples *aao3-2*, *pyl5*, *coi1-16*, *pyl6.1*, *35S::PYL6*, *35S::SnRK2.3*, *35S::HAB1* y *jin1-2*, los mutantes dobles *pyl4pyl5*, *hab1-1abi1-2* y *snrk2.2 snrk2.3* y los mutantes triples *jin1-2hab1-1abi1-2*, *coi1-16pyl4pyl5* y *pyl4pyl5jin1-2* (detalles en la Tabla 1).

Tabla 1: En esta tabla se recogen los códigos de los mutantes utilizados, la posición del T-DNA de aquellos mutantes por inserción de T-DNA, el tipo de mutación, la función principal de la proteína mutada y la ruta de señalización en la que participa.

Genotipo	Código línea	Posición T-DNA (mRNA)	Mutación	Función principal	Ruta
Col-0	-	-	-	-	-
<i>pyl4</i>	SAIL_517_C08	210	Pérdida de función	Receptor de ABA	Señalización de ABA
<i>pyl5</i>	SM3-3493	420	Pérdida de función		
<i>pyl6.1</i>	SAIL_1179_D01	150	Pérdida de función		
<i>35S::PYL6</i>	-	-	Sobreexpresión		
<i>hab1-1</i>	SALK_002104	1201	Pérdida de función	Fosfatasa tipo 2C clade A	
<i>abi1-2</i>	SALK_72009	556	Pérdida de función		
<i>35S::SnRK2.3</i>	-	-	Sobreexpresión	Proteína quinasa	
<i>snrk2.2</i>	GABI-Kat 807G04	408	Pérdida de función		
<i>snrk2.3</i>	SALK_107315	462	Pérdida de función		
<i>35S::HAB1</i>	-	-	Sobreexpresión		
<i>coi1-16</i>	-	-	C733T (pérdida de función)	Receptor de JAZ	Señalización de JAs
<i>jin1-2</i>	-	-	G582A (pérdida de función)	Factor de transcripción MYC2	Señalización ABA/JAs
<i>aao3-2</i>	-	282	Pérdida de función	Aldehído oxidasa	Biosíntesis de ABA

Todos los mutantes de *A. thaliana* utilizados son mutantes de pérdida de función excepto *35S::PYL6*, *35S::SnRK2.3* y *35S::HAB1*. Estos mutantes se han obtenido mediante inserción de T-DNA, de transposón o por cambio de nucleótido que provoca un cambio en la secuencia de aminoácidos y da lugar a una falta de funcionalidad de la proteína.

5.2. Material no vegetal

Para realizar las PCRs se ha utilizado 10X PCR Buffer II Applied Biosystems de Thermo Fisher Scientific (Ref 4486220), MgCl₂ Solution 25mM Applied Biosystems de Thermo Fisher Scientific (Ref 4486224), dNTP Mix 2mM de Thermo Fisher Scientific (Ref 00705598), AmpliTaq Gold DNA Polymerase 250U Applied Biosystems de Thermo Fisher Scientific (Ref 4486226) y las parejas de primers de sintetizados por Sigma-Aldrich (Tabla 2).

Para realizar las electroforesis se utiliza agarosa de Fisher BioReagents, SYBR Safe DNA gel stain de Invitrogen y 6X DNA Loading Dye de Fermentas, GeneRuler 1 kb DNA Ladder ready-to-use 0.1 µg/µL de Thermo Scientific.

La purificación de DNA a partir de bandas de gel de electroforesis se realiza con el kit GeneJET™ Gel Extraction Kit de Thermo Scientific (#K0691).

5.3. Generación e identificación de mutantes combinados de pérdida de función

Para obtener mutantes combinados se cruzan dos plantas que tengan cada una uno de los genotipos deseados. Para ello se sigue el protocolo del anexo 9.1. El genotipado de los mutantes se realiza en la generación F₂ del cruce.

El proceso de identificación de mutantes combinados depende de la naturaleza de la mutación. En este caso, se realizó la identificación de plantas de *A. thaliana* que correspondían al genotipo *coi1-16pyl4pyl5* y *pyl4pyl5jin1-2*. Las mutaciones *pyl4* y *pyl5* son debidas a una inserción de T-DNA, mientras que las mutaciones *coi1-16* y *jin1-2* son mutaciones puntuales de cambio de nucleótido (Tabla 1). Para comprobar la presencia de mutaciones puntuales es necesario secuenciar la región de DNA en la que se debe encontrar la mutación, mientras que las mutaciones por inserción de T-DNA se pueden comprobar mediante PCRs. Así pues, los dos cruces han de pasar una ronda de cribaje por PCR antes de ser secuenciados. De esta manera se ahorra tanto dinero (la secuenciación de un fragmento de DNA de unos 600 nucleótidos cuesta unos 6€ en el Servicio de Secuenciación del IBMCP), como tiempo. Además, en estos casos interesan

tanto los triples mutantes (*coi1-16pyl4pyl5* y *pyl4pyl5jin1-2*) como los mutantes dobles *coi1-16pyl4*, *coi1-16pyl5* y *pyl4jin1-2*.

5.3.1. Recogida de material vegetal

Se parte de 81 individuos F2 del cruce *coi1-16xpyl4pyl5* y se completó el análisis del cruce *pyl4pyl5xjin1-2* con 19 individuos F2.



Figura 3: Material necesario para llevar a cabo la recogida de muestra: material vegetal, nitrógeno líquido, eppendorfs, báscula, pinzas, tijeras y guantes.

Para la recogida de las muestras se cortan, con la ayuda de pinzas, tijeras y una balanza, entre 50 y 100 mg de hojas de cada individuo de cada cruce y se ponen en tubos eppendorfs de 1.5 ml por separado. Se congelan los eppendorfs en nitrógeno líquido y se conservan a -20 °C hasta el momento de la extracción del DNA.

5.3.2. Extracción de DNA

Para este paso se siguió una variante del protocolo clásico descrito por Murray and Thompson (1980) (Anexo 9.2).

Primero se esteriliza la poyata, las pipetas y el *micropestle* con etanol y papel. Luego se congelan los eppendorfs con las muestras en nitrógeno líquido y se muelen con el *micropestle* esterilizado. Si las muestras pesan 100 mg o menos se añaden a cada eppendorf 0.2 mL de un tampón de extracción precalentado a 60 °C compuesto por 2% CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio; desestabiliza la membrana celular provocando una mayor lisis y permite precipitar selectivamente el ácido nucleico en soluciones con elevada concentración iónica), 100 mM Tris-HCl (Tris(hidroximetil)aminometano; mantiene el pH entre 7.5 y 8.2), 20 mM EDTA (etilendiaminotetraacético; impide la acción de las nucleasas al unirse a cationes metálicos en la solución), 1.4 M

NaCl (protege al DNA de la degradación y mejora la precipitación del ácido nucleico) y 1% PVP40 (ayuda a eliminar los derivados fenólicos de la solución).

Una vez añadido el tampón de extracción se agita cada muestra dos veces y se incuban a 60 °C durante 10 minutos. Después se añaden, en campana, 0.2 mL de una solución 24:1 de cloroformo:alcohol isoamílico con la finalidad de separar los ácidos nucleicos y las proteínas. Los eppendorfs se agitan y se centrifugan 10 minutos a 14500 rpm. Durante la centrifugación se forman dos fases. En la fase superior se encuentran los ácidos nucleicos, mientras que en la inferior se encuentran las proteínas y los restos vegetales.



Figura 4: Fotografía que muestra las dos fases que se forman tras añadir cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y centrifugar durante la extracción de DNA. En la fase superior se encuentran los ácidos nucleicos, mientras que en la inferior se encuentran las proteínas y los restos vegetales.

La fase superior de cada muestra se recoge con cuidado y se deposita en un nuevo eppendorf y se añaden 20 µL de 10% CTAB precalentado a 60 °C (se forma el complejo CTAB/DNA-RNA que permitirá la precipitación de los ácidos nucleicos). Para inducir la precipitación del complejo se añaden 440 µL de agua MiliQ fría, se agita por inversión suave y se incuban los eppendorfs 15

minutos en hielo. Una vez pasados los 15 minutos, los eppendorfs se centrifugan 10 minutos a 14500 rpm. Se descarta el sobrenadante de cada muestra y se resuspende el precipitado añadiendo 0.4 mL de NaCl 1M (disuelve el complejo CTAB/DNA-RNA)

y agitando. Se añaden 0.8 mL de etanol 100% para precipitar el DNA y se incuban nuevamente los eppendorfs 15 minutos en hielo. Se centrifugan 10 minutos a 14500 rpm, se descarta el sobrenadante y se añaden 0.5 mL de etanol 75% para eliminar más sales. Por último, se centrifugan 2 minutos a 14500 rpm, se descarta el sobrenadante y se dejan secar 24 h (eppendorfs abiertos).

El DNA extraído se resuspende en 30 µL de agua MiliQ y se cuantifica mediante espectrofotometría con el Nanodrop 2000. Se esperan concentraciones de DNA superiores a 100 ng/µL y con ratios 260/280 sobre 1.8.

5.3.3. Identificación mediante PCR y secuenciación

La identificación de los mutantes combinados *pyl4pyl5jin1-2* y *coi1-16pyl4pyl5* se realizó mediante dos PCR, que determinan qué individuos de cada cruce tienen los genes PYL4 y PYL5 mutados mediante inserción de T-DNA, y una posterior secuenciación de aquellos individuos que contengan las combinaciones de mutaciones deseadas.

En la primera PCR (PCR negativa), solo se amplifican los genes PYL4 y PYL5 que no están mutados (Tabla 2). Los individuos que presenten banda en la electroforesis serán aquellos que no tengan insertado un T-DNA, aquellos que no presenten banda son candidatos a ser mutantes, ya que el T-DNA impide la amplificación de estas regiones debido a su gran tamaño.

Los individuos que no presentan banda en la primera PCR se someten a una segunda PCR (PCR positiva). En esta segunda PCR se utiliza un *primer* del T-DNA y otro de la zona adyacente del gen correspondiente (PYL4 o PYL5), de manera que los individuos que presenten bandas serán aquellos que contengan el T-DNA. Esta segunda PCR permite la confirmación de las mutaciones por inserción de T-DNA.

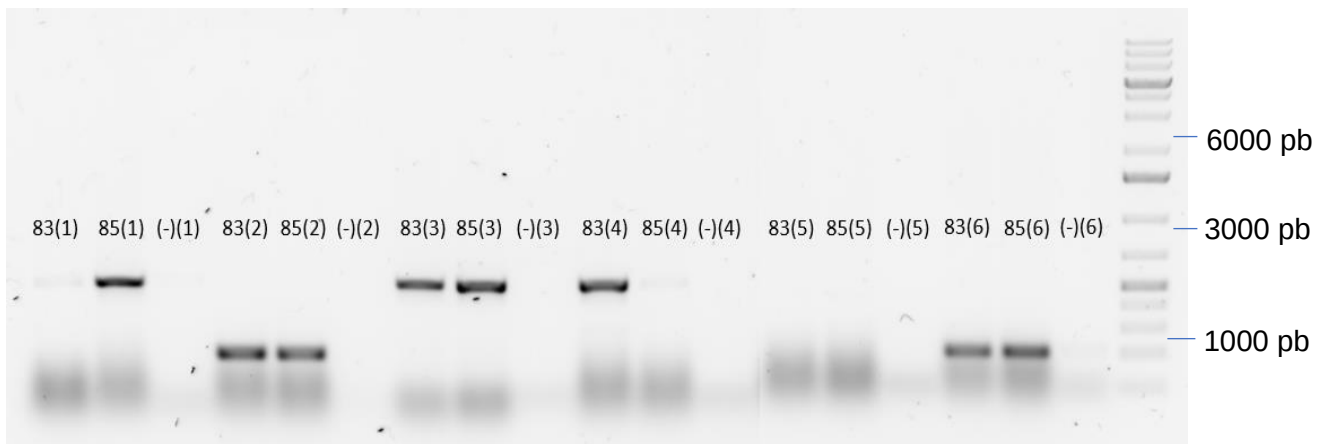


Figura 5: Ejemplo de las PCRs realizadas en las que se comprueba qué combinación de *primers* es la correcta para las PCRs positiva. En las que el número fuera de los paréntesis indica el individuo de *pyl4pyl5jin1-2* analizado y el de dentro de los paréntesis indica la combinación de *primers* utilizada, donde F es *forward* y R es *reverse* (1): *primers* Fpyl4 y Rpyl4 (PCR negativa); (2): *primers* Fpyl4 y LB3Sail (PCR positiva); (3): *primers* LB3Sail y Rpyl4 (PCR positiva); (4): *primers* Fpyl5 y Rpyl5 (PCR negativa); (5): *primers* Fpyl5 y Spm3 (PCR positiva); (6): *primers* Spm3 y Rpyl5 (PCR positiva).

Por último, se secuencian los individuos confirmados como posibles mutantes de interés. Para ello se realiza una tercera y última PCR en la que se utilizan *primers* (Tabla 2) que permiten obtener amplicones que contienen las mutaciones puntuales. Las bandas del gel de la electroforesis de estas PCRs se purifican con el kit GeneJET™ Gel Extraction Kit de Thermo Scientific (#K0691) y se envían al Servicio de Secuenciación del IBMCP, que realiza la secuenciación.

Tabla 2: En esta tabla se recogen las secuencias de los *primers* utilizados en las PCRs para la identificación de mutantes combinados.

	Primers (5'-->3')		
	Gen/alelo	Forward	Reverse
Amplificación del ADN genómico (PCR negativa)	<i>pyl4</i>	atgcttgccgttcaccgtcctt	tcacagagacatcttcttctgct
	<i>pyl5</i>	atgaggtcaccggtgcaactcca	ttattgccggttggtacttcgag
	<i>hab1-1</i>	aactgctgttggtgccttg	ggttctggtcttgaactttct
	<i>abi1-2</i>	catgtcgagatccattggcgatag	actctcttcacagccgtcacttc
Amplificación T-DNA (PCR positiva)	<i>pyl4</i>	tagcatctgaatttcataaccaatctcgatacac	tcacagagacatcttcttctgct
	<i>pyl5</i>	accgtcgactacctttttctttagtg	ttattgccggttggtacttcgag
	<i>hab1-1</i>	gccgatttcggaaccaccatc	ggttctggtcttgaactttct
	<i>abi1-2</i>	gccgatttcggaaccaccatc	actctcttcacagccgtcacttc
Secuenciación	<i>jin1-2</i>	tatgatttctcgggcgcctc	tagacgggtcgttctcacct
	<i>coi1-16</i>	tgagcttgctcagcacaacac	ataagcgtacaatgggtcttcag

5.4. Bioensayos con *T. urticae* de elementos de la ruta de señalización de ABA

En este estudio se infestan diferentes mutantes de las rutas de señalización de ABA y JA de *A. thaliana* con ácaros *T. urticae* con el objetivo de determinar si existe variación en el daño producido por la araña roja entre los mutantes, para así definir qué elementos de la ruta de señalización de ABA están implicados en la interacción *A. thaliana*-*T. urticae*.



Figura 6: Esquema de la línea temporal que se sigue en los ensayos de infestación por ácaros.

Cuatro días antes de empezar el ensayo se pone una nueva planta de judía en contacto con las plantas infestadas, de manera que habrá tres plantas infestadas a la hora de empezar la infestación de los mutantes de *A. thaliana* a ensayar. Así se asegura que haya suficientes ácaros para llevar a cabo el ensayo.

Se realizan cuatro ensayos en los que se incluye el ecotipo Col-0 como control.

En los cuatro ensayos la infestación por *T. urticae* se lleva a cabo en cada planta individualmente. Se infesta cada planta con 30 hembras adultas con la ayuda de una lupa binocular y de una bomba de succión conectada a un tubo de goma unida a una punta de pipeta cortada en horizontal y ensamblada a otra punta de pipeta. Entre las dos puntas se coloca una malla que recoge los ácaros, evitando su paso al tubo de goma y a la bomba.



Figura 7: Herramientas necesarias para llevar a cabo la recogida de ácaros. Microscopio, bomba, tubo de goma, sistema montado con puntas de pipetas que facilita la recogida de ácaros.

Las hembras adultas de *T. urticae* son fácilmente reconocibles debido a las manchas características que tienen en su espalda y a que son más redondas y grandes que los machos.

La infestación se realiza de la siguiente manera: se colocan hojas de judía infestada en una placa para evitar la dispersión de los ácaros. Observando las hojas por la lupa se aspiran treinta ácaros hembras gracias al sistema formado por la bomba, el tubo de goma, las puntas de pipeta y la malla. Estos ácaros se colocan en otra placa y

con la ayuda de un pincel húmedo se depositan en las hojas de uno de los individuos del ensayo.

En el primer ensayo se estudian los mutantes *pyl4pyl5*, *pyl5*, *coi1-16* y *aao3-2*. Se infestan 11 individuos de cada genotipo, excepto del genotipo *pyl5* que se infestan 12. Debido al elevado número y para facilitar su manipulación, las plantas se infestaron en dos días consecutivos, seis individuos de cada genotipo el primer día y el resto de individuos de cada genotipo el segundo día.

En el segundo ensayo se estudian los mutantes *pyl6.1*, *hab1-1abi1-2* y *35S::PYL6*. En este ensayo se disponen de 15 individuos de los genotipos *35S::PYL6* y Col-0, 14 del genotipo *pyl6.1* y 16 del genotipo *hb1-1abi1-2*. Por ello 5 individuos de cada genotipo se mantienen sin infestar a modo de control. El resto de los individuos se dividen en dos grupos de infestación como en el primer ensayo.

En el tercer ensayo se pretendían estudiar los mutantes *pyl4pyl5*, *pyl5*, *jin1-2*, *pyl5jin1-2*, *pyl6.1* y *35S::PYL6*. Se quería volver a ensayar los genotipos *pyl4pyl5*, *pyl5*, *pyl6.1* y *35S::PYL6* para confirmar los resultados del primer ensayo. Sin embargo, las plantas sufrieron un estrés desconocido durante su crecimiento que hizo que no se pudiera finalizar este ensayo.

En el cuarto ensayo se estudian los mutantes *35S::HAB1*, *pyl4pyl5*, *pyl5jin1-2* y *35S::SnRK2.3*. En este ensayo se disponen de 20 individuos de cada genotipo, sin embargo, debido a que en algunos de ellos se observa el efecto del mismo estrés desconocido que en el tercer ensayo este número se reduce. Así pues, quedan 5 individuos Col-0, 8 *35S::HAB1*, 6 *pyl4pyl5*, 7 *pyl5jin1-2* y 5 *35S::SnRK2.3* como control y 7 individuos Col-0, 9 *35S::HAB1*, 8 *pyl4pyl5*, 9 *pyl5jin1-2* y 8 *35S::SnRK2.3* para ensayar. Los individuos a ensayar se dividen en dos grupos como en el resto de los ensayos, el primero se compone de cinco individuos de cada genotipo, incluido Col-0 y el segundo del resto de individuos.

Las plantas infestadas y control permanecen en cámara de cultivo con un fotoperiodo 16 horas de luz y ocho de oscuridad, a una intensidad fotónica entre 90 y 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a $22\pm0.5^{\circ}\text{C}$ y 60% de humedad relativa durante cuatro días.

Tras estos cuatro días se cortan las rosetas de todos los individuos. Las rosetas de los individuos control se empaquetan en papel albal, se rotulan y se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido. Las de los individuos infestados se escanean para poder posteriormente cuantificar el daño. Para que en el escaneado se visualicen todas las hojas, se cortan aquellas que se superpongan y se colocan de manera que se puedan visualizar correctamente. Una vez escaneadas se empaquetan en papel albal, se rotulan y se congelan en nitrógeno líquido.

Las rosetas congeladas se guardan a -20 °C. Con estas rosetas se pueden cuantificar los niveles de glucosinolatos.

Los escaneados de las rosetas se utilizan para cuantificar el daño causado por los ácaros mediante la herramienta informática de edición de imágenes *Gimp* (versión 2.10). Se crea una *capa* por cada planta a cuantificar y se seleccionan los puntos de daño con la herramienta *píxel*. El programa indica el número píxeles señalados en cada capa. Sabiendo que 144 píxeles corresponden a 1 mm² se pueden calcular los mm² de daño de cada roseta dividiendo el número de píxeles de cada individuo entre 144.

5.5. Ensayo de germinación y establecimiento de plántulas en diferentes concentraciones de ABA y/o JA

En este ensayo se estudia la sensibilidad de diferentes mutantes al ABA y al JA. Para ello se estudia la germinación y establecimiento de plántulas de los mutantes *35S::SnRK2.3*, *snrk2.2snrk2.3*, *pyl4pyl5*, *hab1-1abi1-2*, *35S::HAB1*, *jin1-2*, *coi1-16*, *coi1-16hab1-1abi1-2*, *pyl4pyl5jin1-2* y *pyl6.1* y el genotipo Col-0 como control en diferentes concentraciones de ABA y JA.

Se sembraron alrededor de 100 semillas de cada genotipo en placas preparadas con medio Murashige and Skoog suplementadas con diferentes concentraciones de ABA (0.5 µM, 1 µM y 3 µM), JA (30 µM y 50 µM) y las dos hormonas combinadas (30 µM JA 0,5 µM ABA y 30 µM JA 1 µM ABA) y 20 semillas de cada genotipo en placas con medio Murashige and Skoog (MS) no suplementadas a modo de control.

Los ensayos duraron 10 días durante los cuales se escanean las placas y se contabilizan las semillas germinadas y establecidas como plántulas, y el día en que lo hacen. Las placas se mantienen en cámara en condiciones de fotoperiodo 16 horas de luz y ocho de oscuridad, intensidad fotónica entre 90 y 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a $22\pm0.5^{\circ}\text{C}$ y 60% de humedad relativa.

6. Resultados

6.1. Identificación de mutantes combinados

Con el objetivo de identificar mutantes combinados se analizaron 19 individuos F2 del cruce *pyl4pyl5xin1-2* y 81 individuos F2 del cruce *coi1-16xpyl4pyl5*. Como resultado del análisis se obtuvo que solo los individuos 73 y 83 del cruce *pyl4pyl5xin1-2* y los individuos 15, 20, 21, 46, 48, 51, 72, 77, 79 y 80 del cruce *coi1-16xpyl4pyl5* son alelos mutantes para PYL4 y PYL5 según las dos rondas de PCR. Los alelos mutantes *jin1-2* y *coi1-16* deben ser identificados mediante secuenciación, de modo que se secuenciaron los genes MYC2 y CO1 en los individuos mencionados anteriormente. Los resultados de la secuenciación indican que solo el individuo F2.90 contiene la mutación puntual G582A propia de *jin1-2* de modo que sería el mutante combinado *pyl4jin1-2*; y solo el individuo F2.77 contiene la mutación puntual C733T propia de *coi1-16* y es el mutante *coi1-16pyl4pyl5*.

Tabla 3: Resumen de los análisis realizados para la identificación de mutantes combinados.

Cruce	Individuos analizados	Mutantes para PYL4	Mutantes para PYL5	Mutantes para PYL4 y PYL5	Individuos secuenciados
<i>pyl4pyl5xin1-2</i>	19	2	5	2	4
<i>coi1-16xpyl4pyl5</i>	81	4	11	10	10

Tabla 4: Resultados de la secuenciación.

Nombre	Resultados	
<i>jin1-2pyl4pyl5</i> F2.73	A582 mutante, G582 wt	Heterocigoto
<i>jin1-2pyl4pyl5</i> F2.79	A582 mutante, G582 wt	Heterocigoto
<i>jin1-2pyl4pyl5</i> F2.83	G582 wt	
<i>jin1-2pyl4pyl5</i> F2.90	A582 mutante	Homocigoto
<i>coi1-16pyl4pyl5</i> F2.15	T733 mutante, C733 wt	Heterocigoto
<i>coi1-16pyl4pyl5</i> F2.20-21	C733 wt	
<i>coi1-16pyl4pyl5</i> F2.46	C733 wt	
<i>coi1-16pyl4pyl5</i> F2.48	C733 wt	
<i>coi1-16pyl4pyl5</i> F2.51	C733 wt	
<i>coi1-16pyl4pyl5</i> F2.72	C733 wt	
<i>coi1-16pyl4pyl5</i> F2.77	T733 mutante	Homocigoto
<i>coi1-16pyl4pyl5</i> F2.79	C733 wt	
<i>coi1-16pyl4pyl5</i> F2.80	C733 wt	

Además, también se identificaron 4 individuos del cruce *coi1-16xpyl4pyl5* que eran mutantes solo para el gen PYL4 y 11 individuos solo para gen PYL5. El DNA de estos individuos se pretende secuenciar en el futuro para poder identificar los mutantes dobles *coi1-16pyl4* o *coi1-16pyl5*.

6.2. Estudio de los elementos de la ruta de señalización de ABA implicados en la interacción *A. thaliana*-*T. urticae*

Para identificar los elementos de la ruta de señalización del ABA implicados en la respuesta a la infestación por ácaro, se realiza un ensayo de daño foliar por *T. urticae* en mutantes de *A. thaliana*. Se ensaya en mutantes de la ruta de señalización de JA (*coi1-16* y *jin1-2*), en un mutante de biosíntesis de ABA (*aao3-2*), en mutantes de receptores de ABA tipo PYR/PYL/RCAR (*pyl4pyl5*, *pyl5*, *pyl6.1* y *35S::PYL6*), en mutantes de fosfatasa de la familia PP2C clade A (*hab1-1abi1-2*, *35S::HAB1*) y en un mutante de quinasa de la familia SnRK2 (*35S::SnRK2.3*).

Los resultados se recogen en el siguiente gráfico (Figura 8).

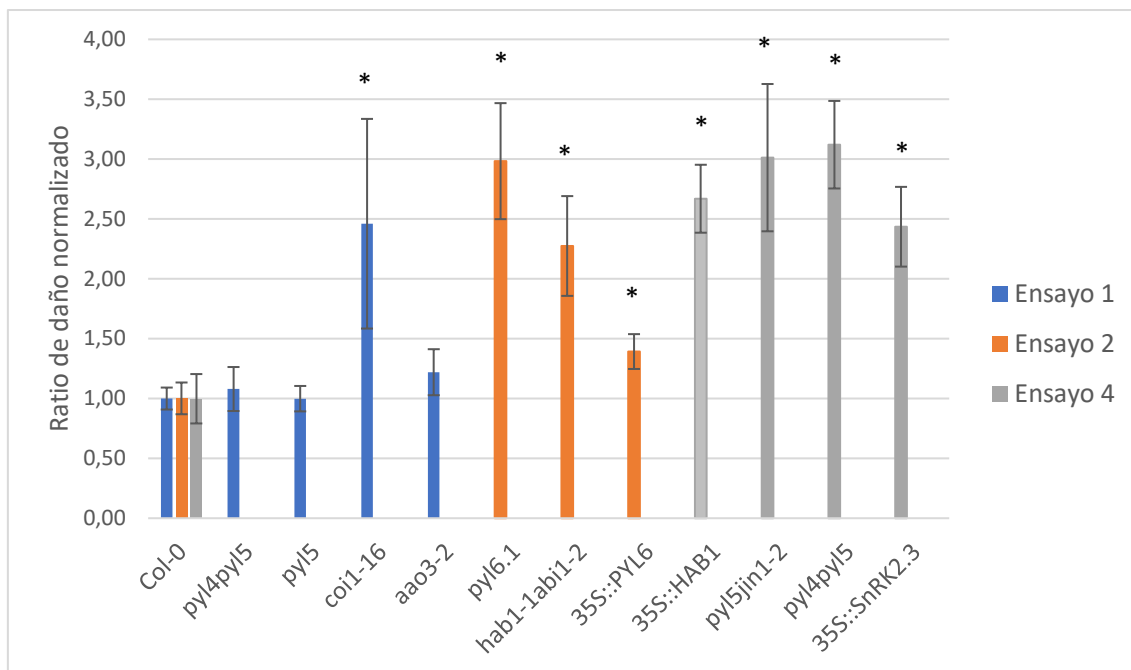


Figura 8: Gráfico en el que se representa la cuantificación del área dañada de los diferentes genotipos de *A. thaliana* normalizada respecto al control Col-0 para cada experimento. (*): significativamente diferente de Col-0, el control (p valor $\leq 0,05$).

Al comparar el daño de los genotipos analizados se observa que la cantidad de daño recibida por los mutantes *coi1-16*, *pyl6.1*, *hab1-1abi1-2*, *35S::PYL6*, *35S::HAB1*, *pyl5jin1-2*, *pyl4pyl5* (del ensayo 4) y *35S::SnRK2.3* es significativamente mayor que el recibido por sus respectivos controles siendo de $2,46 \pm 0,88$; $2,98 \pm 0,48$; $2,27 \pm 0,42$; $1,39 \pm 0,15$; $2,67 \pm 0,28$; $3,01 \pm 0,62$; $3,12 \pm 0,37$; $2,43 \pm 0,33$ respectivamente.

El mutante *coi1-16* posee mutado el receptor COI1 de JA, la hormona principal en la respuesta de defensa frente a la infestación por ácaros. Los resultados indican que la carencia de señalización de JA produce un aumento significativo del daño producido por ácaros, la cual cosa corrobora que la ruta de señalización del JA es muy importante en la respuesta de la planta a *T. urticae*.

Los receptores de ABA de la familia PYR/PYL/RCAR en presencia de ABA son capaces de unirse a las fosfatasa del tipo PP2Cs, liberando a las SnRK2s y permitiendo su activación por fosforilación, de manera que se forma la respuesta dependiente de ABA. En este trabajo se estudian los mutantes de pérdida de función *pyl5*, *pyl6.1*, *pyl4pyl5* y el mutante de ganancia de función *35S::PYL6*. Los resultados obtenidos indican que los receptores PYL4, PYL5 y PYL6, receptores de la subfamilia II, son necesarios para una correcta respuesta de

defensa de la planta ante una infestación por los ácaros *T. urticae* dado que tanto el mutante simple *pyl6.1* como los mutantes combinados *pyl4pyl5* (del ensayo 4) presentan significativamente más daño que sus respectivos controles de Col-0. Así mismo, los resultados indican que el receptor PYL6 es más importante para la defensa de la planta que los receptores PYL4 y PYL5, ya que los mutantes sencillos *pyl5* y *pyl4* (que fue ensayado anteriormente) mostraron un fenotipo similar al control Col-0. Así pues, los resultados obtenidos indican que ambos receptores (PYL4 y PYL5) poseen función redundante y solo se observa fenotipo cuando ambos se combinan. Además, el receptor PYL6 podría tener una función especial en la señalización de la respuesta frente a la infestación por ácaro puesto que el mutante simple *pyl6.1* presenta un fenotipo de daño.

El mutante combinado *pyl5jin1-2* muestra un fenotipo de mayor daño que los sencillos, ya que los mutantes sencillos *pyl5* y *jin1-2* se comportan como el control Col-0 (el mutante *jin1-2* ha sido analizado anteriormente). Este resultado indicaría que ambos elementos, el receptor PYL5 y el factor de transcripción MYC2, están involucrados en la respuesta y que hay un efecto sinérgico entre las rutas de señalización de ABA y JA en la respuesta de la planta frente a la infestación por ácaro. Un reciente trabajo ha demostrado que el receptor PYL6 y el MYC2 interactúan, y que esta interacción lleva a un control diferencial de dos elementos reguladores de la familia JAZ y a una expresión diferencial de los genes dependientes de JA, hormona principal de la respuesta frente ácaro (Aleman et al., 2016). En cuanto a los resultados, cuando usamos el mutante *35S::PYL6*, se observa un aumento significativo del daño respecto al control, aunque inferior al del mutante *pyl6.1*. Estos resultados son difíciles de interpretar puesto que tanto la pérdida como la ganancia de función del receptor PYL6 han mostrado un fenotipo similar.

Hay que mencionar que el mutante *pyl4pyl5* presenta resultados muy diferentes en los ensayos 1 y 4. Esto puede ser debido a que las condiciones de los dos ensayos no fueron iguales, como ya se ha explicado, en el ensayo 4 las plantas sufrieron un estrés no identificado que puede haber afectado a los resultados. Sin embargo, el resultado obtenido en el ensayo 4 se ajusta más a estudios realizados con anterioridad en el laboratorio (datos no publicados).

En *A. thaliana* hay 9 fosfatasa pertenecientes a la ruta de señalización de ABA, las llamadas fosfatasa de tipo 2C del clade A y 3 quinasas SnRK2s que han sido implicadas en el core de la ruta de señalización del ABA (Cutler et al., 2010). Respecto a las fosfatasa, en el presente trabajo se han estudiado el mutante doble de pérdida de función *hab1-1abi1-2* y el mutante de ganancia de función *35S::HAB1*. Los resultados muestran que ambos mutantes presentan una cantidad de daño similar y significativamente superior a su control. Teniendo en cuenta que son genotipos contrarios, igual que pasa con el mutante de ganancia y pérdida de función del receptor PYL6, los datos son difíciles de interpretar y es necesario repetir los ensayos para confirmar los resultados. Así mismo, la sobreexpresión de la quinasa SnRK2.3 da lugar a un aumento significativo del daño, lo cual tampoco tiene una fácil explicación. En cualquier caso, haría falta realizar más ensayos con otros elementos del core de la ruta de señalización de ABA. Además, tenemos que tener en cuenta que se han descrito sobre 113 combinaciones activas de las 126 posibles entre los receptores PYR/PYL/RCAR y las fosfatasa PP2C, de modo que la ruta de señalización no es lineal y es bastante más compleja de lo que se esperaba (Tischer et al., 2017).

Por último, se analizó el mutante de pérdida de función de la enzima aldehído oxidasa (*aao3-2*), que cataliza el último paso en la biosíntesis del ABA, el cual no presenta significativamente más daño que el control. Esto puede ser debido a que los niveles de ABA son suficientes para producir la respuesta a la infestación por ácaro. Esta descrito que este mutante es capaz de incrementar sus niveles de ABA en respuesta a estrés abiótico, postulándose que existen otras enzimas similares las cuales serían capaces de realizar la misma reacción de manera que suplen parcialmente la carencia de esta enzima (González-Guzmán, 2004).

Para concluir podemos decir que los resultados del presente trabajo final de grado indican que los receptores de ABA de la familia PYL/PYR/RCAR subfamilia II, las fosfatasa HAB1 y ABI1 y la quinasa SnRK2.3 están implicados en la interacción *A. thaliana*-*T. urticae*. No obstante, pese a que los resultados obtenidos no indican que los ensayos no hayan sido realizados correctamente, estos ensayos se deberían repetir ya que, al haber intervenido un estrés no identificado, las condiciones de los ensayos se han visto alteradas.

6.3. Ensayo de germinación y establecimiento de plántulas en diferentes concentraciones de ABA y/o JA

Los resultados se van a analizar organizando los genotipos en cuatro grupos: (i) *coi1-16hab1-1abi1-2*, *coi1-16* y *hab1-1abi1-2*; (ii) *pyl6.1*, *pyl4pyl5* y *pyl5*; (iii) *35S::HAB1*, *snrk2.2snrk2.3* y (iv) *35S::SnRK2.3* y *jin1-2*, *pyl5* y *pyl5jin1-2*. En el primer ensayo (Figura 9 A) se observan problemas de viabilidad en las semillas correspondientes a los genotipos *coi1-16*, Col-0 y *35S::HAB1*, los cuales presentaron un porcentaje de establecimiento en medio MS de 70,59%, 76,19% y 72,22% respectivamente. En el segundo ensayo (Figura 9 B) también se observan problemas de viabilidad en los genotipos *coi1-16*, *35S::HAB1* y *pyl5*, que presentaron un porcentaje de establecimiento de 72,22%, 83,33%, 80,95% respectivamente en medio MS. Estos problemas de viabilidad son frecuentes cuando analizamos mutantes en la ruta de señalización o biosíntesis de ABA y no se usan semillas recogidas recientemente (Cutler, 2010).

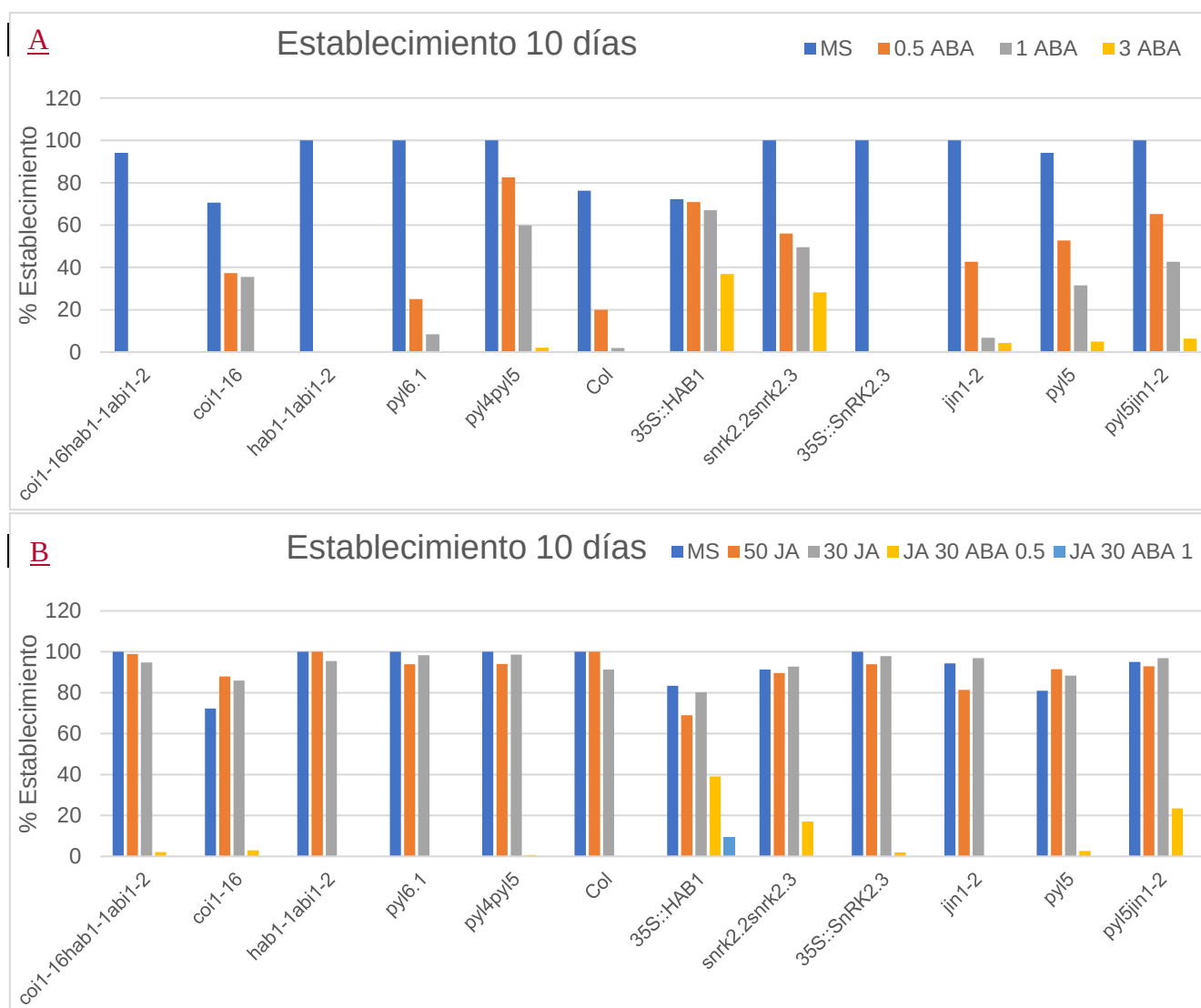


Figura 9: Gráfico en el que se representan los porcentajes de semillas establecidas de cada genotipo en cada condición el día 10 del ensayo.

En cuanto al grupo formado por los genotipos *coi1-16hab1-1abi1-2*, *coi1-16* y *hab1-1abi1-2*, en la Figura 9 A se observa que *coi1-16* presenta mayor insensibilidad al ABA que *hab1-1abi1-2* y *coi1-16hab1-1abi1-2*, ya que es capaz de germinar y establecerse a concentraciones de ABA de 0,5 μ M y 1 μ M (presenta porcentajes de establecimiento de 37,25 y 35,56 respectivamente). En presencia de JA (Figura 9 B) parece que el genotipo *hab1-1abi1-2* tiene mayor capacidad para establecerse que el genotipo *coi1-16*, pero hay que recordar que *coi1-16* tiene un problema de viabilidad de semillas. Sin embargo, *coi1-16* sí es capaz de establecerse a 30 μ M JA y 0,5 μ M ABA (porcentaje de establecimiento de 3,00), al contrario que *hab1-1abi1-2* y Col-0. Además, esta característica se observa en el mutante *coi1-16hab1-1abi1-2*, indicando que la deficiencia en la

señalización de JA puede contrarrestar la hipersensibilidad a ABA mostrada por el mutante *coi1-16hab1-1abi1-2* cuando se germinan en presencia de ABA y JA. Esto es debido a que *coi1-16* sí tiene capacidad de establecerse en presencia de ABA solo o en combinación de JA, en mayor o en menor medida, sin embargo, *hab1-1abi1-2* no tiene capacidad de establecerse en presencia de ABA. Así, *coi1-16hab1-1abi1-2* no tiene la capacidad de germinar en presencia de ABA porque la deficiencia de señalización por *coi1-16* no puede contrarrestar la nula capacidad de *hab1-1abi1-2* para establecerse en presencia de ABA, indicando que el papel del JA en germinación depende de la ruta de señalización de ABA. Por otra parte, *coi1-16hab1-1abi1-2* presenta mayor establecimiento que *coi1-16* en presencia de JA, pero también es capaz de establecerse en presencia de JA y ABA combinados (30 μ M JA y 0,5 μ M ABA; porcentaje de 2,15), lo que indica que en este caso el papel del JA no depende del ABA y ambos son importantes para que la semilla germine. Ninguno de los tres genotipos es capaz de establecerse en presencia de 30 μ M JA y 0,5 μ M ABA.

En cuanto al grupo formado por los genotipos *pyl6.1*, *pyl4pyl5* y *pyl5*, en la Figura 9 A se observa que *pyl4pyl5* es el que tiene mayor capacidad para establecerse en presencia de ABA debido a que carece de dos de los receptores de ABA de la familia PYR/PYL/RCAR. El mutante *pyl5* tiene mayor capacidad para establecerse en presencia de ABA que *pyl6.1*, el cual presenta valores similares a los de Col-0. Esto puede ser debido a que PYL5 presenta mayor afinidad por ABA y a que interacciona con HAB1 de manera constitutiva y, al no estar presente, HAB1 inhibe la activación de las SnRK2 (Cutler et al., 2010). En cuanto a la Figura 9 B, se observa que los tres genotipos presentan un porcentaje de establecimiento similar en presencia de JA. Sin embargo, en presencia de 30 μ M JA y 0,5 μ M ABA, solo *pyl5* y *pyl4pyl5* son capaces de establecerse (2,70% y 0,71% respectivamente).

En cuanto al grupo formado por los genotipos *35S::HAB1*, *snrk2.2snrk2.3* y *35S::SnRK2.3*, en la Figura 9 A se observa que el genotipo *35S::SnRK2.3* es muy sensible a ABA, mientras que *35S::HAB1* y *snrk2.2snrk2.3* son capaces de establecerse incluso en presencia de 3 μ M ABA (36,84% y 28,23% respectivamente). Al sobreexpresar un elemento de control positivo de la ruta de señalización del ABA, la planta se vuelve mucho más sensible a este. Sin

embargo, al sobreexpresar un elemento de control negativo o perder la función de un elemento de control positivo, la ruta de señalización se ve bloqueada en mayor medida, por lo que a la planta se vuelve mucho más insensible al ABA y puede germinar y establecerse a concentraciones elevadas de este que son capaces de bloquear al control Col-0.

En la Figura 9 B se observa que el genotipo 35S::*HAB1* es el más sensible al JA y, sin embargo, es el único genotipo ensayado capaz de establecerse en presencia de 30 μ M JA y 0,5 μ M ABA. Mientras que 35S::*SnRK2.3* es el más insensible al JA, pero apenas puede establecerse en presencia de 30 μ M JA y 0,5 μ M ABA. Estos datos indican que un incremento de la ruta de señalización del ABA impide una correcta señalización de la ruta del JA.

El último grupo es el formado por los genotipos *jin1-2*, *pyl5* y *pyl5jin1-2*. En la figura 9 se puede observar que el fenotipo del genotipo *pyl5jin1-2* es una suma de los fenotipos de los genotipos *pyl5* y *jin1-2*. El mutante *jin1-2* se muestra menos sensible a ABA que Col-0, esto es debido a que el factor de transcripción MYC2 es capaz de regular determinados elementos de la respuesta a ABA (Howe et al., 2018). Al eliminar MYC2, la expresión de los genes dependientes a ABA que era activada por MYC2 no se lleva a cabo, por lo que la sensibilidad de la planta a ABA se ve reducida.

7. Conclusión

Mediante cruces se han obtenido mutantes combinados de las rutas de señalización de ABA y JA que servirán para identificar posibles puntos de interacción entre las dos rutas de señalización en la respuesta de *A. thaliana* a *T. urticae* en futuras investigaciones. El análisis de la inhibición de la germinación dependiente de ABA de los mutante *pyl5jin1-2* y *coi1-16pyl4pyl5* confirma que ambas rutas interaccionan en germinación y establecimiento de plántulas y que estos mutantes se pueden utilizar para analizar la respuesta de *A. thaliana* a *T. urticae*.

La ruta de señalización de JA es esencial para la defensa de la planta frente a *T. urticae*, aunque los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman que la ruta de señalización de ABA también es muy importante. Con el presente trabajo hemos mostrado que los receptores de ABA de tipo PYL/PYR/RCAR de la subfamilia II, las fosfatasa HAB1 y ABI1 y la quinasa SnRK2.3 están implicados en la interacción *A. thaliana*-*T. urticae*. No obstante, se deberían repetir los ensayos realizados y comprobar los resultados obtenidos, ya que las plantas sufrieron un estrés desconocido durante su crecimiento. Además, nuevos mutantes, tanto simples como combinados de las rutas de señalización del JA y del ABA, deberían añadirse al estudio al y ampliar así el conocimiento de las rutas implicadas en la defensa de la planta.

La germinación y el establecimiento de plántulas no son los mejores fenotipos para estudiar la interacción entre las rutas de señalización de ABA y JA. Sin embargo, los fenotipos intermedios de los mutantes combinados de ambas rutas (*coi1-16hab1-1abi1-2* y *pyl5jin1-2*) indican que estos mutantes pueden ser usados para el estudio de la interacción *A. thaliana*-*T. urticae*.

8. Bibliografía

- Aleman, F., Yazaki, J., Lee, M., Takahashi, Y., Kim, A. Y., Li, Z., ... Schroeder, J. I. (2016). An ABA-increased interaction of the PYL6 ABA receptor with MYC2 Transcription Factor: A putative link of ABA and JA signaling. *Scientific Reports*, 6(March), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep28941>
- Barczak-Brzyżek, A., Kielkiewicz, M., Górecka, M., Kot, K., Karpińska, B., & Filipecki, M. (2017). Absciscic Acid Insensitive 4 transcription factor is an important player in the response of *Arabidopsis thaliana* to two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) feeding. *Experimental and Applied Acarology*, 73(3–4), 317–326. <https://doi.org/10.1007/s10493-017-0203-1>
- Bensoussan, N., Santamaria, M. E., Zhurov, V., Diaz, I., Grbić, M., & Grbić, V. (2016). Plant-Herbivore Interaction: Dissection of the Cellular Pattern of *Tetranychus urticae* Feeding on the Host Plant. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1105. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01105>
- Chini, A., Boter, M., & Solano, R. (2009). Plant oxylipins: COI1/JAZs/MYC2 as the core jasmonic acid-signalling module. *FEBS Journal*, 276(17), 4682–4692. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07194.x>
- Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., Finkelstein, R. R., & Abrams, S. R. (2010). *Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. Annual Review of Plant Biology* (Vol. 61). <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112122>
- González-Guzmán, M., Abia, D., Salinas, J., Serrano, R., & Rodríguez, P. L. (2004). Two New Alleles of the *abscisic aldehyde oxidase 3* Gene Reveal Its Role in Absciscic Acid Biosynthesis in Seeds. *Plant Physiology*, 135(1), 325–333. <https://doi.org/10.1104/pp.103.036590>
- Howe, G. A., Major, I. T., & Koo, A. J. (2018). Modularity in Jasmonate Signaling for Multistress Resilience.
- Lackman, P., González-Guzmán, M., Tilleman, S., Carqueijeiro, I., Pérez, A. C., Moses, T., ... Goossens, A. (2011). Jasmonate signaling involves the abscisic acid receptor PYL4 to regulate metabolic reprogramming in *Arabidopsis* and tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(14), 5891–5896. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103010108>
- Martel, C., Zhurov, V., Navarro, M., Martinez, M., Cazaux, M., Auger, P., ... Grbic, V. (2015). Tomato Whole Genome Transcriptional Response to *Tetranychus urticae* Identifies Divergence of Spider Mite-Induced Responses Between Tomato and *Arabidopsis*, 28(3), 343–361.
- Murray, M. G., & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight

- plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(19), 4321–4326. <https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>
- Pauwels, L., Ritter, A., Goossens, J., Durand, A. N., Liu, H., Gu, Y., ... Goossens, A. (2015). The RING E3 Ligase KEEP ON GOING Modulates JASMONATE ZIM-DOMAIN12 Stability. *Plant Physiology*, 169(2), 1405–1417. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00479>
- Tischer, S. V., Wunschel, C., Papacek, M., Kleigrew, K., Hofmann, T., Christmann, A., & Grill, E. (2017). Combinatorial interaction network of abscisic acid receptors and coreceptors from *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(38), 10280–10285. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706593114>
- Ton, J., Flors, V., & Mauch-Mani, B. (2009). The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends in Plant Science*, 14(6), 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.03.006>
- Van Leeuwen, T., Tirry, L., Yamamoto, A., Nauen, R., & Dermauw, W. (2015). The economic importance of acaricides in the control of phytophagous mites and an update on recent acaricide mode of action research. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.12.009>
- Ximénez-Embún, M. G., Castañera, P., & Ortego, F. (2017). Drought stress in tomato increases the performance of adapted and non-adapted strains of *Tetranychus urticae*. *Journal of Insect Physiology*, 96, 73–81. <https://doi.org/10.1016/J.JINSPHYS.2016.10.015>
- Ximénez-Embún, M. G., Ortego, F., & Castañera, P. (2016). Drought-stressed tomato plants trigger bottom-up effects on the invasive *Tetranychus evansi*. *PLoS ONE*, 11(1), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145275>
- Zhurov, V., Navarro, M., Bruinsma, K. A., Arbona, V., Santamaria, M. E., Cazaux, M., ... Grbic, V. (2014). Reciprocal Responses in the Interaction between *Arabidopsis* and the Cell-Content-Feeding Chelicerate Herbivore Spider Mite. *PLANT PHYSIOLOGY*, 164(1), 384–399. <https://doi.org/10.1104/pp.113.231555>

9. Anexo

9.1. Protocolo realización de cruces

CROSSING ARABIDOPSIS

Materials: Fine forceps (Miltex #5)
95% ethanol for sterilizing forceps
Magnifying glasses (for example "opti visors" from Donegan Optical Co. Kansas City, MO.)
"Female" plant - pistil donor, 4-6 weeks old.*
"Male" plant - pollen donor, 4-6 weeks old.*
* If the plants are transferred from high humidity growth condition to low humidity in a lab for crosses, they may wilt badly. Several hours exposure to the low humidity is usually sufficient for the plants to recover.

1. Begin with the "female" parent plant. Choose several young flower buds that are located at the top of the inflorescence on the main flowering stalk (Fig. 1). The newly emerging white petals should be barely visible in the most mature flower bud chosen (Fig. 2). Do not use any flower bud that has opened and potentially exposed its pistil to parental pollen or another pollen source. A bud at the correct stage will contain short immature stamens with anthers that are greenish-yellow in color (Fig. 3). Remove all other flower buds and flowers from the inflorescence.



Fig. 1

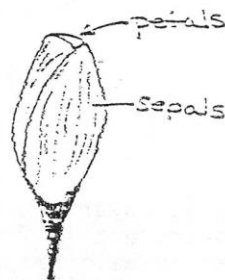


Fig. 2

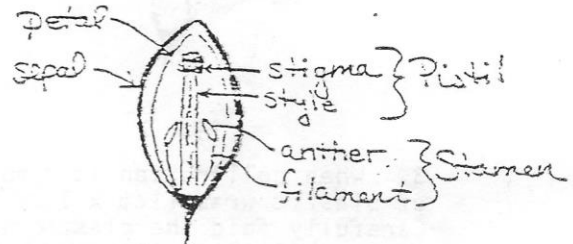


Fig. 3

Before dissecting the flower buds, sterilize the forceps and your fingers in 95% ethanol and air dry (to remove contaminating pollen). Next, remove the sepals, petals, and stamens from the flower buds. This is most easily accomplished by beginning with the tissue near the base of the flower bud. Generally, the most difficult step is the removal of the first sepal. Great care should be taken not to injure the pistil or flower stalk while dissecting the flower bud. When finished, the pistil should be free of sepals, petals, and stamens (Fig. 4).



Fig. 4

2. From the "male" parent plant choose a suitable pollen-donor flower. For example, for wild-type *Arabidopsis* choose a flower that has opened and has petals that are perpendicular to the main flower body (Fig. 5). Usually these flowers are in the process of releasing pollen. However, this is not always the case and therefore you should visually examine anthers from several flowers to identify the flowering stage associated with pollen release. Remove the flower from the flowering stalk and then remove the petals and sepals from the flower. There will be 6 stamens (2 short and 4 tall) in each flower. Remove several stamens and check their anthers for pollen. The pollen grains should be clearly visible when viewed under a dissecting microscope. The pollen releasing anthers will be grainy not smooth in appearance. When anthers brimming with pollen are identified, use them to pollinate the stigmas of the previously prepared pistils (Fig. 6). To maximize the probability of pollination, pollinate each pistil with several anthers.

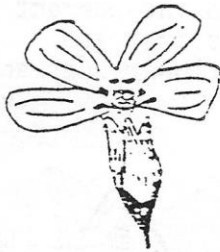


Fig. 5

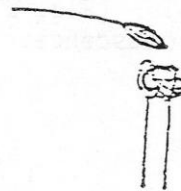


Fig. 6

3. When pollination is complete, cover the pistil with a small piece of plastic wrap (1cm x 1cm) to protect it from other pollen sources. Carefully fold the plastic wrap in half around the pistil (Fig. 7). Next, mark the pollinated pistil by applying a small piece of tape describing the cross on the corresponding flowering stalk (Fig. 7). Check the cross and remove the plastic wrap in 1 to 2 days. Following a successful pollination, the pistil will elongate as the seeds develop. When the silique is fully elongated and has dried to a golden-brown color, remove it from the plant. Take care not to shatter the silique and loose the seeds. Allow the seeds to dry for at least one week before planting. The seeds can also be chilled at 4° C. for several days following imbibition to increase the frequency of germination.

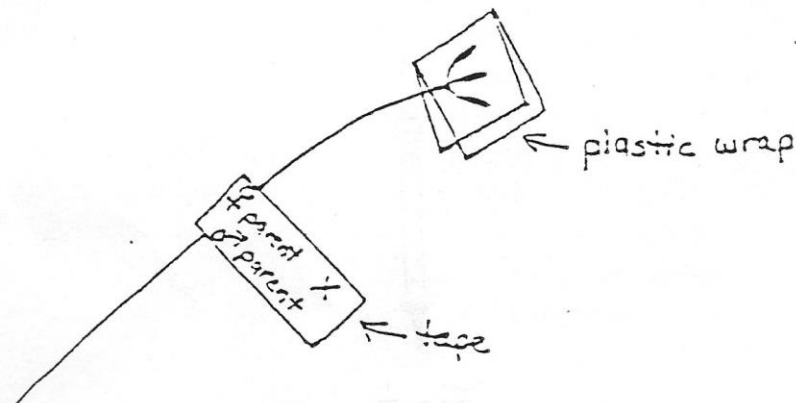


Fig. 7

9.2. Protocolo de extracción de DNA

Guardar material (2-3 hojas) en eppendorf y congelar inmediatamente en N₂ líquido. Podemos almacenar el material a -80 °C.

Pesar el eppendorf, tendremos aproximadamente 0.15 g de tejido. Moler con el *micropestel* (preenfriado en N₂ líquido) y al sacarlo ayudarse con un palillo para no perder material. Añadir 0,3 mL de tampón de extracción precalentado a 65 °C (2% CTAB, 100mM Tris, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl pH8), agitar 2 veces e incubar 10 min a 65 °C.

Añadir 0,2 mL de cloroformo/isoamílico (24:1) (en campana), agitar y centrifugar 10 min a 14000 rpm. Tomar la fase acuosa (aprox. 200 µL) y añadir 20 µL de 10% CTAB (es muy viscoso, para pipetear correctamente se debe precalentar a 65 °C). Calentar 2 min a 65 °C.

Para inducir la precipitación del complejo CTAB/DNA-RNA se añaden 440 µL de agua MiliQ fría y se remueve. Dejar los tubos en hielo 15 min y recoger el precipitado mediante centrifugación (10 min a 14000 rpm).

Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 0.4 mL de 1 M NaCl. Agitar y precipitar de nuevo con 0.8 mL de etanol 100%. Recoger el precipitado en minifuga y lavarlo con etanol 70 % (0.5 mL).

Tendremos alrededor de 2 µg DNA. Resuspender en agua.

10. Autoevaluación

Mi estancia en el grupo de Ecofisiología y Biotecnología del Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural de la Universitat Jaume I (UJI) ha sido muy buena. Me ha permitido aprender sobre el mundo de la investigación y las directrices a seguir para desarrollar un buen proyecto.

Al principio estuve un poco más perdida, ya que mis conocimientos sobre el tema eran limitados, pero después de leer mucha bibliografía y de que me explicaran aquello que más me costaba entender puedo decir que realmente he aprendido sobre las rutas de señalización del ácido jasmónico y del ácido abscísico, sobre diferentes mutantes de *A. thaliana* y, en general, sobre lo que es trabajar en un laboratorio.

Al final, me siento orgullosa de poder compartir el trabajo realizado.