



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

**Estudios sobre los mecanismos de señalización del
ABA en el control de la apertura estomática en
*Arabidopsis thaliana***

Trabajo de tesis para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el área de Biología

Autor: Lic. Gustavo E. Gudesblat
Director de tesis: Dr. Norberto D. Iusem

Lugar de trabajo
Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular
IFIByNE – CONICET
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, Noviembre 2005

Jurado

Estudios sobre los mecanismos de señalización del ABA en el control de la apertura estomática en *Arabidopsis thaliana*

Resumen

Los estomas son pequeños poros localizados en la superficie de los órganos aéreos de las plantas que permiten el intercambio de gases con la atmósfera. Su grado de apertura varía en respuesta a diversos estímulos ambientales e internos. En esta tesis se realizaron estudios sobre el mecanismo del control de los movimientos estomáticos en *Arabidopsis thaliana*.

En la primera parte de la tesis estudiamos el rol de la MAP kinasa AtMPK3 de *A. thaliana* en la señalización de los movimientos estomáticos a través de la inhibición de la expresión de su gen codificante mediante la expresión de un ARNm antisentido exclusivamente en células de la guarda. Las plantas con la expresión del gen *AtMPK3* silenciada presentan una insensibilidad parcial al ABA en la inhibición de la apertura estomática, aunque responden normalmente a la hormona en la promoción del cierre. Sin embargo, cuando se inhibe la alcalinización del citoplasma inducida por el ABA mediante el agregado de butirato de sodio, las plantas silenciadas en *AtMPK3* muestran una sensibilidad disminuida al ABA en la promoción del cierre inducida por ABA con respecto a los controles. Dado que el ABA induce la síntesis de H₂O₂, se estudió la respuesta estomática de las plantas silenciadas en *AtMPK3* a este compuesto agregado de forma exógena. Dichas plantas presentan una sensibilidad reducida al H₂O₂, tanto en la promoción del cierre como en la inhibición de la apertura estomática, lo cual indica que AtMPK3 es necesaria para la señalización de este compuesto. Estas plantas también son menos sensibles que las *wt* en el cierre estomático inducido por la oscuridad, un proceso en el cual también interviene el H₂O₂. Estos resultados presentan una clara evidencia de que AtMPK3 cumple un rol en la señalización del ABA, el H₂O₂ y la oscuridad.

En la segunda parte de la tesis se estudió el posible rol del etileno en la modulación de la sensibilidad estomática al ABA en *A. thaliana*. La aplicación exógena de su precursor biosintético ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) a una concentración de 1 μM produjo la reducción de la sensibilidad estomática al ABA, tanto en la promoción del cierre como en la inhibición de la apertura. El efecto del ACC no tiene lugar en presencia del antagonista de la percepción del etileno tiosulfato de plata ni en las mutantes insensibles al etileno *ein2*. Por otra parte las mutantes *eto1*, que sobreproducen cantidades moderadas de etileno, muestran una sensibilidad reducida al ABA en la inhibición de la apertura estomática. Estos resultados muestran evidencia de que el etileno, a bajas concentraciones, es capaz de reducir la sensibilidad estomática al ABA.

Palabras clave: estoma, ABA, etileno, H₂O₂, ACC, MAP kinasa, AtMPK3, oscuridad, *Arabidopsis thaliana*

Studies on the mechanisms of ABA signalling in the control of stomatal aperture in *Arabidopsis thaliana*

Abstract

Stomata are tiny pores located on the surface of aerial organs of plants which allow gas exchange with the atmosphere. Its aperture varies in response to diverse internal and external stimuli. In this thesis were studied the mechanisms of control of stomatal movements in *Arabidopsis thaliana*.

In the first part of this thesis we studied the role of MAP kinase AtMPK3 of *A. thaliana* in stomatal signalling by means of inhibiting the expression of its coding gene through the expression of an antisense mRNA exclusively in guard cells. Plants silenced in *AtMPK3* show a partial reduction in stomatal sensitivity in abscisic acid (ABA)-induced inhibition of stomatal opening, but respond normally to this hormone in promotion of stomatal closure. However, when ABA-induced cytoplasmic alkalinization is prevented using sodium butyrate, antisense *AtMPK3* plants display reduced sensitivity to ABA relative to wt plants. Since ABA induces H₂O₂ synthesis, the stomatal response of *AtMPK3* silenced plants to this compound was studied. These plants are less sensitive than wt both in H₂O₂-induced promotion of stomatal closure and in inhibition of opening, which indicates that *AtMPK3* is involved in the signalling of this compound. These plants are also less sensitive than wt to darkness-induced stomatal closure, a process in which H₂O₂ is also involved. These results show clear evidence that *AtMPK3* plays an important role in ABA, H₂O₂ and darkness signalling in guard cells.

In the second part of this thesis was studied the possible role of ethylene in modulation of stomatal sensitivity to ABA in *A. thaliana*. Exogenous application of ethylene biosynthetic precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) at a 1 µM concentration brought about a reduction in stomatal sensitivity to ABA, both in promotion of stomatal closure and in inhibition of opening. ACC had no effect in the presence of ethylene antagonist silver thiosulphate, neither in ethylene-insensitive mutants *ein2*. Also, *eto1* mutants, which overproduce small amounts of ethylene, display reduced sensitivity to ABA in inhibition of stomatal opening. These results provide evidence that ethylene, at low concentrations, is able to reduce stomatal sensitivity to ABA.

Keywords: stomata, ABA, ethylene, H₂O₂, ACC, MAP kinase, *AtMPK3*, darkness, *Arabidopsis thaliana*

Agradecimientos

A mis padres por el gran apoyo recibido para la realización de esta tesis.

A mi querida esposa Itatí.

Al Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

A mi director de tesis, Norberto Iusem y a mis compañeros de grupo Fernando Carrari, Laura Maskin, Javier Moreno, Nicolás Frankel, Mariano Giombini, Reyna Osuna Fernández y Verónica Rodríguez.

A la colaboración del resto de los grupos de investigación del Laboratorio, y especialmente la actitud siempre generosa de Alberto Kornblihtt y su grupo.

A la Fundación Antorchas y al British Council por las becas otorgadas.

Al Instituto de Ciencias Ambientales y Naturales de la Universidad de Lancaster, Gran Bretaña. A Alistair Hetherington, Alex Webb, Carl Ng, Paul Sunderland, Geoff Holroyd, Juverlande Lugli y Alan Palmer.

A Peter Morris, de la Universidad de Heriot-Watt, Gran Bretaña, por su inestimable colaboración para realizar este trabajo.

A Julie Gray y Ahmad Bahrami de la Universidad de Sheffield, Gran Bretaña.

Al Instituto Leloir por permitirme trabajar en sus dependencias con total libertad. Especialmente a Roberto Staneloni y a mis compañeros Fabiana Stolowicz, María José Rodríguez Batiller, Verónica Arana, Hernán Boccalandro, Alejandra Huber y Edith Trejo.

A mis amigos y a Daniela por el apoyo recibido.

Indice

1. INTRODUCCION	1
1.a) Percepción y transducción de señales en las plantas	1
1.a.1) Las plantas frente al medio ambiente	1
1.a.2) Señales externas e internas	2
1.a.3) Respuesta de las plantas frente al estrés ambiental	3
1.a.4) Percepción y transducción de las señales a nivel molecular	4
1.a.5) Tres problemas interesantes en el estudio de vías de señalización: especificidad, interacción y memoria	5
1.b) Células de la guarda	7
1.b.1) Evolución y rol de los estomas	7
1.b.2) El control del movimiento de los estomas como modelo de estudio de transducción de señales	10
1.b.3) Mecanismo y control de los movimientos estomáticos	11
1.b.3.i) Apertura estomática	11
1.b.3.ii) Cierre estomático	12
1.b.4) Rol del estado redox de las células de la guarda en la transducción de señales	15
1.b.5) Modulación de la sensibilidad estomática al ABA	17
1.b.6) Rol del etileno en el control de los movimientos estomáticos e interacción con la señalización del ABA	18
1.c) Transducción de señales a través de cascadas de MAP kinasas	19
1.c.1) MAP kinasas en plantas	22
1.d) Trabajo previo a la realización de la tesis	24
2. MATERIALES Y METODOS	30
2.a) Material vegetal y condiciones de crecimiento	30
2.b) Construcción antisentido para <i>AtMPK3</i>	31
2.c) Transformación de <i>A. thaliana</i> y análisis de segregación de la resistencia a kanamicina .	32
2.d) Detección por PCR de la construcción antisentido para <i>AtMPK3</i> en el genoma de <i>A. thaliana</i>	34
2.e) Medición de la expresión de <i>AtMPK3</i> en las plantas transgénicas	35

2.e.1) Aislamiento de epidermis enriquecidas en células de la guarda	35
2.e.2) Extracción de ARN de epidermis	36
2.e.3) Análisis de la expresión de <i>AtMPK3</i>	37
2.f) Medición de aperturas estomáticas	38
3. RESULTADOS	42
3.a) Generación y análisis de plantas antisentido para <i>AtMPK3</i>	42
3.a.1) Preparación de la construcción antisentido para <i>AtMPK3</i> y transformación de <i>A. thaliana</i>	42
3.a.2) Métodos de medición de la apertura estomática	45
3.a.3) Análisis preliminar del comportamiento estomático de las plantas transformadas	47
3.a.4) Análisis de la presencia del transgén en el genoma de las líneas transformadas con la construcción antisentido para <i>AtMPK3</i>	47
3.a.5) Análisis de la expresión de <i>AtMPK3</i> en las plantas transformadas	48
3.b) Análisis de la respuesta estomática de las plantas antisentido para <i>AtMPK3</i>	55
3.b.1) Efecto del ABA	55
3.b.2) Efecto del H ₂ O ₂	59
3.b.3) Efecto de la oscuridad	60
3.c) Efecto del etileno sobre la sensibilidad estomática al ABA en <i>A. thaliana</i>	62
3.c.1) Efecto del precursor del etileno ACC sobre la sensibilidad al ABA	63
3.c.2) El ACC no modifica sensibilidad estomática al ABA en las mutantes <i>ein2</i> insensibles al etileno	66
3.c.3) Las mutantes sobreproductoras de etileno <i>eto1</i> presentan sensibilidad al ABA en la inhibición de la apertura estomática	67
4. DISCUSION Y CONCLUSIONES	70
4.a) Fenotipo de las plantas antisentido para <i>AtMPK3</i>	70
4.b) Efecto del etileno sobre la sensibilidad estomática al ABA en <i>A. thaliana</i>	80
5. BIBLIOGRAFIA	85

1.Introducción

1.a) Percepción y transducción de señales en las plantas

1.a.1) Las plantas frente al medio ambiente

Las plantas, al igual que todos los seres vivos, dependen de la percepción adecuada de la información proveniente del medio ambiente para su supervivencia. A diferencia de muchos otros seres vivos (incluyendo la mayoría de los animales), las plantas presentan ciertas características, tales como el crecimiento fotoautotrófico, la naturaleza sésil y la presencia de una pared semirígida que en conjunto contribuyeron a lo largo del proceso evolutivo a un moldeado particular de la manera en que perciben e integran las señales provenientes del medio que las rodea.

Debido a su naturaleza sésil, las plantas no pueden escapar de los predadores ni de las condiciones ambientales adversas como los animales, sino que deben prosperar en el lugar donde germinaron. A menudo las plantas terrestres deben hacer frente a una distribución irregular de recursos tales como agua, luz y minerales. Se cree que en parte por este motivo evolucionaron hacia una estructura modular diferenciada, con ramificación de los ápices de crecimiento (meristemas). Los elementos de los módulos (raíces, hojas, yemas, flores, etc.) por lo general se reiteran muchas veces durante el desarrollo. La estructura modular confiere a la planta una mayor chance de supervivencia ante los daños causados por predadores, o por condiciones ambientales adversas, ya que los módulos son relativamente independientes unos de otros. Además, este tipo de estructura posibilita regular su crecimiento de forma de optimizar el aprovechamiento de los recursos (Gilroy & Trewavas, 2001). Es bien sabido que las plantas pueden percibir gradientes de luz y regular su crecimiento en consecuencia, en tanto que la detección de la calidad espectral de la luz les permite registrar la posición de plantas vecinas, potenciales competidoras. Las raíces, por su parte, pueden detectar gradientes de minerales distribuidos de manera no uniforme en el suelo y adaptar su desarrollo de manera de optimizar su aprovechamiento. En síntesis, la organización en módulos confiere a las plantas tolerancia ante distintos

tipos de daños y alta flexibilidad para orientar el crecimiento hacia regiones que permitan un mejor aprovechamiento de los recursos disponibles.

1.a.2) Señales externas e internas

Las plantas son capaces de recibir información proveniente de un gran número de estímulos y condiciones ambientales: luz, daño mecánico, calidad del suelo, patógenos, viento, nutrientes minerales, disponibilidad de agua, gravedad, concentración de gases (CO₂, O₂, etc.), calor, frío, congelamiento, turgencia, tensiones mecánicas, etc. (Jones & Buchanan, 2000; Mc Carty & Chory, 2000).

Las distintas partes de una misma planta son a menudo notablemente independientes entre sí, tanto en el crecimiento como en la respuesta a los estímulos ambientales (Gilroy & Trewavas, 2001). La percepción de los estímulos se produce por lo general en toda la planta. A diferencia de los animales, no se conocen tejidos u órganos especializados en la percepción, así como tampoco que coordinen el crecimiento y desarrollo.

A pesar de la considerable independencia entre los distintos meristemas, la planta no tiene un crecimiento caótico. Por el contrario, la arquitectura del conjunto de la planta es altamente funcional. Esto indica la presencia de numerosas señales internas que coordinan el crecimiento de la planta. Estas señales internas pueden ser moléculas reguladoras del crecimiento (hormonas), capaces de viajar entre distintas partes de la planta. Dado que la presión de turgencia mantiene la rigidez del cuerpo de la planta y es la fuerza motora del crecimiento celular, la percepción de las señales mecánicas y la consecuente adaptación de su crecimiento juegan un rol muy importante en la planta. Los factores que afectan el control de la turgencia (por ejemplo la actividad de los canales iónicos de membrana y la extensibilidad de la pared celular) son blancos claves de las vías de transducción de señales que regulan el crecimiento de los vegetales.

1.a.3) Respuesta de las plantas frente al estrés ambiental

Es conveniente introducir en este momento el concepto de *estrés*. Usualmente se lo define como un factor externo que ejerce una influencia desventajosa sobre la planta, de forma que le impide alcanzar el rendimiento máximo posible para su genotipo (Taiz & Zeiger, 1998). Se suele cuantificar el estrés a través de parámetros tales como la supervivencia, el rendimiento agronómico, la acumulación de biomasa, o la asimilación de carbono o minerales. Aunque el concepto de estrés es de origen agronómico, y por lo tanto su relevancia fisiológica suele ser objeto de discusión en ciertos casos, es útil para comprender cómo responden las plantas frente a condiciones ambientales adversas. Los factores de estrés pueden ser de origen abiótico (insuficiencia de agua, presencia de cloruro de sodio o metales en el suelo, alta o baja temperatura, luz ultravioleta, carencia o exceso de luz o de nutrientes, etc.) o biótico (ataque por bacterias, hongos, virus o animales herbívoros). Algunas plantas adaptadas a sobrevivir en ambientes extremos (extremófilas) presentan adaptaciones constitutivas ante ciertos tipos de estrés. Por ejemplo, algunas plantas halófitas (adaptadas a ambientes salinos) pueden acumular grandes cantidades de cloruro de sodio en las vacuolas. Sin embargo, en las plantas no extremófilas las reacciones de defensa y protección ante situaciones de estrés normalmente se activan sólo luego de haber sometido a la planta a un cierto grado de estrés. Ello se debe a que las respuestas al estrés en general limitan el potencial de crecimiento de la planta.

Existen respuestas bien caracterizadas ante distintas situaciones de estrés (Taiz & Zeiger, 1998). Para citar algunos ejemplos, la luz ultravioleta induce la síntesis de pigmentos protectores y la alta temperatura la producción de proteínas de respuesta a calor (*heat shock proteins*). Los estreses abióticos en general producen estrés oxidativo, el cual induce la síntesis de enzimas y compuestos antioxidantes. El ataque por fitopatógenos induce la síntesis de moléculas de defensa, el reforzamiento de la pared celular y la muerte celular programada como forma de limitar la propagación de la infección.

En el caso particular del estrés hídrico, existen adaptaciones rápidas y otras a

largo plazo. Entre las primeras se encuentran un rápido cierre de los estomas, pequeños poros presentes en la superficie de la parte aérea de las plantas. Este fenómeno limita la transpiración, lo cual retarda la pérdida de agua. Otras respuestas relativamente rápidas frente al estrés hídrico son la producción de osmolitos, que contribuyen a disminuir el potencial agua de la célula y así aumentar la captación de agua, y la síntesis de compuestos antioxidantes. Ejemplos adaptaciones a largo plazo al estrés hídrico son la reducción en el tamaño de la hoja y el aumento en desarrollo radicular. La reducción en el área foliar (y también la abscisión de las hojas más viejas), si bien limita la capacidad fotosintética de la planta, también reduce el consumo de agua. El mayor crecimiento de la raíz permite a la planta disponer de agua que se encuentra ubicada a mayor profundidad en el suelo, a cambio de un costo energético.

1.a.4) Percepción y transducción de las señales a nivel molecular

Como se describió anteriormente, la planta es capaz de percibir un gran número de señales del medio ambiente e internas, e integrarlas de manera de responder ante situaciones ambientales cambiantes. Ahora bien, ¿cómo se produce la percepción y transducción de dichas señales a nivel molecular?

El primer modelo conceptual de transducción de señales en seres vivos fue propuesto por Martin Rodbell y colaboradores en la década de 1970 a partir de sus estudios sobre la proteína G (Rodbell, 1980). En este modelo proponían que la percepción de una señal hormonal involucraba tres etapas: a) Reconocimiento de la señal por un “discriminador” (receptor hormonal) b) Transducción de la señal, en este caso a través de la proteína G, activada por GTP, un compuesto de alto contenido energético c) Amplificación de la señal. Este modelo resultó ser válido para numerosos ejemplos de percepción de señales en toda clase de seres vivos. Sin embargo, los numerosos trabajos realizados desde ese entonces nos permiten darnos cuentas hoy de que estas vías lineales generalmente forman parte de redes de señales complejas,

altamente coordinadas y sincronizadas, en las cuales hay un alto grado de interacción y solapamiento entre los componentes de las distintas redes que conforman el circuito (Rodbell, 1995; Knight & Knight, 2001; Hetherington & Woodward, 2003).

Es interesante notar que mientras que los bloques funcionales que componen las vías de transducción de señales de estímulos extracelulares suelen estar conservados entre las plantas y los animales, la manera en que interactúan entre sí usualmente no lo está (Mc Carty & Chory, 2000). Según estos autores, ello se debería al menos en parte al hecho de que el ancestro común a plantas y animales era unicelular, por lo que la multicelularidad –y por consiguiente los mecanismos de comunicación intercelular- se habría originado de manera independiente en ambos grupos taxonómicos.

1.a.5) Tres problemas interesantes en el estudio de vías de señalización: especificidad , interacción y memoria.

Existen respuestas específicas frente a ciertos tipos de estrés pero también respuestas comunes a varios de ellos. Por ejemplo, en plantas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a frío se inducen varios genes que también se activan ante un tratamiento por estrés hídrico. Muchos otros genes, en cambio, se inducen sólo en respuesta a uno de los tratamientos y no al otro (Seki *et al.*, 2001). Este tipo de observaciones conduce a una de las preguntas más interesantes en el estudio de la transducción de señales: cómo, ante la percepción de un estímulo dado, se generan al mismo tiempo respuestas específicas e interacción o *cross talk* con las vías de transducción de otros estímulos. El *cross talk* se refiere a la interacción entre dos o más vías de señalización que convergen en una respuesta (Knight & Knight, 2001). La interacción puede ser negativa o positiva, o bien puede existir una competencia por un blanco. Si bien en un principio se tendía a estudiar las vías de señalización de manera aislada, cada vez resulta más evidente que las vías estudiadas son parte de redes complejas, y que hay mucha superposición entre las ramas de las vías.

Un clásico ejemplo de interacción entre vías de señalización en plantas es la liberación del segundo mensajero calcio (Ca^{++}), la cual ocurre en respuesta a la mayoría de los estreses bióticos y abióticos. Distintos tipos de estrés producen elevaciones de calcio en el citoplasma, adonde llega por medio de canales a partir de reservorios intracelulares (vacuola, retículo endoplasmático) o del medio externo. El Ca^{++} citosólico es rápidamente reabsorbido, de forma que a menudo se observan oscilaciones de calcio (*calcium waves*), cuya frecuencia y amplitud suele estar correlacionada con el tipo e intensidad del estímulo. Se postuló en consecuencia que distintos estímulos producen una “huella digital” de calcio (*calcium signature*) que puede ser leída a través de mecanismos desconocidos (Hetherington & Brownlee, 1998). Este modelo permitiría explicar cómo se podrían producir respuestas específicas para una vía y simultáneamente interacciones entre diversas vías.

La fosforilación de proteínas también ofrece la posibilidad de interacción entre vías de señalización. Distintos estímulos hormonales y ambientales producen también la activación de diversas proteínas kinasas y fosfatasas, las cuales tienen la capacidad de modificar la actividad de otras proteínas por el agregado o remoción de grupos fosfato. Estos grupos producen cambios en la conformación de la proteína debido a su carga eléctrica. En *A. thaliana* hay al menos unos 800 genes que potencialmente codifican proteínas kinasas, más del 3 % del total de genes de la planta (Gilroy & Trewavas, 2001). A menudo la interacción de un estímulo con un receptor desencadena una cascada fosforilación, es decir la activación secuencial de kinasas por otras kinasas. La existencia de estas cascadas permite la amplificación de la señal, y ofrece diversas instancias de control. Además, las cascadas ofrecen muchos puntos potenciales de interacción entre distintas vías de transducción. Las fosfatasas tienen un rol importante al “apagar” la señal “encendida” por la kinasa.

Las plantas presentan una marcada plasticidad fenotípica por comparación con otros organismos multicelulares. Tejidos o células en apariencia muy similares pueden responder de manera diferente ante un mismo estímulo. Parte de estas variaciones suelen atribuirse a fenómenos estocásticos a nivel molecular ocurridos durante la vida

de la célula, tejido o planta. Por ejemplo, distintas células de aleurona de cebada difieren en su sensibilidad a las giberelinas cuando se mide la inducción de la secreción de la enzima α -amilasa inducida por dicha hormona (Ritchie *et al.*, 1999). En otros casos, el grado de sensibilidad a una hormona o a otro estímulo puede estar determinado por la historia previa de la planta. Por ejemplo, la respuesta estomática de *A. thaliana* y su regulación génica sufre modificaciones cuando las plantas fueron sometidas previamente a breves tratamientos con ABA (Goh *et al.*, 2003). Knight *et al.* (1998) observaron que la señalización por calcio inducido por estrés hídrico en *A. thaliana* varía según la historia previa de estrés de la planta.

Waddington (1957) postuló un modelo topológico para conceptualizar estos fenómenos complejos. La red de transducción de señales podría pensarse como una superficie compuesta de picos y valles. Los picos y valles están sujetos a cambios continuos en posición, tamaño y altura dependiendo de las señales internas y externas que le llegan a la célula. La vía de transducción de señales en este modelo correspondería a una pelota deslizándose a través de esta superficie impulsada por la fuerza de gravedad. Así, la pelota avanzaría hacia la meta –la respuesta- a través de un camino distinto en cada ocasión, al modificarse continuamente la geografía que debe recorrer. No sólo el camino recorrido puede variar, sino que también la meta puede diferir según las condiciones del medio y la historia previa de la célula. De esta manera la planta podría conservar una “memoria” de las experiencias vividas.

1.b) Células de la guarda

1.b.1) Evolución y rol de los estomas

El estudio de fósiles vegetales revela que las hojas de las primitivas plantas terrestres presentaban una superficie uniforme, cubierta por una cutícula. Sin embargo, la superficie de las hojas de las plantas actuales está interrumpida por un gran número de poros epidérmicos microscópicos denominados estomas. Estos poros (figura 1) tienen el aspecto de una boca (de allí su nombre, ya que *stoma* significa boca

en griego) y permiten la regulación activa (a través de su apertura y cierre) del flujo de gases entre el interior y el exterior de las plantas. Los estomas más antiguos detectados en plantas fósiles datan de hace 410 millones de años (Edwards *et al.*, 1998), en el período silúrico superior. Si bien la presión de selección que habría provocado la selección de los estomas sería la optimización del intercambio de CO₂ y vapor de agua (Raven, 2002), la posibilidad que ofrecen dichos poros de controlar activamente el intercambio de gases permitió la posterior diversificación evolutiva de los vegetales. Así, el control de la evaporación a través de los estomas (junto con la evolución de una cutícula menos permeable a los gases que la primitiva) permitió una gran mejora en la eficiencia del uso de agua y por lo tanto la colonización de ambientes con menor disponibilidad de agua, o con disponibilidad variable a lo largo del tiempo. Por otro lado, sin un control activo del flujo de gases tampoco podrían existir plantas que se eleven a considerable altura del suelo como los árboles. El control del cierre estomático permite a estos organismos disolver las frecuentes embolias que se generan en los tubos del xilema producto de la tensión negativa que sufren las altas columnas de agua presentes en su interior.

El control activo de la apertura estomática es por lo tanto de suma importancia para la adaptación de las plantas actuales a las condiciones ambientales cambiantes (Hetherington & Woodward, 2003). El gradiente de CO₂ entre el medio ambiente y el interior del estroma de los cloroplastos (donde es fijado en las plantas C3) es relativamente débil, ya que la concentración atmosférica de este gas es baja (350 partes por millón), y debe atravesar las membranas plasmática y de los cloroplastos. Por comparación, el agua tiene una alta tendencia a salir de la planta, aún bajo condiciones de elevada humedad ambiente, ya que es una molécula más pequeña que el CO₂ y se evapora directamente desde el apoplasto. Estos datos enfatizan la importancia del control de la pérdida de agua a través de los estomas. Además de la apertura de los estomas, otros factores como la presencia de pelos epidérmicos (tricomias), la composición de la cutícula y la densidad estomática –la cual está bajo el control de factores ambientales y genéticos- también contribuyen a la regulación del

intercambio entre la planta y el medio ambiente. La densidad de estomas varía entre 5 y 1000 por mm² y su tamaño entre 10 y 80 μM, según la especie y condiciones ambientales (Willmer & Frickers, 1995).

Los poros estomáticos se encuentran determinados por un par de células denominadas de la guarda o guardianas (figura 1). En muchas especies estas células están flanqueadas por un par de células diferenciadas llamadas células subsidiarias, que ayudan a las células guardianas en el control de la apertura del poro. Al conjunto de células guardianas y subsidiarias se lo llama complejo estomático (Taiz & Zeiger, 1998). Las células de la guarda tienen engrosamientos radiales en su pared celular, de manera tal que cuando se produce la entrada de agua como consecuencia del aumento en la concentración intracelular de solutos, (principalmente K⁺, Cl⁻, malato y sacarosa) éstas células se “arquean” en vez de expandirse isodiamétricamente.

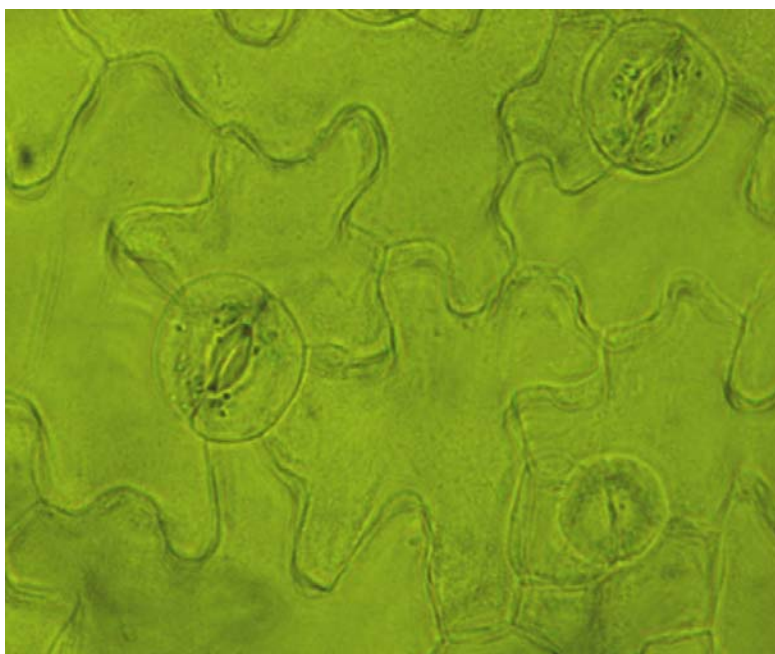


Figura 1. Poros estomáticos en epidermis de *Arabidopsis thaliana*. Cada poro está formado por dos células de la guarda. En el interior de las células se observan los cloroplastos. En la parte inferior derecha se observa un estoma inmaduro, el cual las células de la guarda todavía no determinan un poro. El resto de las células pertenece a la epidermis; *A. thaliana* no posee células acompañantes. Foto tomada a 1000 aumentos.

El consiguiente cambio en la morfología de las células guardianas resulta en la apertura del poro estomático. El fenómeno opuesto, es decir la salida de solutos y consiguiente pérdida de turgencia, causa el cierre estomático.

1.b.2) El control del movimiento de los estomas como modelo de estudio de transducción de señales

El control del movimiento de los estomas constituye un buen modelo de estudio del funcionamiento de las vías de señalización en las plantas. La regulación de estos poros tiene un rol muy importante en la adaptación de las plantas a las condiciones ambientales cambiantes. Es por este motivo que el grado de apertura de los estomas varía en respuesta a un gran número de estímulos ambientales, entre ellos la intensidad de luz, la concentración de CO₂, estímulos hormonales tales como el ácido abscísico, auxinas, citoquininas y ácido salicílico, *elicitors* (moléculas derivadas de patógenos capaces de provocar una respuesta inmune), variaciones en la humedad ambiente, moléculas que generan daño oxidativo como el ozono y el H₂O₂, etc. (Schroeder *et al.*, 2001). Además la apertura de los estomas está controlada por el reloj biológico, de forma que durante el período nocturno se produce su cierre aún en presencia de luz. Distintos estímulos actúan simultáneamente para converger en una misma respuesta final, la variación en el grado de apertura estomática, la cual es fácilmente medible al microscopio. De esta manera los estomas constituyen un sistema conveniente para el estudio de las vías de señalización de los diversos factores que controlan sus movimientos. Por otra parte, dado que todos los estímulos convergen en una misma respuesta biológica, este sistema resulta adecuado para comprender cómo se producen las interacciones entre las vías de señalización de los distintos estímulos.

Además de integrar la respuesta a un gran número de estímulos, existen otras razones por las cuales los estomas presentan ventajas para el estudio de la transducción de señales. A diferencia de la mayoría de las células vegetales, las células de la guarda se encuentran mecánicamente aisladas de las células adyacentes

(carecen de plasmodesmos). Por otra parte, son capaces de responder de manera autónoma a las señales fisiológicas (es posible estudiar su respuesta en epidermis aisladas del resto de la hoja, o en protoplastos). Y por último, existe una importante bibliografía sobre este sistema, por ejemplo sobre la regulación de los canales iónicos responsables de la entrada y salida de solutos en las células de la guarda y sobre mutantes en la respuesta estomática (Schroeder *et al.*, 2001; Fan *et al.* 2004).

1.b.3) Mecanismo y control de los movimientos estomáticos

Existe considerable información sobre los mecanismos responsables de los cambios osmóticos dentro de las células de la guarda que causan las variaciones en la apertura estomática (Hetherington, 2001; Schroeder *et al.*, 2001; Fan *et al.* 2004). En líneas generales puede afirmarse que los estomas aumentan su apertura bajo condiciones favorables para la fotosíntesis (disponibilidad adecuada de luz y agua y baja concentración de CO₂ intracelular, causada por su consumo en la fotosíntesis) mientras que la disminuyen en ausencia de luz, durante el período nocturno, o ante diversas condiciones de estrés (falta de agua, presencia de patógenos o de compuestos oxidantes, baja humedad ambiente, etc.).

1.b.3.i) Apertura estomática

Los factores más estudiados que causan apertura estomática son las auxinas (Lohse & Hedrich, 1992) y la luz azul (Assmann *et al.*, 1985) y roja (Serrano, 1998). Estos estímulos activan H⁺-ATPasas de la membrana plasmática, las cuales producen el bombeo de protones hacia el periplasma. Este fenómeno provoca la hiperpolarización de la membrana plasmática, lo cual promueve la entrada del ion potasio (K⁺) a las células por medio de canales de potasio de corriente rectificante interna (K⁺_{in}), activables por la acidificación del apoplasto en ciertas especies (Fan *et al.*, 2004; Schroeder *et al.*, 2001). De manera concomitante se produce la entrada de aniones Cl⁻ y NO₃⁻ (Guo *et al.*, 2003), probablemente a través de *symporters* de

H⁺/aniones o *antiporters* de OH⁻/aniones. La luz también promueve la síntesis de malato y sacarosa a través del metabolismo del almidón (Talbot & Zeiger, 1998). Muchos de estos iones se almacenan en la vacuola, de manera de no afectar la concentración iónica en el citoplasma. Por lo tanto la vacuola presenta transportadores iónicos en su membrana.

La percepción de la luz azul en las células de la guarda ocurre a través de las fototropinas PHOT1 y PHOT2 (Kinoshita *et al.*, 2001). Estos receptores son proteínas quinasas de serina y treonina que sufren autofosforilación en presencia de luz azul. La luz de este color causa la activación de las H⁺-ATPasas de membrana a través de su fosforilación y pegado de proteínas 14-3-3 (Kinoshita & Shimazaki, 1999). Los canales K⁺ se activan por la acidificación del medio extracelular (Blatt, 1992) y se inhiben por aumentos en la concentración intracelular de Ca⁺⁺ (Schroeder & Hagiwara, 1989). Distintos trabajos con inhibidores de proteínas quinasas y fosfatasas muestran que la actividad de los canales K⁺ se encuentra regulada por fosforilación (Luan *et al.*, 1993). Las corrientes de entrada de K⁺ son activadas también por los ácidos grasos linolénico y araquidónico (Lee *et al.*, 1994).

Se clonó por complementación de una mutante de levaduras defectiva en el transporte de K⁺ un canal de *A. thaliana* K⁺ denominado KAT1 (Anderson *et al.*, 1992). Este canal, al igual que su ortólogo de papa, KST1 se expresa predominantemente en células de la guarda (Muller-Rober *et al.*, 1995; Nakamura *et al.*, 1995). La mutación del gen KAT1 en *A. thaliana* no altera la respuesta estomática (Szyroki *et al.*, 2001), de manera que se presume que existen otros canales también capaces de mediar la entrada de K⁺ en las células de la guarda.

1.b.3.ii) Cierre estomático

Ante condiciones de ausencia de luz, altas concentraciones de CO₂ o diversos factores de estrés, ocurre una disminución de la concentración de solutos en las células de la guarda, con el consiguiente cierre estomático. Diversos factores de estrés, tales como la sequía, la desecación y la alta salinidad provocan la síntesis de la

hormona ácido abscísico (ABA). Uno de los efectos más característicos de esta hormona es el de promover un rápido cierre estomático, aún a concentraciones muy bajas (nanomolares en ciertas especies). Ante la disminución del contenido de agua del suelo, el ABA es capaz de transmitir la señal de falta de agua de la raíz a la parte aérea de la planta, provocando la reducción de la apertura estomática y la consiguiente limitación de la transpiración.

Un modelo simplificado de la acción del ABA en la promoción del cierre estomático (Schroeder *et al.*, 2001) postula que esta hormona induce aumentos oscilatorios en la concentración calcio citosólica (McAinsh *et al.*, 1990), a través de la entrada de este ión desde reservorios intracelulares y del medio extracelular. El aumento en la concentración de calcio inhibe a las H⁺-ATPasas de membrana (Kinoshita *et al.*, 1995) y a los canales K⁺_{in} de la membrana plasmática. El calcio por otra parte activa canales aniónicos que median la salida de aniones (principalmente Cl⁻) hacia el medio extracelular (Schroeder & Hagiwara, 1989). Existen dos tipos de canales aniónicos, de tipo S (activación lenta y sostenida) y de tipo R (activación rápida) (Dietrich & Hedrich, 1994). La inactivación de las H⁺-ATPasas, sumada a salida de aniones causa la despolarización de la membrana plasmática, provocando la una inactivación aún mayor de los canales K⁺_{in} y la activación de canales K⁺_{out}. Estos fenómenos causan la salida de iones fuera de las células de la guarda, con la consecuente reducción de su potencial osmótico y cierre estomático (Schroeder & Hagiwara, 1989). De manera concomitante se produce la activación de canales iónicos de la membrana vacuolar, de manera de permitir la salida de iones de este reservorio intracelular (Ward & Schroeder, 1995).

El Ca⁺⁺ cumple un rol importante como segundo mensajero en la respuesta estomática al ABA y a otros estímulos (Schroeder *et al.*, 2001; Hetherington & Bronwlee, 2004). Se conocen distintos segundos mensajeros que regulan la liberación oscilatoria de Ca⁺⁺ al citoplasma a partir de reservorios intracelulares. La ADP-ribosa cíclica causa la liberación de calcio de las vacuolas y promueve el cierre estomático (Allen *et al.*, 1995; Leckie *et al.*, 1998). La producción de inositol 1,4,5 trifosfato a

través de la acción de la fosfolipasa C también causa la liberación de calcio de reservorios intracelulares (Staxen *et al.*, 1999), al igual que el mio-inositol hexaquisfosfato (Lemistri-Chlie *et al.*, 2000). Un efecto similar se observa cuando se genera ácido fosfatídico a través de la fosfolipasa D (Jacob *et al.*, 2000). La esfingosina-1-fosfato (Ng *et al.*, 2001) y el óxido nítrico (García-Mata *et al.*, 2003) también causan la liberación de calcio y promueven el cierre estomático. El Ca^{++} también puede ingresar al citosol a través de canales en la membrana plasmática, los cuales se activan por ABA (Hamilton *et al.*, 2000; Pei *et al.*, 2000). En *A. thaliana*, el H_2O_2 funciona como segundo mensajero en la activación de estos canales (Pei *et al.*, 2000). A pesar de que numerosos estudios muestran una correlación entre los movimientos estomáticos y la liberación de Ca^{++} , el rol de este ion en control de los movimientos estomáticos no está todavía muy claro. Allen *et al.* (2000) mostraron una fuerte evidencia de un rol causal entre las oscilaciones de Ca^{++} y el cierre estomático en *A. thaliana* a través de estudios realizados en la mutante *det3*, la cual presenta una disminución en la expresión de una H^+ -ATPasa necesaria para la recaptura del Ca^{++} en reservorios intracelulares. Sin embargo, se describió en varios casos el cierre estomático en ausencia de liberación de Ca^{++} (Hetherington & Bronwlee, 2004). En particular, Levchenko *et al.* (2005) hallaron que dicha liberación no es necesaria para la activación de los canales iónicos responsables de la despolarización de la membrana plasmática que precede al cierre estomático.

La fosforilación de proteínas juega un rol central en la regulación del cierre estomático inducido por ABA. El inhibidor de proteín kinasas de serina y treonina K252a impide el cierre de los estomas por ABA y bloquea las corrientes aniónicas (Schmidt *et al.*, 1995). A partir de un primer estudio bioquímico se logró aislar un gen de *Vicia faba* que codifica una kinasa denominada AAPK, que es necesaria para la señalización del ABA en las células de la guarda (Li *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002). La expresión transitoria de una mutante dominante negativa de esta kinasa bloquea las corrientes aniónicas tipo S. En la misma especie se aislaron dos proteínas kinasas dependientes de Ca^{++} (CDPK) que actuarían como reguladores positivos de la acción

del ABA (Sheen, 1996).

Existe evidencia bioquímica de la participación de MAPKs (MAPK) en la señalización del ABA en células de la guarda. Mori & Muto (1997) encontraron una actividad kinasa de proteína básica de mielina (un sustrato específico de MAPKs) inducible por ABA en protoplastos de células de la guarda de *V. faba*, mientras que Burnett *et al.*, (2000) hallaron que el inhibidor de MEKs (proteínas que activan por fosforilación a MAPKs) PD98059 bloquea la acción del ABA sobre los movimientos estomáticos en *Pisum sativum*.

Se reportó además que inhibidores de fosfatasa del tipo PP1 y PP2A, como el ácido okadaico, son capaces de estimular (Schmidt *et al.*, 1995) o de inhibir (Pei *et al.*, 1997) corrientes aniónicas tipo S que participan en el cierre estomático. Estos resultados sugieren la existencia de fosfatasas con roles regulatorios positivos y negativos en la señalización del ABA. Hey *et al.* (1997) mostraron que en *P. sativum* las actividades positivas y negativas pueden ser diferenciadas, ya que el ácido okadaico potencia o antagoniza el efecto del ABA según el grado de apertura inicial que poseen los estomas. El ácido okadaico inhibe también las corrientes de potasio de entrada y de salida en células de la guarda de *V. faba* (Thiel & Blatt, 1994).

Durante el cierre estomático se producen además la endocitosis de membrana plasmática (Shope *et al.*, 2003) y cambios en el citoesqueleto que están mediados al menos en parte por la GTPasa AtRAC1 (Lemichez *et al.*, 2001), y. Por otra parte, existe buena evidencia del rol de factores de transcripción (Comminelli *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2005) y del cambios en el metabolismo del ARN (Hugouvieux *et al.*, 2001) en el cierre estomático.

1.b.4) Rol del estado redox de las células de la guarda en la transducción de señales

En los últimos años diversos trabajos mostraron la importancia de las especies reactivas de oxígeno y el estado redox en la transducción de señales en células de la guarda y en otros procesos fisiológicos (Apel and Hirt, 2004; Desikan *et al.*, 2004^a;

Foyer & Noctor, 2005; Mittler *et al.*, 2004). Como se mencionó previamente, el H₂O₂ media la activación de canales de membrana plasmática que permiten la entrada de Ca⁺⁺ en células de la guarda estimuladas con ABA. El H₂O₂ induce el cierre estomático y oscilaciones de Ca⁺⁺ en células de la guarda de *Commelina communis* (McAinsh *et al.*, 1996). Por otra parte, se describió la síntesis de H₂O₂ en células de la guarda en respuesta a diversos estímulos, tales como *elicitors* de patógenos (Lee *et al.*, 1999), ABA (Pei *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2001), calmodulina extracelular (Chen *et al.*, 2004), metil jasmonato (Suhita *et al.*, 2004), oscuridad (Desikan *et al.*, 2004b; She *et al.*, 2004) y ozono (Joo *et al.*, 2005). El H₂O₂ aplicado exógenamente es capaz de activar los canales de calcio de la membrana plasmática, y la activación de estos canales por ABA se encuentra bloqueada en dobles mutantes para los genes *AtrbohD* y *AtrbohF*, los cuales codifican enzimas NADPH oxidasas de membrana plasmática que catalizan la síntesis de H₂O₂ (Kwak *et al.*, 2003). La kinasa OST1 (Mustilli *et al.*, 2002) y la fosfatasa PP2C ABI1 (Murata *et al.*, 2001) posiblemente medien la producción de H₂O₂ inducida por ABA en células de la guarda, ya que al mutarse dichos genes éstas pierden la capacidad de sintetizar H₂O₂ en respuesta a la hormona. Estas mutantes tienen afectada la capacidad de cerrar los estomas en respuesta al ABA, pero sí lo hacen al ser tratadas con H₂O₂ exógeno, lo cual indica que estas proteínas actuarían río arriba de la producción de esta molécula. Las mutantes de la subunidad α de la proteína G trimérica, *gpa1*, también presentan alteraciones en la respuesta estomática al ABA (Wang *et al.*, 2001) y una menor producción de H₂O₂ en células de la guarda tratadas con calmodulina (Chen *et al.*, 2004) y ozono (Joo *et al.*, 2005). El segundo mensajero fosfatidil inositol-3-fosfato también parece estar río arriba de la producción de H₂O₂ inducida por ABA (Park *et al.*, 2003). Además de participar en la señalización del cierre estomático, Zhang *et al.* (2004) hallaron evidencia de que el H₂O₂ también participa en la transducción de señales del ABA en el proceso de inhibición de la apertura, posiblemente a través de la regulación de la actividad de H⁺-ATPasas de membrana por fosforilación. Otra línea de evidencia sobre la importancia del equilibrio redox en la señalización en células de la guarda la aporta el trabajo de Chen

& Gallie (2004), quienes hallaron que el estado redox del ácido ascórbico (uno de los principales *scavengers* del H₂O₂) de estas células controla la señalización por ABA y los movimientos estomáticos. A pesar de toda la evidencia que sugiere que dicho compuesto participa en la señalización del ABA, Kohler *et al.* (2003) hallaron que cuando es aplicado de manera exógena en protoplastos de *V. faba* inhibe los canales de potasio K⁺out, involucrados en la salida de potasio en el cierre de los estomas. Este trabajo muestra que, al menos en el sistema utilizado, la aplicación exógena de H₂O₂ no es equivalente a la aplicación de ABA en células de la guarda, y genera dudas sobre los modelos actuales sobre el rol del H₂O₂ en la señalización del ABA.

1.b.5) Modulación de la sensibilidad estomática al ABA

La existencia de interacción entre las vías de señalización en células de la guarda es apoyada por varios trabajos experimentales. En particular, la respuesta estomática al ABA (al igual que la de otros procesos fisiológicos regulados por esta hormona) varía según la presencia de otros estímulos ambientales e internos (Dodd, 2003; Weyers & Paterson, 2001). Por ejemplo, la respuesta estomática al ABA puede ser moderada por citoquininas (Radin *et al.*, 1982), el estado nutricional de nitrato y fosfato (Radin, 1984; Radin & Ackerson, 1981), la concentración ambiental de CO₂ (Radin *et al.*, 1988), altas y bajas temperaturas (Rodriguez & Davies, 1982) y episodios de estrés pasados (Goh *et al.*, 2003; Peng and Weyers, 1994). También se sabe que la reducción del potencial agua de la planta aumenta la sensibilidad estomática al ABA (Tardieu & Davies, 1992). Diversos estímulos hormonales también afectan la sensibilidad estomática al ABA. Por ejemplo, la incubación de epidermis de *C. communis* en soluciones con ácido indol acético (IAA) 10 o 100 μM (Snaith & Mansfield, 1982) o de benciladenina (BAP) 50 μM (Das *et al.*, 1976) son capaces de antagonizar el cierre estomático inducido por el ABA. Lo mismo se observa al incubar hojas de maíz con zeatina o kinetina 10 o 100 μM (Blackman & Davies, 1983).

1.b.6) Rol del etileno en el control de los movimientos estomáticos e interacción con la señalización del ABA

El etileno es un regulador del crecimiento gaseoso involucrado en múltiples procesos de desarrollo en la planta, tales como la germinación, la maduración del fruto, la abscisión de hojas y flores y la senescencia; y también participa en la respuesta al estrés (Bleecker & Kende, 2000; Chang & Bleecker, 2004; Wang *et al.*, 2002). En este último caso, su efecto más general es retardar el crecimiento de planta hasta la cesación del estrés (Klee, 2004). El etileno tiene un rol particularmente importante en la respuesta a la inundación, la cual provoca una situación de anoxia en las raíces (Grichko & Glick, 2001; Jackson, 2002). Bajo esta situación, se produce en las raíces la síntesis del precursor del etileno ácido aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), el cual es transportado por el floema y convertido a etileno en el vástago. El etileno media diversas respuestas de adaptación a la inundación, entre ellas la formación de lenticelas y de aerénquima. La inundación también causa el cierre estomático, ya que el daño causado por hipoxia a las raíces impide que a pesar de la abundancia de agua la planta pueda tomarla a través de este órgano. Sin embargo, se sabe que el etileno no es responsable del cierre estomático en esta circunstancia, y se postula la existencia de otra señal radicular encargada de llevar esta señal (Jackson, 2002).

Si bien el etileno no mediaría el cierre estomático inducido por inundación, existen diversos reportes que muestran que esta hormona es capaz de regular los movimientos estomáticos. Taylor & Gunderson (1986) hallaron que la aplicación exógena de etileno indujo el cierre estomático en seis de trece especies analizadas. Gunderson & Taylor (1991) hallaron que el etileno inhibe la apertura estomática en plantas de soja, mientras que Kamaluddin & Zwiazek (2002) reportaron que aumenta la apertura estomática en plántulas de pino aspen hipóxicas, a pesar de que usualmente los estomas tienden a cerrarse bajo condiciones de hipoxia. Por otra parte, Merrit *et al.* (2001) encontraron que inhibidores de la síntesis y de la acción del etileno impiden la apertura estomática inducida por auxinas en *V. faba*, lo cual sugiere que la

apertura estomática inducida por auxinas está mediada por el etileno, al menos en esta especie. En conjunto, estos y otros trabajos no citados muestran que el efecto del etileno sobre los movimientos estomáticos varía según la especie estudiada, por lo que no es posible establecer un patrón común de acción de esta hormona.

En particular en *A. thaliana* no se describió el efecto del etileno sobre el cierre estomático al momento de realizar esta tesis. Beaudoin *et al.* (2000) reportaron que en esta especie las mutantes insensibles al etileno *ein2* (*ethylene insensitive*) cierran los estomas normalmente en respuesta al ABA. Sin embargo, en el mismo trabajo estos autores, simultáneamente con Ghassemian *et al.* (2000), hallaron fuertes evidencias de que las vías de transducción del ABA y del etileno interactúan tanto en la germinación como en el crecimiento de las raíces en *A. thaliana*. Las mutantes insensibles al etileno *ein2* y *etr1* (*ethylene triple response*) muestran una mayor sensibilidad al ABA en la germinación, mientras que las mutantes *ctr1* (*constitutive triple response*), que se comportan como si estuvieran permanentemente bajo el efecto del etileno, tienen una sensibilidad aumentada al ABA en dicho proceso. En el crecimiento de la raíz, si bien el etileno exógeno disminuye la sensibilidad al ABA, las mutantes insensibles al etileno *ein2* y *etr1* presentan una menor sensibilidad al ABA. Por otra parte la aplicación exógena de ACC (el cual luego es convertido a etileno dentro de la planta por la enzima ACC oxidasa) disminuye la sensibilidad al ABA en la germinación. Estos experimentos muestran que existe una interacción entre el ABA y el etileno tanto en la germinación como en el crecimiento, si bien en ambos procesos ocurre de manera diferente. Dado que el ABA tiene un rol muy importante en control de los movimientos estomáticos, sería posible *a priori* que también existiese una interacción entre esta hormona y el etileno en el control de este mecanismo.

1.c) Transducción de señales a través de cascadas de MAP kinasas

Las cascadas de MAP kinasas (o MAPK, de *mitogen activated protein kinase*, en castellano proteínas kinasas activadas en la mitosis) son módulos de transducción de

señales presentes universalmente en los eucariotas. Estas cascadas de fosforilación de proteínas participan en la transmisión y amplificación intracelular de estímulos extracelulares, lo cual permite finalmente la inducción de las respuestas bioquímicas y fisiológicas apropiadas.

Las MAPKs son los módulos terminales de estas cascadas de fosforilación y son capaces de fosforilar en residuos de serina y treonina a otros sustratos, los cuales pueden ser entre otros factores de transcripción, otras proteínas kinasas y proteínas asociadas al citoesqueleto (Roux & Blenis, 2004). La primera MAPK fue identificada como responsable de la fosforilación de una proteína asociada a microtúbulos, llamándosela por lo tanto *microtubule associated protein-2 kinase* (MAP-2 kinase) (Sturgill & Ray, 1986). Poco después se la renombró a p42 MAPK (*mitogen activated protein kinase*) cuando se descubrió que pertenecía a una familia de proteínas activadas por distintos estímulos mitogénicos (Rossomando *et al.*, 1988). Con posterioridad se halló que la activación de estas cascadas de fosforilación no sólo se correlaciona con la aplicación de estímulos mitogénicos, sino también con la de muchos otros estímulos extracelulares, tales como luz UV, agentes genotóxicos, mediadores inflamatorios, trombina y estiramiento mecánico (Morris, 2001). En particular en plantas, se describió la activación de MAPKs durante la división celular y en respuesta a hormonas, infección por patógenos, heridas, baja temperatura, sequía, hiper- e hipoosmolaridad, alta salinidad, tacto y especies reactivas de oxígeno (Morris, 2001; Jonak *et al.*, 2002; Nakagami *et al.*, 2005).

Para que se manifieste su actividad catalítica, las MAPKs deben ser activadas por fosforilación simultánea en dos residuos de treonina y tirosina ubicados dentro del motivo TxY, el cual se encuentra en el denominado *loop* de activación, en el subdominio de kinasa VIII (Payne *et al.*, 1991). X es un aminoácido que puede ser glutámico, glicina, prolina o aspártico. Cuando se descubrió inicialmente este mecanismo de activación, en la década del '80, se pensó que habría dos tipos de kinasas distintas para fosforilar los dos aminoácidos, ya que hasta ese momento sólo se conocían kinasas capaces de fosforilar un tipo de residuo. Resultó sorprendente

entonces el hallar que las MAPKs son activadas por proteínas kinasas de doble especificidad para serina y treonina, denominadas MAPK kinasa (MAPKK) o, más recientemente, MEK (*MAP/ERK kinase*) (Crews & Erikson, 1992). La inactivación de las MAPKs se produce a través de proteínas fosfatasa de serina y treonina (Anderson *et al.*, 1990).

Las MEK a su vez son activadas por fosforilación en residuos de serina y treonina que se encuentran dentro de la secuencia S/TxxxS/T (donde x puede ser cualquier aminoácido), y desactivadas por fosfatasas de serina y treonina. La activación de las MEK se produce por las MEKK (MEK kinase), previamente también conocidas como MAPK kinasas (MAPKKK). El conjunto de la MAPK, MEK y MEKK constituyen una cascada de MAPK (*MAP kinase cascade*).

Tanto las MAPKs como las MEKs y MEKKs en general presentan *in vitro* una especificidad de sustrato bastante baja. En el caso de las MAPKs, la especificidad de sustrato *in vivo* estaría dada al menos en parte por la presencia de dominios de anclaje (*docking domains*) en sus proteínas sustrato (Sharrocks *et al.*, 2000). En cuanto a la especificidad de las distintas cascadas de MAPK que pueden funcionar simultáneamente *in vivo*, estaría dada por la existencia de proteínas conectoras (*scaffold*) que contribuirían a la especificidad de las interacciones (Morrison & Davis, 2003).

En los mamíferos, donde más se más estudiaron las cascadas de MAPK, los análisis de similitud de secuencia permiten distinguir tres familias de MAPKs (Chang & Karin, 2001; Roux & Blenis, 2004). La primera familia en ser identificada fue la de las ERK/MAPKs (*Extracellular signal Regulated Kinase*). Este tipo de MAPK, con la secuencia TEY en el *loop* de activación, se activa en mamíferos principalmente en respuesta factores de crecimiento tales como el EGF (*epidermal growth factor*) que interactúan con receptores tirosina kinasa que se encuentran río arriba de la cascada de MAPK (Lewis *et al.*, 1998). Las MAPKs perteneciente familia JNK/SAPK (*Jun N-terminal Kinase/Stress Activated Protein Kinase*) poseen la secuencia TPY en su *loop* de activación y se activan fuertemente por citoquinas inflamatorias, radiación UV,

deprivación de factores de crecimiento y agentes genotóxicos (Kyriakis *et al.*, 2001). Un sustrato bien estudiado de las JNK es el factor de transcripción c-Jun. Por último, la familia p38/Hog (p38 es una MAPK de mamíferos mientras que Hog es una proteína similar de levaduras) es activada por citoquinas inflamatorias, endotoxinas y estrés osmótico y oxidativo, pero no por estímulos mitogénicos. Si bien se activa por estímulos similares a los de las JNK/SAPK, la acción de las MAPK p38 puede ser distinguida por inhibidores específicos, como el SB203580. Así se encontraron numerosas evidencias de que las MAPKs p38 tienen un rol muy importante en las respuestas inmune e inflamatoria. Estas MAPKs se activan en macrófagos, neutrófilos y células T en respuesta a numerosos mediadores extracelulares de inflamación como quimioattractantes, citoquinas, y lipopolisacáridos bacterianos (Ono & Han, 2000).

1.c.1) MAP kinasas en plantas

Las MAPKs de plantas pertenecen a la misma familia que las ERK de mamíferos. En *A. thaliana*, la primera planta cuyo genoma fue totalmente secuenciado, se identificaron 20 genes que potencialmente codifican MAPKs, 10 para MEKs y 60 para MEKKs (Nakagami *et al.*, 2005). Un análisis filogenético de su secuencia permite clasificar a las MAPK de plantas en al menos cuatro grupos, denominados A, B, C y D (MAPK group, 2001).

En varios trabajos se reportó que las MAPKs del grupo A se activan (y/o su gen se induce) en respuesta a diversos estímulos ambientales y hormonales. Por ejemplo, AtMPK3 y AtMPK6 de *A. thaliana* se activan en respuesta a distintos estreses bióticos y hormonales (Ahlfors *et al.*, 2004; Asai *et al.*, 2002; Kovtun *et al.*, 2000; Nuhse *et al.*, 2000). WIPK de tabaco se activa por estreses bióticos y abióticos y heridas (Zhang & Klessig., 1998; Zhang & Klessig, 2000; Ekengren *et al.*, 2003), mientras que SIPK de la misma especie lo hace por distintos estreses bióticos y abióticos, etileno y ácido salicílico (Zhang & Klessig, 1998; Sharma *et al.*, 2003; Limmongkon *et al.*, 2004; Pozo *et al.*, 2004). En otras especies estudiadas se hallaron resultados similares (ver referencias bibliográficas en Nakagami *et al.*, 2005). Las MAPKs estudiadas pertenecientes a los

grupos B y D también son estimuladas por distintos estreses bióticos y abióticos (Nakagami *et al.*, 2005). Dentro del grupo B se describió que Ntf6 de tabaco se encuentra asociada a división celular y citoquinesis (Calderini *et al.*, 2001). Las MAPK del grupo D difieren de las de los otros grupos en que el *loop* de activación posee la secuencia TDY en vez de TEY. Y también en que son el único grupo que no posee un dominio carboxi terminal evolutivamente conservado, denominado CD, cuya función es permitir la interacción con MEKs, fosfatasa y proteínas sustrato (Tanoue *et al.*, 2000). En cuanto a las MAPK del grupo C, existen muy pocos reportes sobre su función.

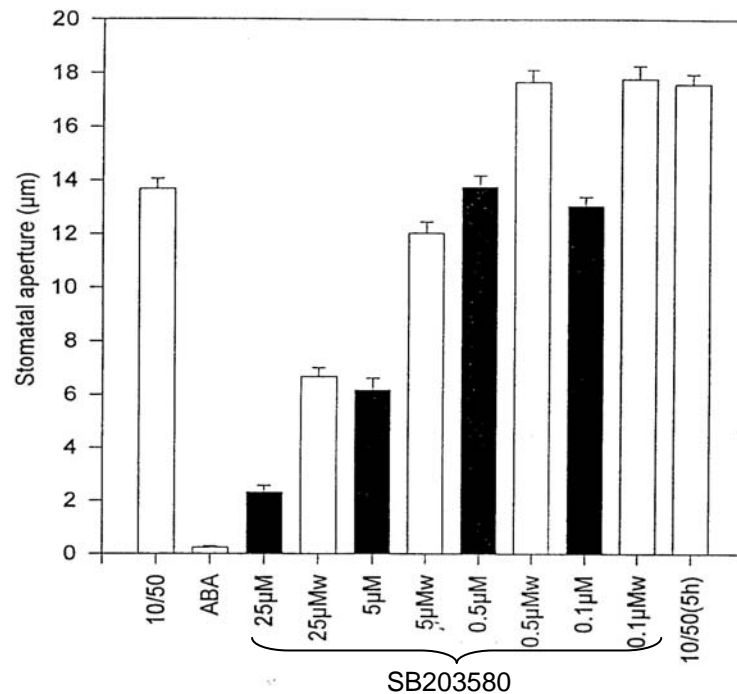


Figura 2. La aplicación del inhibidor de MAPK p38 SB203580 inhibe la apertura estomática inducida por la luz. Se incubaron epidermis de *C. communis* en *buffer* 10/0 (ver materiales y métodos) durante 2 h. Luego se las transfirió a *buffer* 10/50 (ver materiales y métodos) y se las incubó a la luz durante 3 h en presencia de ABA, a las concentraciones indicadas del inhibidor. Leyendas: 10/50: 3 h sin agregados; ABA: 20 µM ABA; 10/50(5h): 5 h sin agregados; en el resto de las incubaciones se agregó SB203580 en las concentraciones indicadas en la figura. Barras negras: 3 h en presencia del inhibidor, w (barras blancas): 3 h en presencia del inhibidor + 2 h en 10/50 para lavarlo. En los experimentos graficados con barras negras, luego del tratamiento se transfirieron las epidermis a *buffer* 10/50 sin agregados y se las incubó 2h más con el fin de lavar el inhibidor. Las barras representan el error estandar de un total de 180 mediciones realizadas a lo largo de tres experimentos independientes.

1.d) Trabajo previo a la realización de la tesis

Poco antes de dar comienzo al este trabajo de tesis, Calum Leckie, Dale Sanders y Alistair Hetherington (Universidad de Lancaster, Gran Bretaña) encontraron que el inhibidor de MAPKs específico de la familia p38 de mamíferos, SB 203580, es capaz de inhibir la apertura inducida por la luz en los estomas de *C. communis* (figura 2, resultados no publicados). La aplicación de este compuesto a una concentración de 10 μM causó una inhibición casi total de la apertura, similar a la que se obtiene con altas concentraciones de ABA, mientras que 1 μM del inhibidor tuvo un efecto apreciable. Como referencia, las concentraciones de SB 203580 utilizadas usualmente en experimentos en células de mamíferos en cultivo son del orden de 1 a 10 μM . El efecto del inhibidor fue revertido en su mayor parte por el lavado de las epidermis durante tres horas. El mismo inhibidor en cambio no causó ningún efecto sobre la promoción del cierre estomático (resultados no mostrados). Estos resultados sugerían que una MAPK inhibible por SB203580 (y por lo tanto tal vez miembro de la familia p38) podría mediar la apertura estomática mediada por la luz.

Poco después llegué a la Universidad de Lancaster para realizar una pasantía y nos propusimos identificar a la supuesta MAPK blanco del inhibidor en células de la guarda. Una búsqueda bibliográfica sobre el inhibidor SB 203580 reveló que se trata de un análogo competitivo del ATP altamente específico de MAPKs p38 (Cuenda *et al.*, 1995; Young *et al.*, 1997). Esta especificidad se debe en buena medida a la presencia del aminoácido treonina (T) en la posición 106 dentro del bolsillo de unión de ATP. En otras MAPKs de mamíferos suele encontrarse metionina, y en algunos casos glutamina, en esta posición, ambos más voluminosos que la treonina. Distintas líneas de evidencia muestran la importancia de la T106 para la especificidad de la acción de SB203580 sobre p38. La estrecha interacción entre el aminoácido y el inhibidor se demostró al hacer un *crosslink* del SB203580 a la proteína p38, ya que casi la totalidad del inhibidor se recupera unida a la treonina (Young *et al.*, 1997). Este dato concuerda con observaciones cristalográficas de p38 unida a SB203580 (Tong *et al.*, 1997),

aunque estos autores sugieren que también otras características estructurales serían responsables de la especificidad de interacción entre p38 y SB203580. Los estudios de mutagénesis realizados por Gum *et al.* (1998) también aportan evidencia a favor de la importancia de esta interacción para la especificidad del inhibidor, ya que al mutar la treonina por metionina se pierde la mayor parte del efecto del inhibidor sobre p38. Evers *et al.* (1998) por su parte mostraron que otras MAPKs distintas de p38 pueden volverse sensibles al inhibidor al cambiar la metionina por treonina.

Dado que el inhibidor SB203580 es altamente específico de las MAPKs p38, especulamos que su efecto sobre la apertura estomálica en *C. communis* podría deberse a la existencia en plantas de miembros de esta familia de MAPKs, cosa que no se había reportado hasta ese momento.

Con el fin de investigar esta posibilidad, intentamos aislar por PCR un cDNA de un gen que codificase una MAPK p38 a partir de una biblioteca de cDNA de *Nicotiana rustica* altamente enriquecida en células de la guarda (> 95%), cedida gentilmente por Julie Gray (Universidad de Sheffield, Gran Bretaña). Se utilizó una biblioteca generada a partir de este tejido ya que el efecto del inhibidor SB203580 fue observado en epidermis aisladas. En colaboración con Peter Morris (Universidad Heriot-Watt, Gran Bretaña) diseñamos *primers* degenerados para PCR basados en regiones conservadas entre diversas MAPKs p38 y no presentes en otras familias de MAPKs. Como estrategia alternativa, diseñamos *primers* degenerados anidados, de forma de amplificar en primer término regiones comunes a todos los genes para MAPKs, y en una segunda ronda de amplificación una región interna específica para genes de MAPKs p38. Mediante las reacciones de PCR amplificamos varios fragmentos de cDNA que al secuenciarlos revelaron tener homología a nivel de aminoácidos con MAPKs y otras kinasas, pero ninguno presentó alta identidad de secuencia con MAPKs p38.

Durante la realización de este trabajo tomamos contacto con una publicación que describe un estudio filogenético de todas las secuencias de genes de MAPKs descritos hasta 1998 (Kültz, 1998). A partir de la recopilación realizada en este trabajo se

observaba que todos los genes de MAPKs de plantas encontrados hasta ese momento tienen alta identidad de secuencia entre sí, y caen dentro de la subfamilia de MAPKs ERK. Este hecho nos llevó a dudar sobre la existencia de genes ortólogos de p38 en plantas. Al momento de escribir esta tesis se conoce la secuencia de un número mucho mayor de genes de vegetales que codifican MAPKs y ninguna pertenece al subtipo p38. Por lo tanto descartamos la posibilidad de existan MAPKs p38 en vegetales.

Paralelamente, intentamos reproducir los experimentos con el inhibidor de MAPK en conjunto con Calum Leckie, quien los había realizado originalmente. Repetimos el experimento de inhibición de la apertura estomática por SB203580 en *C. communis* y en *A. thaliana*. Si bien observamos nuevamente el efecto de inhibición de la apertura, fue de bastante menor magnitud que la obtenida en el experimento inicial (resultados no mostrados). Por otro lado, obtuvimos mucha variabilidad en la magnitud del efecto del inhibidor entre distintos experimentos. Decidimos entonces tratar de hallar la proteína supuestamente blanco del inhibidor para intentar comprobar su posible función por medios genéticos.

Dado que la acción del inhibidor SB203580 requiere de la presencia del aminoácido T106 en el bolsillo de unión de ATP de p38 (ver más arriba) buscamos en el GenBank secuencias de MAPKs vegetales con este aminoácido en la posición equivalente. En *A.thaliana*, de las veinte MAPKs potencialmente codificadas en su genoma sólo una, AtMPK3, presenta una treonina en dicha posición y es por lo tanto un blanco potencial del inhibidor (figura 3).

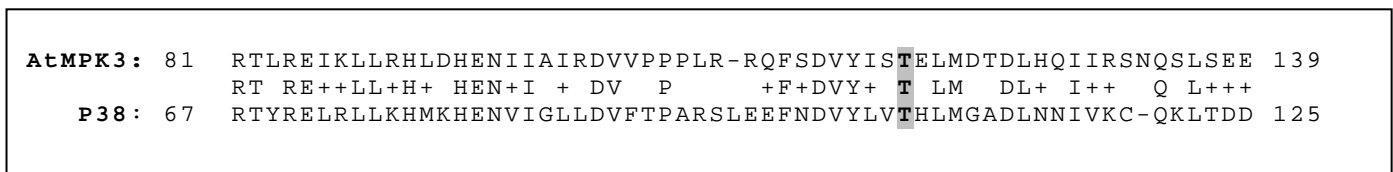


Figura 3. Alineamiento de secuencias parciales de los genes AtMPK3 de *A. thaliana* (GenBank NM_114433) y p38 α de *Homo sapiens* (GenBank Q95NE7). El alineamiento se realizó con el programa BLAST. En fondo gris se muestra la treonina en la posición 106 de p38 que es blanco del inhibidor SB203580 y se encuentra conservada entre ambos genes.

Si AtMPK3 de *A. thaliana* –y su hipotético ortólogo de *C. communis*- fueran los blancos de acción del inhibidor SB203580 en los ensayos de apertura estomática mencionados anteriormente, estas kinasas deberían expresarse en células de la guarda. Hallamos que esto efectivamente sucede con los ortólogos AtMPK3 en *N. rustica* y en *Brassica campestris*. Calum Leckie y Peter Morris hallaron en la biblioteca de cDNA de *N. rustica* enriquecida en células de la guarda ya citada el cDNA de WIPK (*Wound induced protein kinase*), el ortólogo en este organismo de AtMPK3 (resultados no publicados). Por otro lado, Kwak *et al.*, (1997) reportaron la presencia de un EST (*expressed sequence tag*, o marcador de secuencia expresada) con 100% de identidad a nivel de aminoácidos con AtMPK3 en una biblioteca de cDNA enriquecida en células de la guarda de *B. campestris*, una especie altamente emparentada con *A. thaliana*. Estos autores también reportaron la presencia en la misma biblioteca de otro EST que presenta 100 % de identidad con AtMPK4, otra MAPK de *A. thaliana*. AtMPK4 está involucrada en la respuesta a patógenos y se expresa en células de la guarda de *A. thaliana* (Petersen *et al.*, 2000), pero no se describió su función en este tipo celular.

La disponibilidad de secuencias de genes cuyo producto posiblemente sea el blanco del inhibidor SB203580, sumada a variabilidad en los ensayos del efecto del inhibidor sobre la apertura estomática, nos llevaron a estudiar la posible función de las MAPKs sobre los movimientos estomáticos mediante herramientas genéticas. Para ello decidimos utilizar como modelo de estudio a *A. thaliana*, a pesar de que en el laboratorio se utilizaba la planta *C. communis* como modelo para estudiar la fisiología de los estomas, por la facilidad con la que es posible aislar sus epidermis y medir la respuesta estomática ante distintos estímulos. Sin embargo, existe muy poca información genética sobre esta planta, y no se desarrollaron métodos para su transformación. *A. thaliana*, presenta en general ciertas dificultades para los estudios fisiológicos y bioquímicos debido a su diminuto tamaño. En particular, sus estomas son mucho más pequeños que los de *C. communis* y su rango de apertura oscila alrededor de los tres o cuatro micrones, contra hasta 18 en la otra especie (ver figura 2). Sin embargo, *A. thaliana* constituye un muy buen modelo genético por la

abundancia de información disponible, incluida la secuencia completa de su genoma (The *A. thaliana* genome initiative, 2000), y por la sencillez del procedimiento de su transformación genética (Clough & Bent, 1998). Nos propusimos en consecuencia utilizar este organismo para el estudio de la posible función de AtMPK3 en células de la guarda.

Al realizar una búsqueda bibliográfica sobre AtMPK3 hallamos que su cDNA fue descrito por primera vez, junto con los de otras seis MAPKs de *A. thaliana*, por Mizoguchi *et al.* (1993). El mismo grupo encontró unos años más tarde que la transcripción de su gen se induce de manera importante en plantas tratadas con sal, frío o tacto (Mizoguchi *et al.*, 1996). Más tarde Kovtun *et al.* (2000) hallaron que la actividad de AtMPK3 se induce por H₂O₂ en protoplastos de mesófilo, y que esta MAPK probablemente participe en una cascada de señalización que causa la activación de genes de respuesta a estrés y la represión de genes inducibles por auxinas. Estos autores reportaron en el mismo trabajo que AtMPK3 no se induce por ABA en el sistema que utilizaron. Durante la realización de los experimentos de la tesis, otros trabajos mostraron más evidencia de la participación de AtMPK3 en la señalización hormonal y de estreses abióticos y bióticos. Lu *et al.* (2002) hallaron que esta MAPK se activa en plántulas en respuesta a H₂O₂ y ABA, y que la sobreexpresión de su gen aumenta la sensibilidad al ABA en la detención post-germinativa del crecimiento inducida por el ABA, lo cual sugiere que AtMPK3 media la señal del ABA en este proceso. Ciertas fuentes de estrés abiótico, como el tratamiento de una suspensión celular bajo condiciones de hiperosmolaridad (Droillard *et al.*, 2002) y el tratamiento con ozono (un contaminante atmosférico que causa estrés oxidativo) también causan la activación de AtMPK3 y, en el caso del ozono, su translocación al núcleo. Asai *et al.* (2002) hallaron que AtMPK3 posiblemente participe de una cascada de MAPK que causa la activación de genes de respuesta a patógenos activada por el *elicitor* flagelina. Esta MAPK también se activa (o se induce su transcripción) en respuesta a la infección por hongos o al *elicitor* fúngico quitina (Schenk *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004). En conjunto es trabajos muestran evidencia de que AtMPK3 posiblemente medie la

respuesta a distintos tipos de estrés bióticos y abióticos. En particular, es fuertemente inducida en respuesta a estrés del tipo oxidativo y durante la infección por patógenos, durante los cuales se generan normalmente una importante cantidad de especies reactivas de oxígeno (Foyer & Noctor, 2005). Sin embargo, al no haberse descrito al momento de la escritura de esta tesis plantas mutantes para su gen, es difícil establecer una relación causal entre su activación y las respuestas biológicas observadas.

Al momento de comenzar los experimentos de esta tesis apareció importante evidencia del rol del H₂O₂ como mediador de los movimientos estomáticos inducido por ABA en *A. thaliana* (Pei *et al.*, 2000) y en *V. faba* (Zhang *et al.*, 2001) (ver 1.b.4 más arriba). Dado que AtMPK3 se induce por H₂O₂, y que probablemente se exprese en células de la guarda (ya que lo hacen sus ortólogos en *N. rustica* y *B. campestris*), dado que el H₂O₂ es capaz de inducir los movimientos estomáticos y que es un mediador de los movimientos estomáticos inducidos por el ABA, y dado que AtMPK3 es un potencial blanco de acción del inhibidor SB203580 (capaz de inhibir la apertura estomática) postulamos la hipótesis de que AtMPK3 podría participar en la señalización del H₂O₂ en las células de la guarda. Esta hipótesis está también sustentada en las evidencias bioquímicas, mencionadas anteriormente en 1.b.3, que sugieren la participación de cascadas de MAPK en el control de los movimientos estomáticos.

Con el fin de averiguar si AtMPK3 está involucrada en la transducción de señales relacionada con los movimientos estomáticos, se decidió expresar en *A. thaliana* un fragmento del cDNA de AtMPK3 en orientación antisentido bajo un promotor específico de células de la guarda, de manera tal de inhibir su expresión sólo en dicho tipo celular.

2. Materiales y métodos

2.a) Material vegetal y condiciones de crecimiento

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia 1 y las mutantes *eto1-1* y *ein2-1* (Guzman & Ecker 1990, ambas en el fondo genético Columbia) fueron obtenidas del banco de recursos genéticos *Arabidopsis* Biological Resource Center (ABRC), en EUA. Las semillas fueron desinfectadas en lavandina comercial al 10 % (v/v) con el agregado de 0,01% (v/v) del detergente Tween 20 durante 10 minutos dentro de un microtubo de 1,5 ml. Luego fueron lavadas cuatro veces en agua estéril y sembradas en placas de Petri con medio MS $\frac{1}{2}$ X (Murashige & Skoog, 1962) con el agregado de 1 % (p/v) de sacarosa y 0,6 % (p/v) de agar (Difco, EUA). Las placas con las semillas fueron incubadas durante dos o tres días en la oscuridad a 4°C para romper la dormición. En ese momento fueron transferidas durante dos días a una cámara de cultivo a una temperatura de 22°C y un fotoperíodo de 16 hs. de luz y 8 de oscuridad. Posteriormente las placas fueron llevadas por cinco o seis días más a un cuarto de cultivo con temperatura y fotoperíodo similares, e iluminadas por tubos fluorescentes Gro-Lux (fluencia de fotones $\approx 45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Al cabo de este período las plántulas fueron transferidas a vasos plásticos de 110 ml con una mezcla de vermiculita, turba y perlita (1:1:1), y fueron fertilizadas cada dos días.

Para preparar la solución fertilizante se diluyeron las siguientes cantidades de stocks de sales en 1 litro agua de la canilla: KNO_3 1M: 5 ml; KH_2PO_4 1M (pH 5,6): 2,5 ml; MgSO_4 1M: 2 ml; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1M: 2 ml; Fe-EDTA; micronutrientes: 1 ml. Preparación de la solución Fe-EDTA: para 450 ml se disuelven 2,5 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ en 400 ml de agua, se agregan 3,36 g de Na-EDTA, se calienta a ebullición y se deja enfriar lentamente con agitación mientras se lleva a volumen. Solución de micronutrientes: H_3BO_3 70 mM; MnCl_2 14 mM; CuSO_4 0,5 mM; ZnSO_4 1 mM, NaMoO_4 0,2 mM; CoCl_2 0,01 mM.

2.b) Construcción antisentido para *AtMPK3*

Para expresar el gen *ATMPK3* en orientación antisentido específicamente en células de la guarda se subclonó un fragmento parcial de su secuencia codificante en el vector binario BinK.

El vector BinK es un derivado del plásmido Bin19 (GenBank U12540, Bevan *et al.*, 1984) con una deleción de 642 pb del promotor del gen *kst1* insertado en su sitio de clonado múltiple. Dicha deleción confiere expresión específica en células de la guarda a las secuencias ubicadas aguas abajo (Plesch *et al.* 2001). Para la expresión del gen *AtMPK3* en orientación antisentido en células de la guarda se partió de un EST (*expressed sequence tag*) parcial del gen subclonado entre los sitios Sall y NotI del vector pZL1 (GenBank 96H23T7, Newman *et al.*, 1994). Dicho plásmido fue obtenido a través del banco de recursos genéticos ABRC. Se subclonó un fragmento de 422 pb del ADNc de *AtMPK3* obtenido mediante las enzimas HaeIII y SfcI en los sitios compatibles SmaI y Sall del sitio de clonado múltiple del vector binario BinK, en orientación antisentido en relación con promotor *kst1*. Se obtuvo así el plásmido BinK-ATMPK3 (ver figura 4). El subclonado se realizó por medio de técnicas usuales de biología molecular (Sambrook & MacCallum, 2001). La construcción fue verificada por secuenciación (resultado no mostrado).

Con el fin de transformar *A. thaliana*, los plásmidos BinK-ATMPK3 y BinK sin modificar (control) fueron introducidos en la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58c1 (Koncz & Schell, 1986), la cual lleva el plásmido Ti desarmado GV2260 (Deblaere *et al.*, 1985), por conjugación triparental (Ditta *et al.*, 1980). Se utilizó como cepa movilizadora *Escherichia coli* HB101 con el plásmido pRK2013 (Horsch *et al.*, 1985).

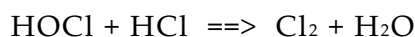
2.c) Transformación de *A. thaliana* y análisis de segregación de la resistencia a kanamicina

Las construcciones fueron introducidas en plantas de *A. thaliana* ecotipo Columbia 1 por medio de una modificación del método de infiltración in planta (Clough & Bent, 1998) desarrollado originalmente por Bechtold *et al.* (1993). Se utilizaron plantas de aproximadamente cuatro semanas de edad, a la que se les cortó la inflorescencia para favorecer el desarrollo de múltiples inflorescencias secundarias, de manera de aumentar la eficiencia de transformación. Aproximadamente diez días más tarde se efectuó la transformación con *A. tumefaciens*. Para ello se plaquearon las bacterias con los vectores binarios, en medio LB con los antibióticos kanamicina 50 mg/l, rifampicina 100 mg/l y gentamicina 100 mg/l. Las placas fueron incubadas 48 h a 28°C. Se reestriaron algunas colonias transformadas, y de las nuevas colonias se usaron algunas para inocular cultivos de 5 ml LB con los antibióticos kanamicina, rifampicina y gentamicina a las concentraciones anteriormente mencionadas. Estos cultivos, luego de ser incubados durante 48 h a 28°C a 200 rpm, fueron utilizados para hacer minipreparaciones de ADN plásmídico, las cuales se utilizaron para chequear que la integridad de los plásmidos en las bacterias transformadas.

Para la transformación de *A. thaliana* se utilizaron colonias de *A. tumefaciens* con los plásmidos respectivos para inocular cultivos de 5 ml de LB líquido con los kanamicina, rifampicina y gentamicina a las concentraciones descriptas anteriormente. Este cultivo, luego de ser agitado 48 h a 200 rpm a 28°C, fue utilizado en su totalidad para inocular un cultivo de 500 ml en LB con kanamicina 50 mg/l. Este fue incubado en las mismas condiciones durante 24 hs hasta llegar a una OD aproximada de 1. Al cabo de este período se lo centrifugó y resuspendió en sacarosa 5% hasta llegar a una OD de aproximadamente 0,8. Se agregó a la suspensión bacteriana el surfactante Silwett L-77 (0,05 % v/v) y luego se transvasaron aproximadamente 200 ml de la suspensión bacteriana a una bandeja donde se realizó la infección de los órganos florales. Se sumergió la parte aérea en el cultivo bacteriano durante unos segundos, con una suave

agitación, y luego se transfirieron las plantas a bandejas donde se las colocó de costado y se las cubrió con un film de PVC. Las plantas fueron transferidas nuevamente al cuarto de cultivo, y al cabo de uno o dos días fueron devueltas a la posición vertical.

Al cabo de un par de meses, cuando las plantas se secaron al terminar su ciclo de vida, se cosecharon las semillas. Las semillas se dejaron secar durante unas dos semanas al aire y luego se seleccionaron las semillas transformadas mediante el antibiótico kanamicina. Para ello, las semillas fueron previamente esterilizadas con gas cloro. Se pesaron 40 mg de semillas (aproximadamente 2.000) y se las incubó dentro microtubos de 1,5 ml con la tapa abierta en el interior de un desecador que también contenía un vaso de precipitado con una mezcla de 100 ml de lavandina y 3 ml de ácido clorihídrico concentrado. Esta mezcla libera gas cloro a partir de la reacción:



Al cabo de aproximadamente 16 horas, se detuvo la liberación de gas cloro mediante el agregado de 6 ml de hidróxido de sodio 10 N. Las semillas fueron distribuídas uniformemente sobre una placa con medio MS ½ X, con el agregado de 2% (p/v) de sacarosa, 0,6% (p/v) de agar y 50 mg/l kanamicina, y fueron incubadas como se describe más arriba en la sección 2.a (Material vegetal y condiciones de crecimiento). Al cabo de unos diez días las plantas resistentes a kanamicina (las que no se habían vuelto cloróticas como consecuencia del antibiótico) fueron transferidas a vasos plásticos con sustrato y cultivadas tal como se describió anteriormente. De las semillas obtenidas a partir de estas plantas se tomaron muestras y se las sembró en medio con kanamicina con el fin de calcular estimar estadísticamente el número de *loci* de inserción del transgén.

2.d) Detección por PCR de la construcción antisentido para *AtMPK3* en el genoma de *A. thaliana*

Se analizó la presencia del transgén en las plantas F2 mediante el análisis por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) del ADN genómico de las plantas transformadas.

Para la extracción de ADN genómico se utilizaron unas ocho plántulas, las cuales fueron homogeneizadas sin *buffer* dentro de un microtubo de 1,5 ml con un vástago de punta cónica durante un minuto. Luego se agregaron 700 µl de *buffer* EB (Tris-HCl, pH 8 50 mM, EDTA, pH 8 10 mM, NaCl 100 mM, SDS 1 %, β-mercaptoetanol 10 mM) y se incubaron los tubos durante al menos 10 min a 65°C con agitación suave cada 3 min. Se añadieron luego 200 µl de acetato de potasio 5 M pH 5,2, se agitó incubó el tubo en hielo durante 10 min. Luego se centrifugó 5 min a 10.000 g, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se lo extrajo con 200 µl de cloroformo. Se centrifugó nuevamente 10 min a 10.000 g y se transfirió la fase acuosa superior a un nuevo tubo, donde se agregaron 550 µl de isopropanol para precipitar el ADN. Se incubó 20 min a temperatura ambiente y se centrifugó 20 min a 10.000 g. Se descartó el *pellet* y se lo lavó con 1 ml de etanol 80%. Luego se lo secó al aire y se lo resuspendió en 50 µl de *buffer* TE (Tris-HCl, pH 8 10 mM, EDTA 1 mM).

La amplificación se realizó mediante los *primers* MP3 forward (5'-ACGTTTGACCCCAACAGAAG-3') y MP3 reverse (5'-GGCTTTTGACAGATTGGCTC-3). Estos comprenden una región del ADNc de *AtMPK3* utilizada para la construcción antisentido, y se encuentran a ambos lados de un intrón en la secuencia genómica del gen. Por lo tanto, se espera que la amplificación por PCR dé dos productos de diferente tamaño en las plantas transformadas con la construcción antisentido para el gen *AtMPK3*, mientras que las plantas transformadas con el vector vacío o sin transformar deberían dar un único producto, correspondiente a la secuencia genómica. Las condiciones de reacción fueron: 1 ciclo de 2 min a 95 °C y 35 ciclos de 45 seg a 94 °C, 40 seg a 57 °C 20 seg a 72 °C. Luego se incubaron los tubos 10 min a 72 °C y finalmente a 15 °C hasta que fueron retirados del termociclador. La mezcla de reacción utilizada

consistió de *buffer* para polimerasa Taq 10 X (Invitrogen, EUA), MgCl₂ 3 mM, dNTPs 0,2 mM, 400 nM de cada *primer* y 0,625 unidades de Taq Polimerasa (Invitrogen, EUA). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µl, con 1 µl de ADN templado.

2.e) Medición de la expresión de *AtMPK3* en las plantas transgénicas

2.e.1) Aislamiento de epidermis enriquecidas en células de la guarda

Se aislaron las epidermis abaxiales de las las cuatro hojas más jóvenes totalmente desarrolladas de plantas de la misma edad que las utilizadas para los ensayos de medición de aperturas estomáticas (ver 2.f, Medición de aperturas estomáticas). Para cada extracción de ARN se utilizaron un total de 16 hojas. Se trabajó en tandas de ocho hojas, las cuales fueron separadas individualmente de la planta por medio de una tijera y adheridas a través de su superficie abaxial a una cinta adhesiva 3M 810 (Dupont, EUA). Para facilitar el trabajo, la cinta fue adherida en sus extremos por medio de una segunda cinta adhesiva en ambas caras a un vidrio esterilizado. Luego de la remoción de las nervaduras centrales y de los pecíolos, las hojas fueron raspadas con una hoja de afeitar se manera tal que sólo la epidermis abaxial permaneciese adherida a la epidermis. La cinta fue transferida inmediatamente a un tubo plástico de 15 ml con 10-12 ml de *buffer* 10/50 (ver su composición en 2.e, Medición de aperturas estomáticas) y sonicada en un sonicador Virsonic (Virtis, EUA) durante cinco segundos a una potencia de cinco, utilizando el microtip provisto con el aparato. La cinta con la epidermis fue retirada del tubo y, luego de escurrir el líquido en exceso, colocada sobre un vidrio limpio con la cara adhesiva hacia arriba. Se agregaron 150 µl de isopropanol para aflojar la capa adhesiva de la cinta. Luego, se raspó esta capa adhesiva junto con las epidermis. El material resultante tiende a agregarse y fue transferido rápidamente con una pinza a un microtubo con rosca de 2 ml (Sarstedt 72.693.005, Alemania), el cual contenía en su interior unos 200 µl de

bolitas de vidrio de 0,5 μm , previamente lavadas con ácido (Sigma G-8772-10G, EUA). Se verificó la viabilidad de las células de la guarda en las epidermis sonicadas con diacetato de fluoresceína (FDA) según se describió en Roelfsema & Prins (1995). Las epidermis adheridas a las cintas se incubaron durante cinco minutos en *buffer* 10/50 con el añadido de 5 $\mu\text{l/l}$ de una solución stock de FDA de 5 mg/ml en acetona. Luego se lavaron dos veces durante tres minutos en *buffer* 10/50. Se las observó en un microscopio de fluorescencia (filtro de excitación 450-490 nm).

2.e.2) Extracción de ARN de epidermis

Se agregaron dentro de los tubos con las epidermis aisladas según se describió en 2.e.1 y las bolitas de vidrio, 750 μl de Trizol (Invitrogen, EUA). Los tubos fueron homogeneizados tres veces en un homogeneizador Minibeadbeater-1 (Biospecs Products, EUA) a 4.600 rpm durante 30 seg, alternando con incubaciones en hielo para evitar el sobrecalentamiento de los tubos. Los pasos subsiguientes de la extracción se llevaron a cabo según las indicaciones del reactivo Trizol. Se centrifugaron los tubos a 12.000 g por 10 min a 4°C y la fase líquida se transfirió a un nuevo microtubo de 1,5 ml. La capa adhesiva de la cinta es insoluble en Trizol y flota sobre el líquido luego de la centrifugación, la cual fue repetida cuando fue necesario. Luego se agregaron 150 μl de cloroformo y se agitaron los tubos vigorosamente de forma manual. Los tubos se centrifugaron a 12.000 g por 15 min a 4°C. La fase superior (acuosa) se transfirió a un nuevo microtubo, en el cual se precipitó el ARN durante 1 h a -20°C mediante el agregado de 375 μl de isopropanol y de 5 μg de glucógeno (Invitrogen, EUA). Luego de centrifugar a 12.000 g por 20 min a 4°C, se lavó el *pellet* con etanol 75 % y se centrifugó nuevamente durante 10 min. Luego de dejarlo secar al aire se lo resuspendió en 20 μl de agua.

2.e.3) Análisis de la expresión de *AtMPK3*

La expresión de *AtMPK3* se midió por RT-PCR. Antes de realizar la reacción de transcripción reversa (RT), las muestras de ARN fueron tratadas con 1 unidad de DNAsa RQ1 (Promega, EUA) en el *buffer* provisto por el fabricante durante 30 min a 37 °C con el fin de degradar el ADN genómico. La enzima fue inactivada llevando las muestras a EGTA 10 mM y calentando durante 10 min a 65°C. La efectividad del tratamiento por DNAsa fue verificada en cada una de las muestras utilizando 1 µl de ARN tratado con DNAsa como templado para una reacción de PCR con los primers EF1 (ver la secuencia de los primers más abajo). Las condiciones de reacción fueron las mismas que se utilizaron en 2.d. Sólo se utilizaron para la RT aquellas muestras en las que no fue posible detectar producto al cabo de la reacción.

Para la RT se utilizaron los *primers* específicos EF1c reverse (que amplifica el gen *elongation factor 1 (EF1)*, utilizado como control de carga de la reacción) o MAPK3B reverse (para el gen *AtMPK3*). Ver la secuencia de los *primers* más abajo. Para hibridar los *primers* al ARN templado se incubaron 5 µl de cada muestra con 5 µl de agua, 1µl de dNTPs 10 mM y 1 µl de una solución 2 pmol/µl del *primer* correspondiente durante 10 min a 65 °C. Los tubos con las muestras fueron transferidos inmediatamente a hielo. Se les añadieron 8 µl de una mezcla que contenía 0,25 µl (50 u) de MMLV-RT (Invitrogen, EUA), 4 µl de *buffer* RT 5x provisto por el fabricante, 2 µl de ditiotritol 100 mM y 1,25 µl de agua. Las muestras fueron incubadas durante 50 min a 37 °C, posteriormente la enzima fue inactivada por calentamiento durante 15 min a 70 °C.

La cuantificación de los ADNc obtenidos en la RT se realizó mediante PCR cuantitativa con el colorante fluorescente SYBR Green I en un termociclador Opticon (MJ Research, EUA). Para amplificar el gen EF1 se utilizaron los *primers* EF1c forward (5'-AGCACGCTCTTCTTGCTTTC-3') y EF1c reverse (5'-GGGTTGTATCCGACCTTCTTC-3'), mientras que el gen *AtMPK3* se amplificó por medio de los *primers* MAPK3B forward (5'-GACAGAGTTGCTTGGCACAC-3') y MAPK3B reverse (5'-CCTCATCCAGAGGCTGTTGT-3'). El primer MAPK3B forward

hibrida una región del gen que se encuentra fuera de la utilizada para realizar la construcción antisentido. Las reacciones de PCR se realizaron por duplicado en un volumen total de 25 μ l, utilizando el 5 % del volumen de la RT (1 μ l) como templado. La mezcla de reacción contenía *buffer* Taq Polimerasa 10 X (Invitrogen, EUA), MgCl₂ 3 mM, dTNPs 0,2 mM, 400 nM de cada primer, SYBR Green I diluido 1/62.500 de un stock 10,000 x (Roche, Suiza), 5% de dimetilsulfóxido y 0,625 unidades de polimerasa Taq (Invitrogen, EUA). Los tubos se incubaron durante 2,5 min a 95 °C, seguido por 35 ciclos de 30 seg a 92 °C, 30 seg a 58 °C y 20 seg a 72 °C. Se registró la fluorescencia en cada ciclo luego de la extensión luego de una incubación durante 2 seg a 80°C. Para cuantificar la cantidad de templado en cada muestra se realizó en todos los experimentos, en paralelo con la amplificación de las muestras, una curva standard utilizando como templado de la reacción de PCR diluciones de plásmidos en los que se habían subclonado fragmentos de los genes *EF1* y *AtMPK3*. El análisis de regresión de esta curva daba usualmente un $r^2 \geq 0.97$. Los valores relativos de cantidad de templado inicial entre las distintas muestras se calcularon por interpolación en la curva standard correspondiente. Los análisis se efectuaron mediante el programa Opticon Monitor (MJ Research, EUA).

Al terminar la amplificación se realizó una curva de desnaturalización de los productos obtenidos para confirmar la existencia de un único producto de amplificación. Para ello las muestras se incubaron durante 20 seg a 60 °C y luego se realizaron sucesivos incrementos de temperatura de 0,2 °C (con incubaciones de 1 seg en cada paso) hasta llegar a 90 °C. En algunas reacciones, la presencia de un único producto de amplificación también fue chequeada por electroforesis en un gel de agarosa 1,5 %.

2.f) Medición de aperturas estomáticas

Para los experimentos de medición de apertura estomática se utilizaron hojas de plantas de 16 a 19 días de edad (no florecidas), cultivadas de como se describe en 2.a.

Las dos hojas más jóvenes totalmente expandidas de cada planta fueron cortadas con una tijera, y se las hizo flotar en el *buffer* apropiado en cajas de Petri de a pares, de forma que cada par estuviera formado por hojas provenientes de individuos diferentes. Para medir la promoción del cierre estomático por ABA en primer lugar se indujo la apertura de los estomas haciendo flotar las hojas en 10 ml de *buffer* 10/50 (MES/KOH 10 mM, pH 6,15, KCl 50 mM) con el agregado de CaCl₂ 0,05 mM durante dos horas a la luz, bajo las mismas condiciones usadas para cultivar las plantas. Al cabo de esta incubación se agregó ABA (mezcla de isómeros, Sigma) a la concentración indicada a partir de un stock 50 mM en etanol. En algunos experimentos en este punto también se agregaron los compuestos indicados en cada caso. En los experimentos donde se utilizó butirato de sodio (Sigma), éste fue añadido al medio a una concentración final 1 nM a partir de un stock 100 mM en agua. Cuando se midió el efecto del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC, Sigma), éste se agregó a las concentraciones indicadas a partir de stocks 100 x en cada caso. Estos stocks fueron preparados a partir de una solución madre 100 mM en agua. En el experimento donde se evaluó el efecto del tisuftato de sodio (STS), se reemplazó el *buffer* 10/50 por MES/KOH 10 mM (pH 6,15), KNO₃ 50 mM, ya que Merritt *et al.* (2001) describieron que es el KNO₃ reduce la toxicidad del STS para las células de la guarda. El STS se preparó como un stock 7,5 mM como se describe en Locke *et al.* (2000). En todos los experimentos de promoción de cierre por ABA, las hojas fueron incubadas durante dos horas más antes de medir las aperturas como se describe más abajo. La promoción de cierre por H₂O₂ se midió de manera similar a la descrita para el ABA, excepto que se incluyó EGTA 0,1 mM en lugar de CaCl₂ durante las primeras dos horas de incubación en 10/50. Al cabo de este período se agregó a todas las placas CaCl₂ a una concentración final de 0,2 mM, y en los casos en que se indica H₂O₂ a una concentración final de 100 µM a partir de un stock 30 % (v/v) (JT Baker).

Para los experimentos de inhibición de apertura por ABA, una vez separadas de la planta las hojas se incubaron en *buffer* 10/0 (10 mM MES/KOH pH 6,15) durante dos horas en la oscuridad (se envolvieron las placas en papel aluminio) con el fin de

promover el cierre estomático. Al cabo de esta incubación, se transfirieron las hojas a placas de Petri con *buffer* 10/50 con o sin ABA a la concentración indicada. En los experimentos en que se observó el efecto del ACC sobre la inhibición de la apertura por ABA, dicho compuesto fue agregado como se describió anteriormente. Las hojas fueron incubadas durante dos horas más, al cabo de las cuales se procedió a la medición de la apertura estomática. La inhibición de apertura por H₂O₂ se midió de manera similar, excepto que se incluyó EGTA a una concentración 0,1 mM en el *buffer* 10/0 y CaCl₂ en el *buffer* 10/50, el cual incluía, en los casos indicados, H₂O₂ a una concentración 100 μM.

Para medir la promoción de cierre por oscuridad se incubaron las hojas como de la misma manera que para la primera incubación de dos horas en los experimentos de inhibición de apertura por ABA, al cabo de las cuales se midieron las aperturas estomáticas. Para los experimentos con plantas enteras, éstas fueron incubadas dentro de cajas grandes de cartón grueso, mientras que las plantas controles se incubaron bajo las condiciones normales de cultivo.

Luego de las respectivas incubaciones, las hojas fueron retiradas del medio de incubación con la ayuda de una pinza, secadas rápidamente con papel absorbente y adheridas por su cara abaxial a cinta adhesiva transparente. En los experimentos con plantas enteras se cortaron las hojas al cabo de la incubación y fueron adheridas directamente a la cinta. Se utilizó cinta adhesiva de ambos lados, de manera que la cinta a la que se pegó la hoja se encontraba previamente adherida por su otra cara a un portaobjetos. Mediante una hoja de afeitar se raspó el cuerpo de la hoja con suavidad, de manera de dejar solamente adherida a la cinta las epidermis abaxiales de ambas hojas. Se colocó rápidamente una gota del medio de incubación sobre las epidermis y se apoyó el portaobjetos sobre un cubreobjetos, de forma que la cinta con las epidermis pegadas quedase entre ambos. Se midieron al microscopio las aperturas de 40 estomas por experimento. Debido a que la apertura de los estomas próximos entre sí tiende a ser más similar que la de estomas distantes (comportamiento "*patchy*", Mott & Buckley, 2000), éstos se midieron de a grupos de a cinco cercanos

entre sí (normalmente en el mismo campo del microscopio), para luego medir otros cinco a algunos campos del microscopio de distancia, y así sucesivamente. Se midieron un total de 20 estomas de una misma epidermis. Las mediciones se realizaron a un aumento de 400X en un microscopio Carl Zeiss, con la ayuda de un ocular 10 X con una regla micrométrica tallada sobre una de las lentes. La regla micrométrica se calibró por medio de un portaobjetos graduado, la mínima división de la regla micrométrica correspondió a 2,4 μM para el ocular 40X utilizado. Los experimentos se realizaron al menos por triplicado y los datos se presentan como el promedio de al menos 120 mediciones. Sólo se midieron aperturas de estomas de aspecto simétrico y de al menos 7 μm (medidos sobre el eje longitudinal). La apertura se midió entre los labios externos del poro estomático.

3. Resultados

3.a) Generación y análisis de plantas antisentido para *AtMPK3*

3.a.1) Preparación de la construcción antisentido para *AtMPK3* y transformación de *A. thaliana*

Con el fin de averiguar la posible función de la MAPK *AtMPK3* en el control de los movimientos estomáticos, se decidió inhibir su expresión específicamente en células de la guarda de *A. thaliana*. Se optó por una estrategia tejido específica (y no por una inhibición en toda la planta) para evitar los posibles efectos que indirectamente pudiera tener la inhibición de los genes en el resto de la planta sobre el comportamiento de los estomas. Como se discutió en la introducción, al momento de la escritura de la tesis no se reportaron mutantes de inserción en el gen *AtMPK3*, por otra parte Menke *et al.* (2004) reportaron que no les fue posible hallar mutantes de inserción para este gen ni tampoco inhibir la expresión de *AtMPK3* mediante la técnica de ARN de interferencia (utilizando un promotor expresado en toda la planta). Por lo tanto, es posible que *AtMPK3* cumpla un rol esencial en el desarrollo de la planta, razón por la cual es conveniente inhibir su expresión sólo en el tejido en cual se desea estudiar su función. Con el fin de obtener la inhibición de este gen solamente en células de la guarda, decidimos utilizar una delección de 642 pb del promotor *kst1* que confiere expresión restringida exclusivamente a células de la guarda del gen indicador β -glucuronidasa (Plesch *et al.*, 2001). Este promotor fue gentilmente cedido por Bernd Muller-Rober (Instituto Max Planck, Alemania), dentro del vector binario BinK (ver Materiales y métodos).

Dado que las distintas MAPKs de *A. thaliana* pertenecen a una familia génica cuyos integrantes presentan una alta similitud de secuencia entre sí, al hacer una construcción antisentido contra uno de los genes codificantes se corre el riesgo de inhibir también la expresión de otros genes. Para evitar este tipo de problema,

llevamos a cabo un alineamiento de secuencias de los ADNc de todas las MAPKs de *A. thaliana* (resultado no mostrado). El alineamiento reveló que la región central de los ADNc está altamente conservada entre los distintos genes, mientras que hacia los extremos de las regiones codificantes, especialmente en las regiones próximas a los codones *stop*, la similitud de entre las secuencias es bastante menor. En esta región se encuentra el dominio CD, involucrado en la interacción con otras proteínas (ver Introducción), por lo que *a priori* era esperable que en esta zona existiesen diferencias entre las secuencias de los distintos genes. Por lo tanto decidimos utilizar fragmentos correspondientes a las zona 3' de las regiones codificantes del ADNc de *AtMPK3* para realizar la construcción antisentido.

Para la construcción antisentido se utilizó un fragmento obtenido mediante las enzimas de restricción Hae III y SfcI de 422 pb, correspondiente a la región 3' del ADNc. Este fragmento fue subclonado en los sitios compatibles SalI y SmaI presentes el sitio de clonado múltiple del vector binario BinK, en orientación antisentido con respecto al promotor *kst1*. El plásmido resultante (ver figura 4), luego de ser chequeado por secuenciación, fue introducido en la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* cepa c58c1 por conjugación triparental. Las bacterias transformadas fueron utilizadas para transformar plantas de *A. thaliana* ecotipo Columbia por el método de infiltración floral. El T-DNA, que en este caso contiene el transgén de interés y el gen selector *nptII*, es introducido por *A. tumefaciens* en el genoma de los óvulos que se encuentran dentro de las flores, de donde se originarán posteriormente los embriones (Clough & Bent, 1998).

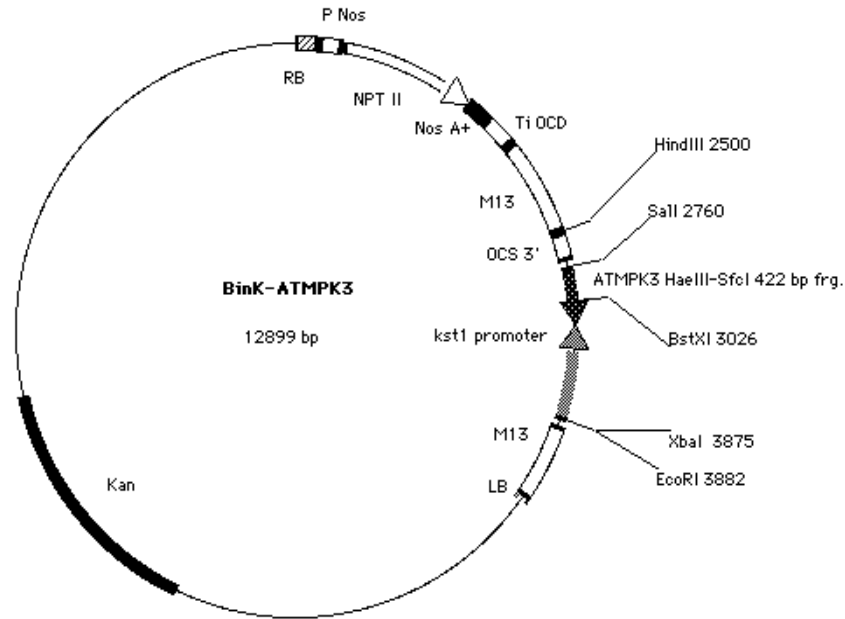


Figura 4. Vector binario BinK-ATMPK3 utilizado para inhibir la expresión del gen *AtMPK3* en *A. thaliana*. Para construir este vector se subclonó un fragmento del ADNc del gen *AtMPK3* en el sitio de clonado múltiple del vector BinK, en orientación antisentido con respecto al promotor *kst1*.

Las semillas transformadas T0 fueron seleccionadas en medio MS agar con kanamicina. Se esperaba que las plántulas transformadas (resistentes al antibiótico) fuesen todas heterocigotas para la(las) inserción(es) del transgén. Estas plántulas fueron transferidas a vasos con sustrato y cultivadas hasta la producción de semillas, las cuales, al ser producto de la autofecundación de las plantas T1 heterocigotas, deberían ser una mezcla de homocigotas, heterocigotas y *wt* para cada *locus* de inserción del T-DNA. Dado que éste contiene el gen selector *nptII* que confiere resistencia a kanamicina, es posible estimar estadísticamente el número de *loci* donde se inserto el T- DNA a través del análisis de la proporción de semillas T2 resistentes a kanamicina mediante el test de bondad de ajuste χ^2 (Chi cuadrado). En la tabla 1 se observan los resultados de dicho análisis para algunas de las líneas transformadas con las construcciones BinK-ATMPK3. La mayor parte de las líneas presenta un número de inserciones más probable igual a 1. Algunas de las plántulas resistentes a kanamicina germinadas a partir semillas T2 fueron cultivadas hasta producir semillas (generación

T3). Parte de las semillas producidas por cada planta fueron testeadas para determinar la resistencia a kanamicina. Aquellos lotes que presentaban 100 % de semillas resistentes al antibiótico (y que por lo tanto eran homocigotas para al menos uno de los *loci* donde se insertó el T-DNA) fueron utilizados para el análisis fenotípico posterior.

	Sensibilidad estomática al ABA	Sensibles a kanamicina	Total	χ^2 1 ins	χ^2 2 ins	Nro. más probable de <i>loci</i>
3LA	N	3	35	8,97	0,32	2
3LB (AS3a)	R	11	42	0,02	28,50	1
3LD	N	8	38	0,26	14,21	1
3LE	N	ND	ND	-	-	ND
3-1 (AS3b)	R	4	16	0,00	9,60	1
3-2	R	4	16	0,00	9,60	1
3-3	N	3	38	11,40	0,18	2
3-5 (AS3c)	R	6	31	0,46	9,09	1
3-7	R	4	21	0,35	5,87	1

Tabla 1. Segregación de la resistencia a kanamicina y sensibilidad estomática al ABA de ocho líneas transformadas con la construcción BinK-ATMPK3. Ensayo de inhibición de la apertura estomática por ABA: N = sensibilidad normal, R: sensibilidad reducida. Análisis de segregación de la resistencia a kanamicina en plantas de la generación T2. Se muestra el total de plantas analizadas en cada ensayo y la cantidad de sensibles al antibiótico en cada caso. Se calcularon los valores del estadístico χ^2 para una y dos inserciones y en base a esos datos se calculó el número de *loci* más probable en los que se insertó el T-DNA. Para un grado de libertad, los valores críticos de χ^2 son 0,016 para p=0,9 y 0.455 para p=0,5.

3.a.2) Métodos de medición de la apertura estomática

La conductividad estomática puede medirse sin separar las hojas de las plantas a través de la detección del intercambio de gases, usualmente a través de un análisis espectrofotométrico (Dodd, 2003). Sin embargo, cuando se desea analizar el efecto de

compuestos químicos solubles en medio acuoso (como es el caso de la mayoría de los reguladores del crecimiento vegetales) sobre la apertura estomática, resulta conveniente incubar epidermis aisladas u hojas aisladas de la planta en una solución con el compuesto de interés, para luego medir las aperturas estomáticas al microscopio. Para realizar este tipo de ensayos es conveniente uniformar la apertura de los estomas antes de aplicar el tratamiento. Esto se logra promoviendo su apertura o su cierre de manera tal de maximizar o minimizar respectivamente la apertura estomática. La promoción de la apertura se logra mediante la incubación de las epidermis u hojas en un *buffer* con alta concentración de KCl, en presencia de luz. El cierre, en cambio, se induce a través de la incubación en un *buffer* con una muy baja concentración de sales y en oscuridad. Luego de haber promovido la apertura o el cierre estomático, se aplica el tratamiento que se desea estudiar y se incuban las epidermis u hojas aisladas bajo condiciones en las que, de no ser por el tratamiento aplicado, los estomas tenderían a abrirse o a mantenerse abiertos (*i.e.* bajo luz y con alta concentración de KCl). En la figura 5 se esquematiza la realización de experimentos de promoción de cierre y de inhibición de apertura estomática.

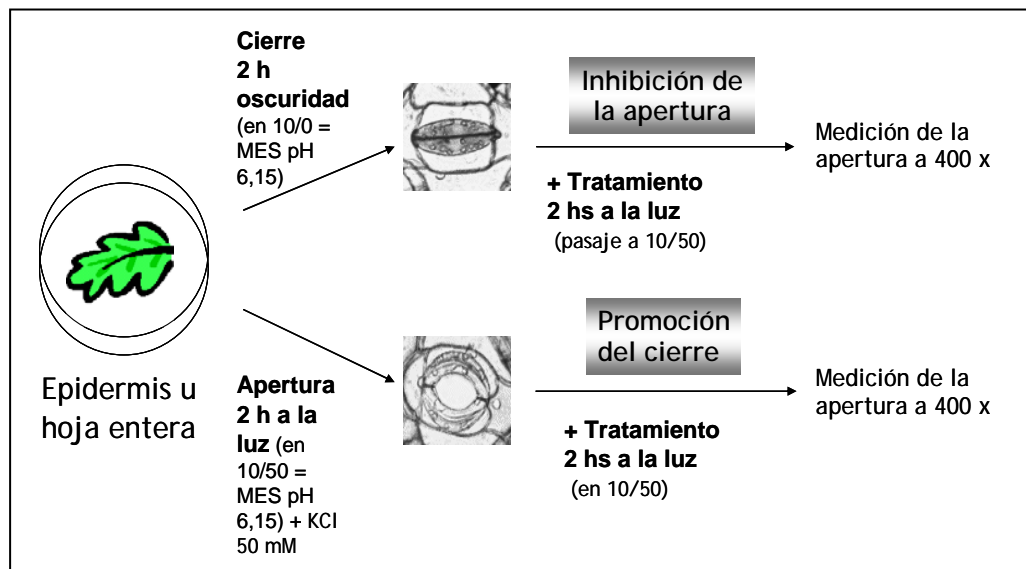


Figura 5. Esquema de los experimentos de medición de inhibición de apertura y de promoción del cierre estomático. Ver la explicación en el texto y en Materiales y métodos.

3.a.3) Análisis preliminar del comportamiento estomático de las plantas transformadas

Se realizó un análisis preliminar de las plantas transformadas con la construcción antisentido para AtMPK3. Para ello se utilizaron individuos homocigotas para al menos una inserción del T-DNA de nueve líneas distintas. Se determinó la capacidad del ABA de inhibir la apertura estomática inducida por la luz. Los individuos pertenecientes a cinco de las líneas analizadas mostraron una disminución en la respuesta a la hormona por comparación con las plantas no transformadas (ver tabla 1). La proporción de líneas que presentaron sensibilidad reducida al ABA es aproximadamente la misma que se encontró al analizar líneas de *A. thaliana* transformadas con el gen de la β -glucuronidasa bajo el control del mismo promotor utilizado en este trabajo (Plesch *et al.*, 2001). Un análisis similar de tres líneas transformadas con el vector BinK vacío mostró en cambio que estas respondían normalmente al ABA (resultados no mostrados).

Se eligieron las líneas antisentido para AtMPK3 3B, 3-1 y 3-5 (llamadas de aquí en más AS3a, AS3b y AS3c respectivamente) para su posterior caracterización. Estas líneas, que tienen con mayor probabilidad un solo *locus* de inserción del transgén, presentaron una sensibilidad disminuida al ABA en los ensayos preliminares (Tabla 1). Además, se eligió una de las líneas transformadas con el vector vacío (llamada de aquí en más BK) para utilizar como control en los experimentos posteriores.

3.a.4) Análisis de la presencia del transgén en el genoma de las líneas transformadas con la construcción antisentido para AtMPK3

La inserción del transgén en el genoma de las líneas AS3a, AS3b y AS3c fue confirmada a través de reacciones de PCR. Para llevar a cabo las reacciones se utilizaron como templado muestras de ADN genómico de las distintas líneas y de las plantas controles. Los *primers* utilizados amplifican una zona del fragmento de ADNc

del gen *AtMPK3* utilizado para hacer la construcción antisentido. Dichos *primers* comprenden un intrón presente en el gen *AtMPK3*, de manera que éste da un producto de amplificación de mayor tamaño que el originado a partir del ADNc presente en el T-DNA (Figura 6). Como se espera, este último producto tiene el mismo tamaño que el amplificado a partir del vector binario utilizado para llevar a cabo la transformación.

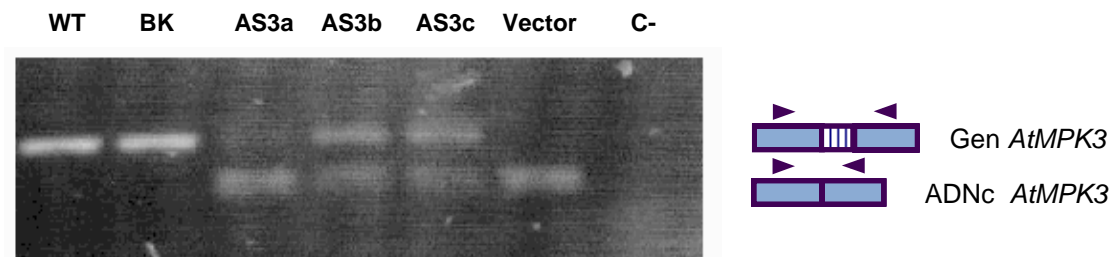


Figura 6. Detección por PCR del transgén antisentido para *AtMPK3* en ADN genómico de las líneas AS3a, AS3b y AS3c, en *A. thaliana wt* (WT) y en una línea transformada con el vector BinK sin inserto (BK). Vector: ADN plasmídico utilizado para transformar las plantas. C-: control con agua. La amplificación se realizó con los primers MP3 *forward* y *reverse*. La banda de mayor peso molecular corresponde al gen *AtMPK3* e incluye un intrón. La banda de menor peso molecular corresponde al ADNc de *AtMPK3* y sólo está presente en las líneas transformadas con la construcción antisentido. Los esquemas a la derecha de la foto muestran la ubicación de los primers (flechas) en cada caso, el área con barras verticales representa el intrón.

3.a.5) Análisis de la expresión de *AtMPK3* en las plantas transformadas

Al utilizar un promotor de expresión restringida a células de la guarda para expresar la construcción antisentido, se hace necesario aislar estas células de otros tipos celulares para confirmar que la presencia del transgén realmente cause la reducción esperada en la expresión del gen blanco. Un estudio preliminar de la expresión de *AtMPK3* realizado por *Northern blot* con ARN extraído de hojas enteras en dos de las líneas con la construcción antisentido reveló una expresión similar a las de las plantas sin transformar (resultados no mostrados), lo cual muestra que la construcción no causó el silenciamiento del gen en toda la planta en esas líneas.

Realizamos una búsqueda bibliográfica sobre la manera de medir la expresión génica en células de la guarda. En los relativamente escasos trabajos de este tipo realizados en *A. thaliana*, generalmente se utilizan protoplastos de células de la guarda

como fuente de partida para la extracción de ARN (*e.g.* Leonhardt *et al.*, 2004; Pandey *et al.*, 2004). En otras especies se suelen usar epidermis como fuente de ARN de células de la guarda, ya que suelen ser fáciles de aislar y se considera que el resto de las células epidérmicas son metabólicamente poco activas y además se dañan durante el proceso de aislamiento. En *A. thaliana* también se reportó el aislamiento de ARN a partir de epidermis, obtenidas por disrupción mecánica con una licuadora dado el diminuto tamaño de las hojas de esta especie (Hugouvieux *et al.*, 2001). Sin embargo, en *A. thaliana* este procedimiento suele dar epidermis contaminadas con células de mesófilo (observaciones personales y de Alex Webb, Universidad de Cambridge, Gran Bretaña) por lo que es poco utilizado.

En consecuencia para este trabajo decidimos no usar ninguno de estos dos procedimientos previamente descritos. En el caso de la obtención de epidermis por disrupción mecánica fue debido a los motivos ya mencionados, mientras que en el caso de los protoplastos fue debido tanto a inconvenientes prácticos para realizar la técnica en el laboratorio como al hecho de que su preparación es relativamente larga (cerca de un día), lo cual puede introducir cambios en la expresión génica (Leonhardt *et al.*, 2004). En este trabajo los autores reportaron la síntesis de ARNm inducibles por estrés durante proceso el aislamiento de protoplastos de células de la guarda, fenómeno que pudo ser contrarrestado mediante el uso de inhibidores de la transcripción. El promotor utilizado para realizar la construcción antisentido se regula negativamente ante situaciones de estrés (B. Muller Rober, comunicación personal), por lo que existiría la posibilidad de que el efecto inhibitorio del transgén sobre la expresión de *AtMPK3* se viera atenuado durante el aislamiento de protoplastos.

Por lo tanto decidimos desarrollar un procedimiento para aislar epidermis de *A. thaliana* que fuese rápido y que permitiese obtener epidermis de alta pureza. Para ello partimos de un procedimiento de aislamiento de epidermis basado en el método utilizado para los ensayos de apertura estomática (ver Materiales y métodos), descrito por Webb & Hetherington (1997). Este método se basa en la adhesión de las epidermis a un soporte sólido -una cinta adhesiva- para poder eliminar el resto del

tejido de la hoja mediante una hoja de afeitar. Mediante este procedimiento se obtienen epidermis de pureza suficiente para la observación de la apertura de los estomas al microscopio, sin bien es común observar contaminación con algunas células de mesófilo. Para aumentar la pureza de las epidermis se probaron distintas marcas de cintas adhesivas para adherir las epidermis, hasta que se encontró que la 3M 810 (Dupont, EUA) permite obtener epidermis virtualmente libres de células de mesófilo. La observación al microscopio de las epidermis obtenidas por medio de esta cinta, si bien mostraba la ausencia de células de mesófilo, revelaba la presencia de numerosos residuos de tejidos producto del raspado de la hoja. Se procedió entonces a sonicar las epidermis para limpiarlas, ya que este procedimiento había sido utilizado previamente con este fin (Kinoshita *et al.*, 2001; Hugouvieux *et al.*, 2001). Si se la aplica durante suficiente tiempo la sonicación produce la lisis celular, por lo que se probaron distintos tiempos y luego se midió la viabilidad de las células de la guarda mediante el colorante vital diacetato de fluoresceína (FDA) (Roelfsema & Prins, 1995). Se halló un tiempo óptimo de sonicación de 6 seg para las condiciones utilizadas (tabla 2). Mayores tiempos de sonicación, si bien daban epidermis limpias, producían una marcada disminución en la viabilidad de las células de la guarda.

	0 seg.	3 seg.	6 seg.	12 seg.
Viabilidad	+++	+++	+++	-
Pureza	+	++	+++	+++

Tabla 2. Puesta a punto del tiempo de sonicación requerido para remover restos de tejidos de las epidermis obtenidas por cinta adhesiva. Las epidermis obtenidas mediante la fijación a una cinta adhesiva, fueron sometidas a una breve sonicación durante 0, 3, 6 y 12 segundos. Para evaluar la viabilidad de las epidermis luego de la sonicación, se las tiñó con el colorante vital FDA según se describe en Materiales y métodos. La cantidad de cruces indica el grado de pureza de la epidermis (evaluado visualmente) o de la viabilidad de las células de la guarda (determinada a partir de la incorporación de FDA). - indica la ausencia de células viables.

En la figura 7 se observan epidermis teñidas con FDA donde se aprecia que las células epidérmicas distintas de las células de la guarda no toman el colorante. Las únicas células aparte de las de la guarda que conservan la viabilidad luego del aislamiento de las epidermis y sonicación son los tricomas en el borde de las hojas, pero éstos se hallan en muy baja proporción (no se observan en la figura 7), por lo tanto más del 99% de las células viables en las preparaciones corresponden a células de la guarda.

Si bien se logró el objetivo de obtener epidermis altamente puras mediante un procedimiento veloz, restaba todavía saber si era posible aislar ARN de las epidermis adheridas a una capa de cinta adhesiva varias veces más gruesa que las epidermis. Se realizaron extracciones de ARN de grupos de 8 o 16 epidermis mediante el método del reactivo comercial Trizol (Promega, EUA, ver Materiales y métodos). En los primeros ensayos la disrupción del tejido adherido a la cinta se realizó mecánicamente en un mortero en presencia de nitrógeno líquido y de unas gotas de cloroformo para disolver la cinta adhesiva. Esta resultó al menos en su mayor parte insoluble en el Trizol por lo que se la pudo separar fácilmente en el primer paso de centrifugación. El ARN extraído se utilizó para ensayos de RT-PCR. Estos permitieron la detección de los ARNm de los genes *AtMPK3* y del factor de elongación *EF1* en las epidermis, aunque en cantidades muy bajas (a alto número de ciclos de la reacción de PCR, resultados no mostrados). El uso de *primers* que comprenden *intrones* para ambos genes permitió descartar la posibilidad de detectar ADN genómico en vez de los ADNc. Con el fin de investigar la posibilidad de que la cinta adhesiva interfiriese ya sea con la extracción de ARN, con la transcripción reversa o con la reacción de PCR, se aisló ARN de hojas enteras adheridas o no a cinta adhesiva. En ambos casos se cuantificaron por RT-PCR cantidades similares de ARN (y mucho mayores que el caso de las epidermis), por lo que descartamos la posibilidad de que la cinta interfiriese químicamente con los procedimientos de aislamiento y cuantificación del ARN.

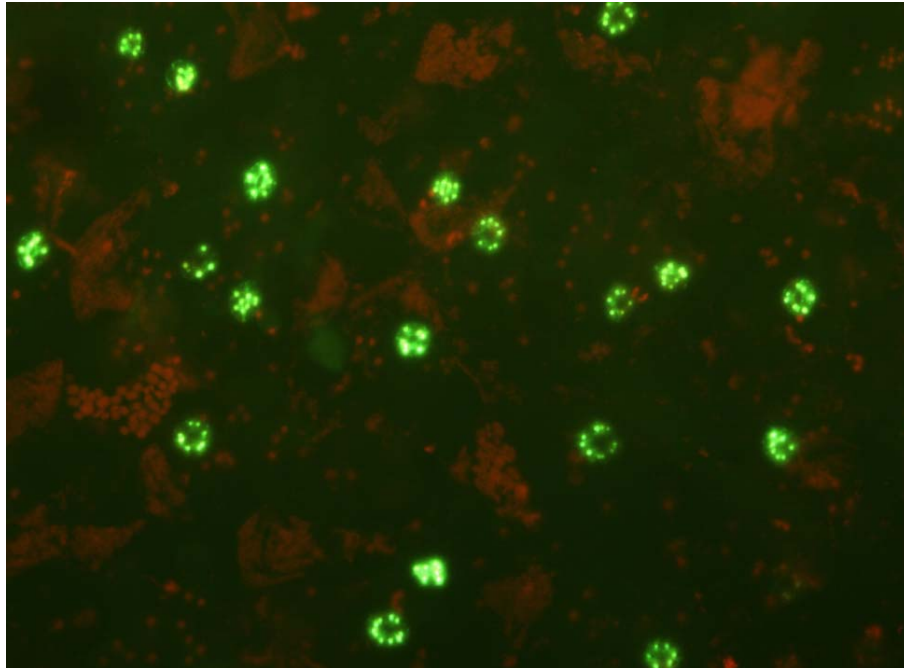


Figura 7. Epidermis de *A. thaliana* teñidas con el colorante vital FDA. Las células de la guarda se tiñen de verde, lo cual muestra su viabilidad. La fluorescencia roja se origina en la clorofila de otras células epidérmicas que no toman FDA. Aumento: 200x.

Por lo tanto inferimos que el bajo rendimiento de las extracciones de ARN se debía seguramente a una disrupción ineficiente de las células de la guarda, situación que probablemente fuese empeorada por la presencia de la cinta adhesiva. Identificamos por lo tanto dos causas que podrían contribuir a una baja eficiencia en la extracción: la gruesa pared de las células de la guarda y la presencia de la cinta adhesiva, varias veces más voluminosa que las epidermis. Decidimos entonces probar un método de disrupción más energético, por agitación en presencia de bolitas de vidrio de 0,5 μM . El choque con las bolitas rompe las paredes celulares de manera muy eficiente. También intentamos reducir el volumen de cinta adhesiva presente durante la lisis celular. Hallamos una referencia bibliográfica sobre métodos para remover cintas adhesivas para la conservación de documentos antiguos (Smith *et al.*, 1984). En este trabajo se describe que este tipo de cinta consta de una capa rígida de soporte (que contribuye a la mayor parte de la masa de la cinta), una capa adhesiva, y una delgada capa intermedia que mantiene unidas a las otras entre sí. En el caso de la

cinta utilizada por nosotros, la capa adhesiva esta hecha de un polímero acrílico, mientras que el soporte es de acetato de celulosa (Smith *et al.*, 1984). En el citado trabajo describen una serie de solventes que pueden ser utilizados para disolver la capa adhesiva de las cintas. Esto nos hizo pensar en la posibilidad de separar la capa adhesiva de la de soporte de la cinta, más voluminosa. Procedimos a tratar las cintas con distintos solventes para luego raspar la capa adhesiva con una hoja de afeitar y así separarla de la relativamente gruesa capa de soporte.

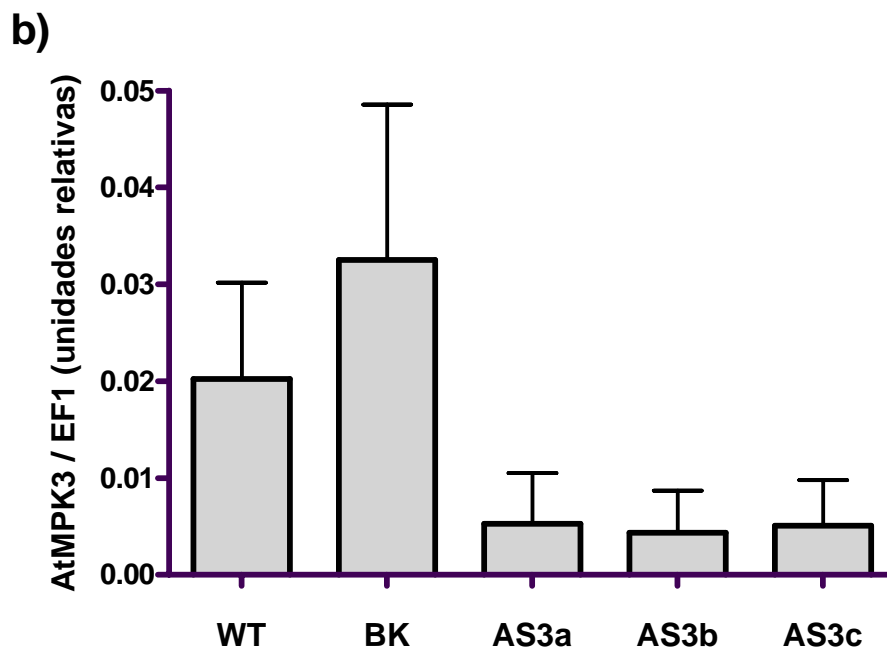


Figura 8. Análisis por RT-PCR en tiempo real de la expresión del AtMPK3 relativa a EF1. AS3a, AS3b y AS3c: líneas que expresan la construcción antisentido para AtMPK3; WT: *A. thaliana wt*; BK: línea transformada con el vector BinK sin inserto. Las barras indican el error estandar (n=2).

Hallamos que el solvente isopropanol dio muy buenos resultados ya que el raspado de la cinta con una hoja de afeitar permitía remover fácilmente la capa adherente, la cual se recuperaba como masa compacta y fácil de manipular. Por otra parte, este solvente se usa normalmente durante el proceso de extracción de ARN por lo que no debería afectar el proceso de extracción. Al raspar mediante este procedimiento cintas esta vez con las epidermis adheridas, logramos remover la capa

adhesiva junto con las epidermis, dejando atrás la capa de soporte de la cinta. El material resultante fue transferido a un tubo con las bolitas de vidrio y Trizol donde se procedió a disgregarlo por agitación mecánica para luego seguir el procedimiento usual de extracción de ARN con Trizol. Las mejoras obtenidas por tanto por el uso del método de disrupción más energético como por la reducción en el volumen de cinta causaron un incremento importante en el rendimiento de las extracciones de ARN y permitieron medir de manera reproducible la expresión de *AtMPK3* en epidermis altamente enriquecidas en células de la guarda. La cuantificación del rendimiento se llevó a cabo por PCR en tiempo real, utilizando el procedimiento descrito en Materiales y métodos. Bajo las condiciones descritas, se obtenía normalmente en las reacciones de PCR en tiempo real ciclos de umbral de fluorescencia (*Ct*, o *threshold cycle*) de aproximadamente 22 para el gen *EF1* y de 28 para *AtMPK3* (resultados no mostrados).

La cuantificación de la expresión de *AtMPK3* en las epidermis enriquecidas en células de la guarda mostró que en las tres líneas seleccionadas que expresan la construcción antisentido la expresión de dicho gen está reducida en relación con las plantas controles (figura 8). Ello indica que la construcción introducida en las plantas causa el efecto esperado, es decir la reducción de la expresión de *AtMPK3* en células de la guarda.

3.b) Análisis de la respuesta estomática de las plantas antisentido para *AtMPK3*

3.b.1) Efecto del ABA

A continuación estudiamos en detalle la respuesta estomática al ABA de las tres líneas con *AtMPK3* silenciado previamente seleccionadas. La hormona, utilizada a una concentración de 20 μM , inhibió la apertura estomática inducida por la luz en las plantas antisentido en una menor medida que en las plantas controles, de acuerdo con el análisis preliminar (figura 9a). Este resultado apoya la hipótesis de que la MAPK *AtMPK3* participa en la transducción de señales del ABA. Dado que la reducción en la sensibilidad al ABA fue parcial, posiblemente existan otras vías capaces de transducir su señal. Una segunda posibilidad para explicar este fenómeno sería que el efecto de la construcción antisentido sobre la expresión del *AtMPK3* fuese sólo parcial. Para estudiar la inhibición de la apertura estomática por ABA a distintas concentraciones de la hormona, se realizó una curva dosis-respuesta con plantas de la línea AS3a. Este experimento mostró que la sensibilidad al ABA se encuentra disminuída en las plantas con *AtMPK3* silenciado a diferentes concentraciones de la hormona (figura 10).

La promoción del cierre estomático por ABA en las plantas silenciadas fue en cambio similar a de las plantas control (figura 9b). Estos resultados parecen indicar que *AtMPK3* no estaría involucrada en la promoción del cierre estomático por ABA, o bien que otras vías serían capaces de compensar su ausencia específicamente en la promoción del cierre. Muchas de las mutantes de *A. thaliana* con alteraciones de la respuesta estomática al ABA presentan alteraciones tanto en la inhibición de la apertura como en la promoción del cierre estomático. Sin embargo, existen dos casos descritos en los que el bloqueo de la expresión de un gen produce un fenotipo similar al observado en las plantas antisentido para *AtMPK3*, *i.e.* una disminución en la respuesta al ABA en inhibición de la apertura mientras promoción de cierre es normal. Se trata del silenciamiento del gen de las fosfolipasa C en tabaco (Hunt *et al.*, 2003) y

de la mutación por inserción de T-DNA del gen *gpa1* de *A. thaliana*, que codifica la subunidad α de la proteína G (Wang *et al.*, 2001).

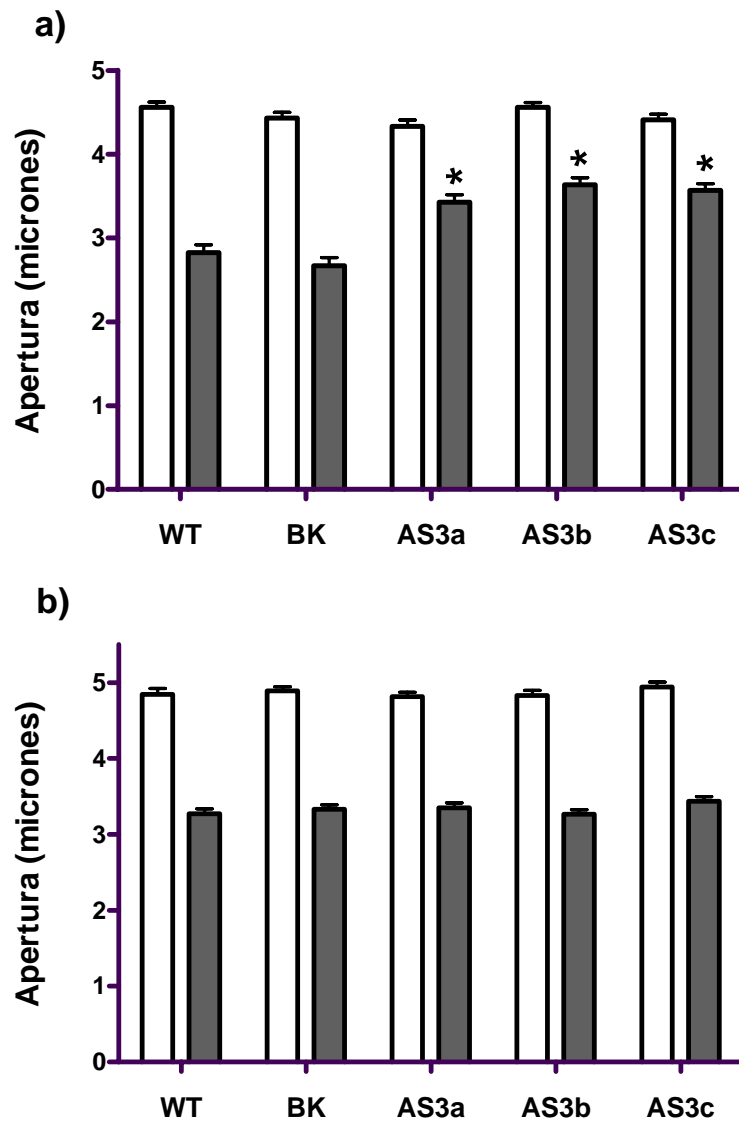


Figura 9. Las plantas antisentido para *AtMPK3* presentan sensibilidad reducida al ABA en la inhibición de la apertura estomática, pero responden normalmente a la hormona en la promoción del cierre. a) Inhibición de la apertura estomática y b) promoción del cierre estomático por ABA 20 μ M (barras grises) o controles sin tratar (barras blancas). WT: *A. thaliana wt*, BK: control con vector vacío, AS3a, AS3b y AS3c: líneas antisentido para *AtMPK3*. Las barras de error representan el error estándar de tres ensayos independientes, n=40 por ensayo. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control *wt* tratado con ABA al aplicar el test de Student ($p < 0,01$).

En este último trabajo los autores realizaron estudios electrofisiológicos sobre

las mutantes que revelaron que éstas tienen afectada la inhibición por ABA de los canales de entrada de potasio (K^{+in}) y la activación por la misma hormona de los canales de salida de aniones. Este último fenómeno tiene un rol importante para que ocurra el cierre estomático en respuesta a la hormona, ya que la entrada de aniones produce la despolarización de la membrana plasmática, que a su vez bloquea la entrada de potasio (ver Introducción). Por lo tanto resultó sorprendente que las mutantes no tuviesen afectado el cierre estomático en respuesta al ABA a pesar de tener afectadas las corrientes de entrada de aniones.

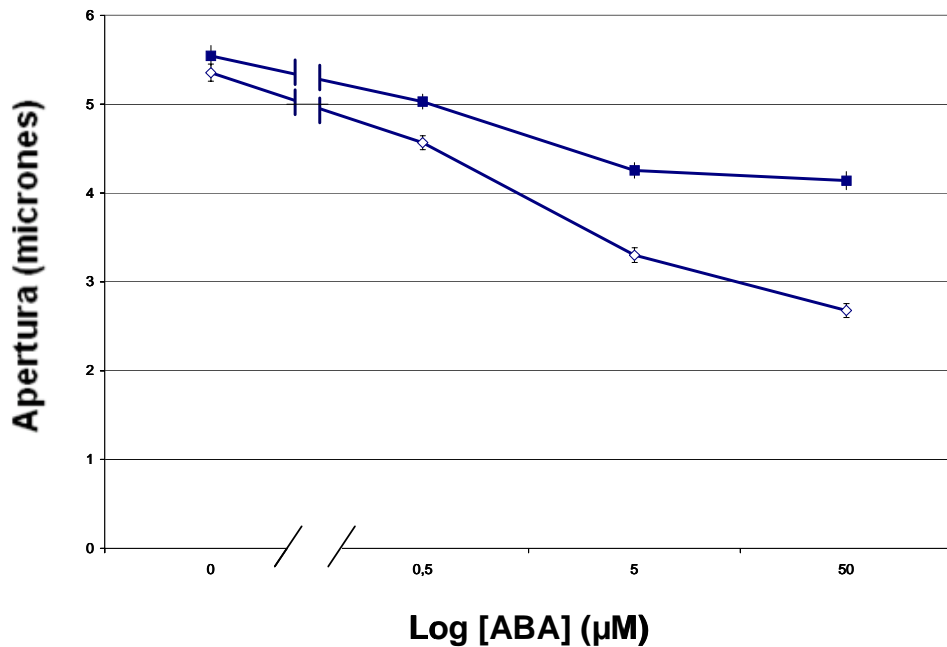


Figura 10. Curva dosis-respuesta de la inhibición de apertura estomática por ABA de una de una línea antisentido para AtMPK3. Línea AS3a (rombos vacíos), *wt* (cuadrados llenos). Las barras de error representan el error estándar de tres ensayos independientes, $n=40$ por ensayo.

Dado que previamente se había descrito que el ABA produce una alcalinización del citosol (Irving *et al.*, 1992) que estimula la salida de potasio a través de canales K^{+out} (Blatt & Armstrong, 1993), los autores se preguntaron si el *buffer* fuerte utilizado dentro del electrodo en los experimentos electrofisiológicos impediría el aumento de pH inducido por el ABA, lo cual podría impedir el efecto de esta

hormona sobre las corrientes aniónicas. Al disminuir la cantidad de *buffer* durante la medición de las corrientes, y permitir así que ocurriese la alcalinización del citosol en respuesta al ABA, los autores observaron que en las mutantes *gpa1* esta hormona induce corrientes aniónicas de manera similar a las plantas *wt*. Para averiguar si esta observación electrofisiológica tenía un correlato con los movimientos estomáticos, los autores realizaron ensayos de apertura estomática en los que bloquearon la alcalinización del citosol inducida por ABA mediante el ácido débil butirato, el cual es capaz de permear a través de la membrana plasmática. Bajo estas condiciones, las mutantes *gpa1* mostraron una pequeña pero estadísticamente significativa disminución en la promoción de cierre inducida por ABA (figura 11). Estos experimentos muestran que, en el caso de la proteína GPA1, la alcalinización del citoplasma inducida por ABA es capaz de compensar al menos en parte su función, y permite por lo tanto el cierre estomático normal en ausencia de su gen.

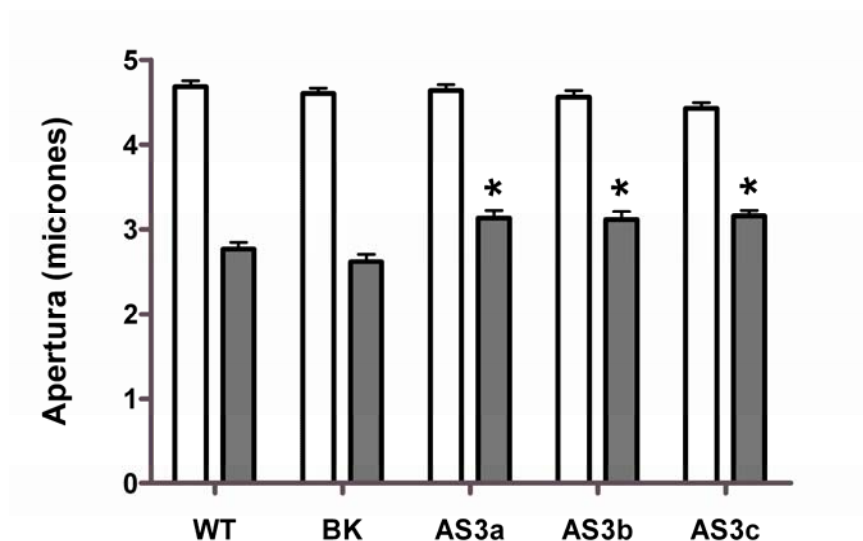


Figura 11. La fijación del pH citosólico mediante butirato de sodio 1 mM reduce la sensibilidad estomática en la promoción de cierre por ABA de las plantas antisentido para *AtMPK3*. Promoción del cierre estomático por ABA 20 μM (barras grises) o controles sin tratar (barras blancas). WT: *A. thaliana wt*, BK: control con vector vacío, AS3a, AS3b y AS3c: líneas antisentido para *AtMPK3*. Las barras de error representan el error estándar de tres ensayos independientes, n=40 por ensayo. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control *wt* tratado con ABA al aplicar el test de Student ($p < 0,01$).

Nos preguntamos entonces si podría ocurrir un fenómeno similar en las plantas con el gen *AtMPK3* silenciado. Al medir la promoción del cierre estomático en las plantas con *AtMPK3* silenciado en presencia de butirato de sodio 1 mM hallamos que, de manera similar a lo que ocurre en las mutantes *gpa1*, existe una pequeña pero significativa reducción en la respuesta a la hormona en comparación con las plantas *wt*. Este resultado muestra que la alcalinización del citoplasma es capaz de compensar parcialmente la reducción en la expresión del gen *AtMPK3*, y da evidencia de que *AtMPK3* y *GPA1* podrían ser componentes de una misma vía de señalización.

3.b.2) Efecto del H₂O₂

Dado que se describió previamente que la actividad de *AtMPK3* induce por H₂O₂ (Kovtun *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2002), y que por otro lado esta molécula causa el cierre estomático y está involucrada en la transducción de señales del ABA (ver Introducción), decidimos investigar la respuesta estomática de las plantas con el gen *AtMPK3* silenciado a este compuesto. Los ensayos realizados muestran que estas plantas tienen afectada la respuesta al H₂O₂ tanto en la promoción del cierre (figura 12a) como en la inhibición de la apertura estomática (figura 12b). Estos resultados muestran que *AtMPK3* es necesaria para la señalización de los movimientos estomáticos inducidos por H₂O₂ y que, a diferencia de lo que sucede en la respuesta al ABA, el rol de esta MAPK no puede ser compensado por otros componentes de señalización. Por otra parte, estos resultados son consistentes con la hipótesis de que *AtMPK3* podría participar en la transducción de señales río abajo del H₂O₂ generado por el ABA.

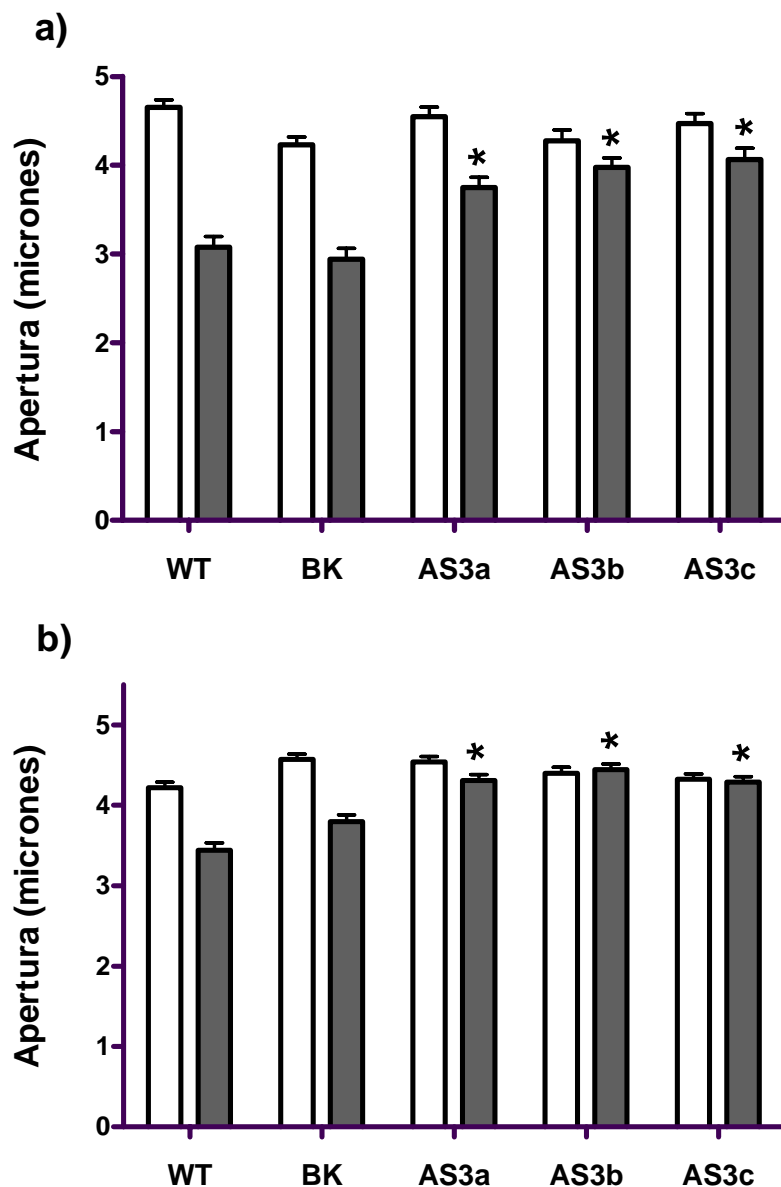


Figura 12. Las plantas antisentido para *AtMPK3* presentan sensibilidad reducida al H₂O₂ tanto en la inhibición de la apertura como en la promoción del estomático. a) Inhibición de la apertura estomática y b) promoción del cierre estomático por H₂O₂ 100 μM (barras grises) o controles sin tratar (barras blancas). WT: *A. thaliana wt*, BK: control con vector vacío, AS3a, AS3b y AS3c: líneas antisentido para *AtMPK3*. Las barras de error representan el error estándar de tres ensayos independientes, n=40 por ensayo. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control *wt* tratado con H₂O₂ al aplicar el test de Student (p<0,01).

3.b.3) Efecto de la oscuridad

Recientemente dos publicaciones mostraron que el H₂O₂ cumple un rol

importante en la señalización del cierre estomático inducido por oscuridad (Desikan *et al.*, 2004b; She *et al.*, 2004). Por lo tanto se investigó si las plantas con *AtMPK3* silenciado tenían afectada la respuesta a la oscuridad. Más allá de la respuesta a la oscuridad en sí, averiguar esta información sería importante para validar los experimentos de inhibición de apertura estomática por ABA, ya que en este tipo de experimentos se utiliza la oscuridad para promover el cierre estomático previo a la aplicación de los compuestos.

Se incubaron hojas en *buffer* 10/0 durante dos horas en la oscuridad, tal como se hizo para los experimentos de inhibición de apertura, y se procedió a medir la apertura estomática. Como se observa en la figura 13a, los estomas de las plantas antisentido se cerraron levemente menos que lo de las plantas control, sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa. La diferencia entre las plantas silenciadas y las *wt* fue en promedio 0,2 μM , unas cuatro veces menor que en los experimentos de inhibición de apertura, y por lo tanto no es la causante de la mayor parte de la diferencia en respuesta al ABA y al H_2O_2 entre las plantas silenciadas en *AtMPK3* y las controles en dichos experimentos.

Dado que observamos una pequeña, si bien estadísticamente no significativa, diferencia en la respuesta a la oscuridad de las plantas antisentido, decidimos probar otra condición experimental para tratar de detectar una mayor diferencia en la respuesta a la oscuridad con respecto a los controles. Incubamos entonces en la oscuridad no hojas aisladas, sino plantas enteras dentro de cajas de cartón, mientras que las plantas control se mantuvieron en las condiciones habituales de cultivo. Bajo estas condiciones, la diferencia en apertura estomática entre las plantas con *AtMPK3* silenciado y las controles fue de unos 0,4 μM , el doble que en el experimento anterior, y en este caso sí la diferencia fue estadísticamente significativa para todas las líneas.

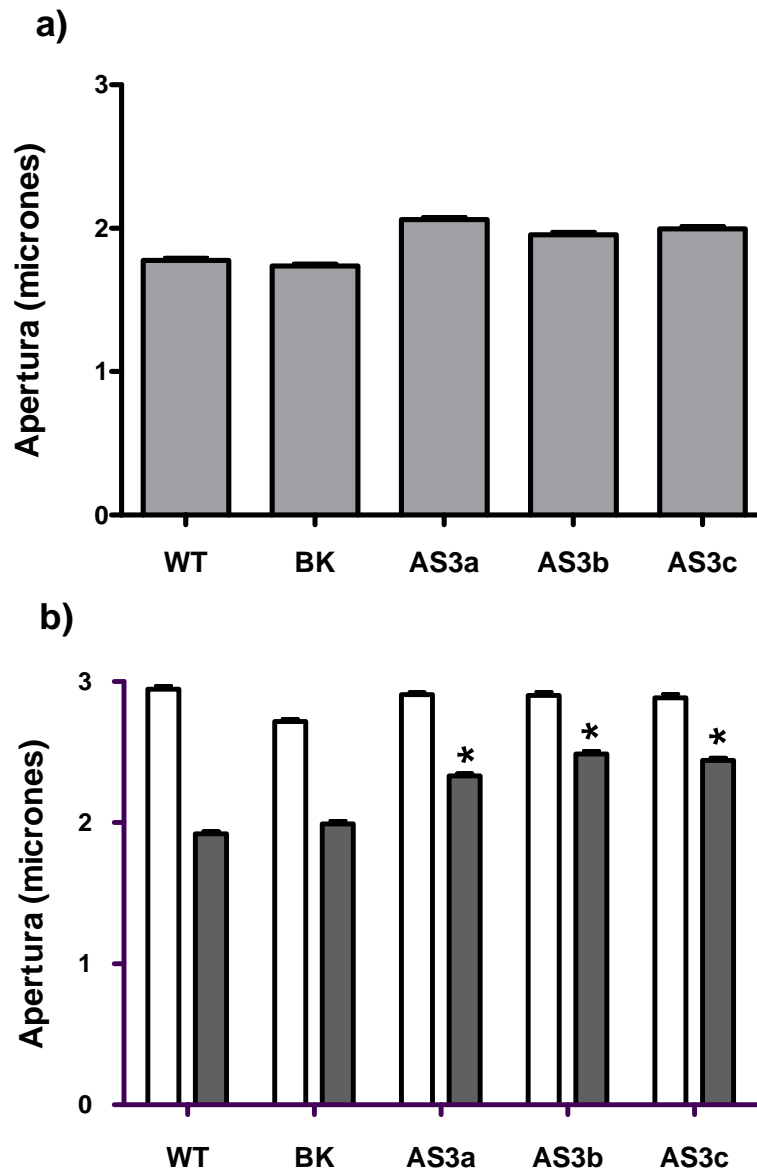


Figura 13. La promoción de cierre por oscuridad está afectada en las plantas antisentido para *AtMPK3*. a) Aperturas estomáticas en hojas incubadas en la oscuridad en *buffer* 10/0 en la oscuridad durante 2h. y b) Aperturas estomáticas en hojas de plantas enteras incubadas en la oscuridad (barras grises) o a la luz (barras blancas) durante 2h. WT: *A. thaliana wt*, BK: control con vector vacío, AS3a, AS3b y AS3c: líneas antisentido para *AtMPK3*. Las barras de error representan el error estandar de tres ensayos independientes, n=40 por ensayo. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control *wt* en oscuridad al aplicar el test de Student ($p < 0,01$).

Este resultado muestra que las plantas con *AtMPK3* silenciado tienen parcialmente afectada su respuesta a la oscuridad y es por lo tanto consistente con un posible rol de *AtMPK3* en la transducción de señales del H_2O_2 producido en respuesta a la oscuridad.

3.c) Efecto del etileno sobre la sensibilidad estomática al ABA en *A. thaliana*

Durante la puesta a punto de los ensayos de medición de la apertura estomática de las plantas antisentido para *AtMPK3* se observó que durante ciertos períodos las plantas sin transformar presentaban una significativa disminución en la sensibilidad al ABA (resultados no mostrados). La sensibilidad a la hormona era notablemente menor que la descrita normalmente en la literatura. Al investigar la causa de dicho fenómeno, encontramos que ocurría cuando se regaban las plantas en leve exceso. Cuando se ajustó el volumen de líquido utilizado para regar las plantas mostraron una sensibilidad normal a la hormona.

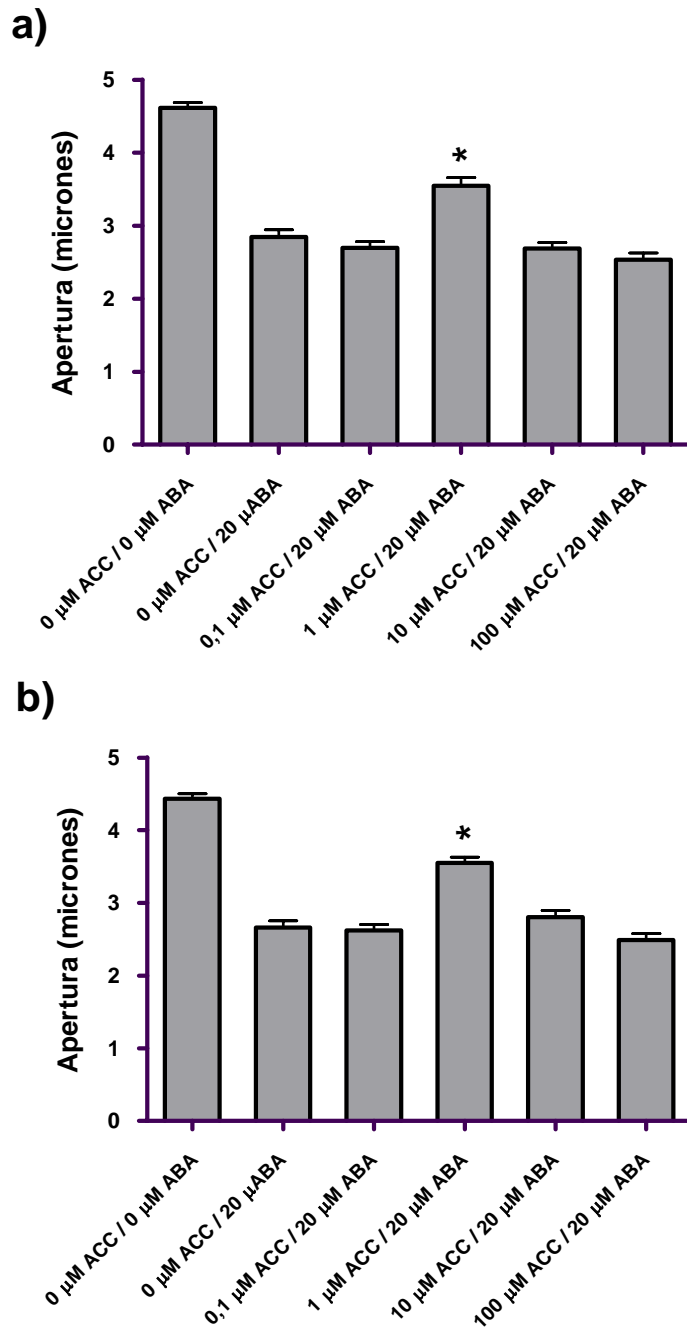
Dicho fenómeno nos llamó la atención y decidimos investigar su causa. Dado que la disminución observada en la sensibilidad estomática al ABA fue bajo un leve exceso de riego, especulamos bajo estas circunstancias la planta podría enviar una señal desde la raíz que transmitiría al vástago información sobre una alta disponibilidad de agua. Bajo estas condiciones, una disminución en la sensibilidad estomática al ABA (y quizás también a otros factores que promueven el cierre de los estomas) permitiría a la planta aumentar su tasa de fijación de carbono.

Al buscar candidatos a constituir la posible señal radicular responsable de mediar la desensibilización estomática al ABA consideramos la posibilidad de que pudiese ser el etileno. Esta molécula es un regulador del crecimiento gaseoso sintetizado ante diversas situaciones de estrés y tiene un rol particularmente importante en la respuesta a situaciones de inundación y anoxia (ver Introducción). La inundación del suelo provoca la síntesis del precursor del etileno ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), el cual es transportado por el floema y convertido a etileno en el vástago, donde desencadena diferentes respuestas de adaptación al exceso de agua. Entre las respuestas a la inundación se encuentra la promoción del cierre estomático, sin embargo se sabe que no éste no está mediado por el etileno, por lo que se postula la existencia de otra señal radicular (Jackson, 2002). El

etileno tiene un efecto variable sobre los estomas según la especie estudiada (ver Introducción), y durante el transcurso de la tesis no encontramos reportes sobre la acción de esta hormona en los estomas de *A. thaliana*. En cambio sí encontramos trabajos que describen que el etileno antagoniza la acción del ABA en el crecimiento de la raíz y en la germinación de esta especie (Beaudoin *et al.*, 2000; Ghassemian *et al.*, 2000). Dada esta evidencia previa, planteamos la hipótesis de que cuando la raíz percibe una abundante disponibilidad de agua, sin llegar a ser una inundación, podría promover la síntesis de bajas cantidades del precursor del etileno ACC, el cual sería convertido en la hormona en el vástago, donde podría causar la disminución de la sensibilidad estomática al ABA. El beneficio adaptativo de esta hipotética respuesta sería aumentar la fijación de carbono en condiciones de alta disponibilidad de agua.

3.c.1) Efecto del precursor del etileno ACC sobre la sensibilidad al ABA

Dadas las dificultades prácticas de trabajar con el gas etileno, para poner a prueba esta hipótesis decidimos trabajar con el precursor de la síntesis del etileno ACC, el cual es convertido en la hormona por la enzima ACC oxidasa (Wang *et al.*, 2002). En primer lugar medimos la respuesta estomática de *A. thaliana* al ABA en presencia de distintas concentraciones de ACC. Hallamos que este compuesto, a una concentración de 1 μM , disminuyó parcialmente el efecto inhibitorio del ABA tanto sobre la promoción del cierre (figura 14a) como sobre inhibición de la apertura estomática (figura 14b). A las otras concentraciones ensayadas, el ACC no causó efectos significativos sobre la acción del ABA en ninguna de las dos respuestas. A una concentración de 1 μM , el ACC por sí sólo fue incapaz de tanto de aumentar el efecto de la luz sobre la apertura estomática, como de causar la apertura estomática en la oscuridad (resultados no mostrados), lo cual indica que el ACC antagoniza el efecto de ABA pero no causa un efecto por sí solo sobre los movimientos estomáticos.



F

Figura 14. Efecto del ACC sobre la sensibilidad estomática al ABA. a) Promoción del cierre estomático. b) Inhibición de la apertura. Los tratamientos se realizaron a las concentraciones de ABA y ACC indicadas en la figura. Las barras de error representan el error estandar de tres ensayos independientes, n=40 por ensayo. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a los controles tratados con 20μM ABA sin ACC al aplicar el test de Student (p<0,01).

Con el propósito de determinar si el efecto del ACC depende de la percepción

del etileno, tal como se espera, se midió el efecto de dicho compuesto sobre el cierre estomático inducido por ABA en presencia de tiosulfato de sodio (STS), un inhibidor de la percepción del etileno (Beyer, 1976). Este inhibidor fue capaz de impedir el efecto reducción de la sensibilidad al ABA causado por 1 μ M ACC (figura 15), lo cual muestra que el efecto de este compuesto sobre la sensibilidad al ABA de los estomas depende de la percepción del etileno, por lo que seguramente el ACC cause su efecto sobre los estomas luego de haber sido convertido en dicha hormona.

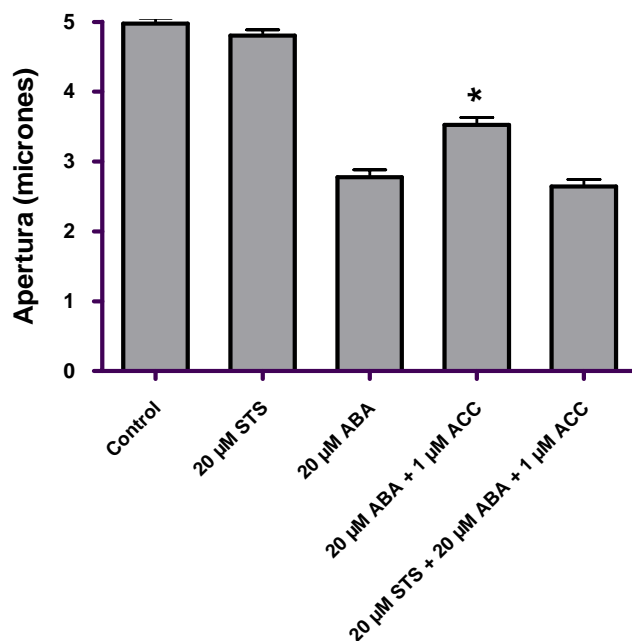


Figura 15. Promoción del cierre estomático por ABA en presencia de ACC y del inhibidor de la percepción del etileno STS. El experimento se llevó a cabo con las concentraciones de los reactivos indicadas en la figura. Las barras de error representan el error estándar de tres ensayos independientes, n=40 por ensayo. El asterisco indica una diferencia significativa con respecto a los tratamientos con 20 μ M ABA y con 20 μ M ABA + 1 μ M ACC + 20 μ M STS al aplicar el test de Student ($p<0,01$).

3.c.2) El ACC no modifica sensibilidad estomática al ABA en las mutantes *ein2* insensibles al etileno

La mutante de *A. thaliana ein2*, completamente insensible al etileno debido a una alteración en un presunto transportador de iones metálicos (Alonso *et al.*, 1999), muestra una respuesta estomática normal al ABA (Beaudoin *et al.*, 2000). Por lo tanto

decidimos hacer uso de esta mutante con el fin de averiguar si, como se espera, es necesaria la existencia de una vía de transducción de etileno funcional para que el ACC pueda modular la sensibilidad estomática al ABA.

El ACC aplicado a una concentración de 1 μM no alteró la capacidad del ABA de promover el cierre estomático en las mutantes *ein2* (figura 16). Este experimento proporciona otra evidencia más de que el efecto del ACC la sensibilidad estomática al ABA ocurre luego de que dicho compuesto es convertido en etileno.

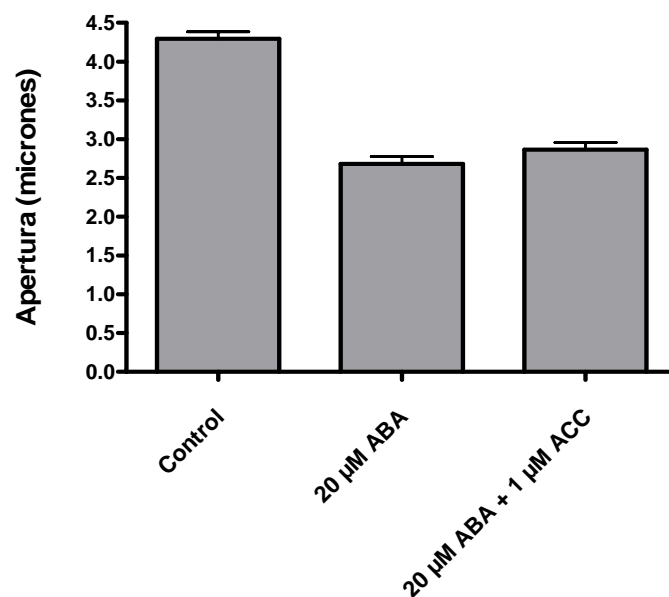


Figura 16. Las mutantes *ein2* (insensibles al etileno) no son afectadas por 1 μM ACC en la promoción del cierre estomático por ABA. El experimento se llevó a cabo con concentraciones de los reactivos indicadas en la figura. Las barras de error representan el error estándar de tres ensayos independientes, $n=40$ por ensayo.

3.c.3) Las mutantes sobreproductoras de etileno *eto1* presentan sensibilidad al ABA en la inhibición de la apertura estomática

Las mutantes de *A. thaliana eto1* producen etileno en exceso debido a una mutación que confiere mayor estabilidad a la proteína ACC sintetasa 5 (Chae *et al.*, 2003; Guzman & Ecker, 1990; Wang *et al.*, 2004). Eckert & Kaldenhoff (2000) describieron que en estas mutantes la apertura estomática inducida por la luz es

similar a la de las plantas *wt*. Las plántulas incubadas a la luz y las hojas adultas de las mutantes *eto1* producen etileno en leve exceso, similar a la que producen plántulas normales cuando se las trata con 1 μM ACC (Guzman & Ecker, 1990). Esta evidencia previa nos llevó a postular que la baja producción endógena de etileno de las hojas adultas de las mutantes *eto1* podría reducir la sensibilidad estomática al ABA de las mutantes de manera similar a como 1 μM ACC lo hace en las plantas *wt*. Al analizar la inhibición de la apertura estomática por ABA se encontró que las mutantes *eto1* son menos sensibles a la hormona que las plantas *wt* (figura 17). Este resultado muestra una evidencia más de que el etileno, producido en leve exceso en el estadio adulto de estas mutantes, es capaz de antagonizar el efecto del ABA sobre los movimientos estomáticos.

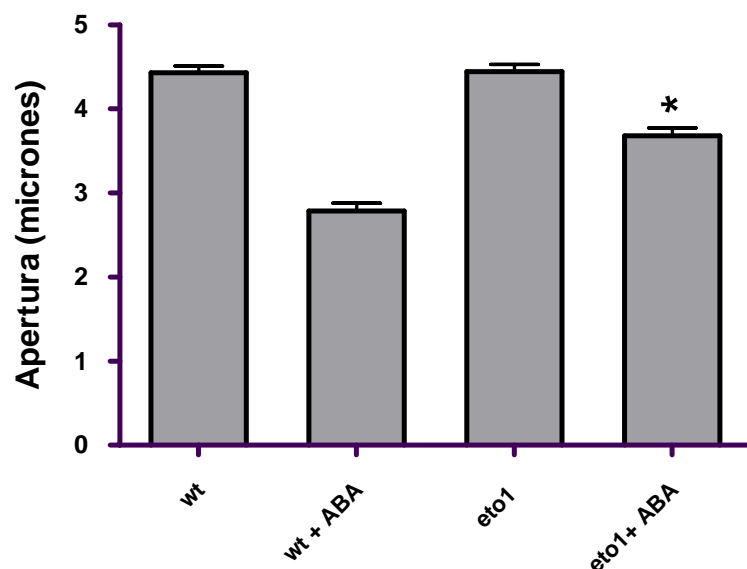


Figura 17. Las mutantes *eto1*, sobreproductoras de etileno, son menos sensibles al ABA en la inhibición de la apertura estomática. Inhibición de la apertura estomática por ABA 20 μM en plantas *wt* y en mutantes *eto1*. Las barras de error representan el error estandar de tres ensayos independientes, $n=40$ por ensayo. El asterisco indica una diferencia significativa con respecto al control *wt* tratado con ABA al aplicar el test de Student ($p<0,01$).

En conjunto estos datos presentan una fuerte evidencia de que el etileno, cuando se encuentra en leve exceso con respecto a las concentraciones normales, ya

sea mediante el agregado del precursor ACC o en las mutantes *eto1*, es capaz de reducir la sensibilidad estomática al ABA de las células de la guarda en *A. thaliana*.

4. Discusión y conclusiones

4.a) Fenotipo de las plantas antisentido para *AtMPK3*

La MAPK *AtMPK3* se activa (y en varios casos también se induce la transcripción de su gen) en respuesta a numerosos factores, tales como el ABA, el H_2O_2 , estreses abióticos y *elicitors* generados por patógenos (ver Introducción). En consecuencia se presume que esta MAPK tiene una función importante en la respuesta a dichos estímulos ambientales. Sin embargo, al momento de escribir esta tesis todavía no se ha descrito el fenotipo de mutantes de su gen. Este tipo de información constituye usualmente una importante herramienta para determinar la función de un gen a nivel fisiológico. Con el fin de averiguar el posible rol de *AtMPK3* en el control de los movimientos estomáticos, en este trabajo inhibimos su expresión en células de la guarda de *A. thaliana* a través de la expresión transgénica de un ARN antisentido contra su gen, bajo el control de una versión deletada del promotor de *papa kst1*, de expresión limitada específicamente a células de la guarda en *A. thaliana*. El análisis de tres líneas transgénicas con expresión disminuida de *AtMPK3* debido a la expresión de una construcción antisentido contra su gen reveló que éstas presentan alteraciones en la respuesta estomática al ABA, al H_2O_2 y a la oscuridad.

Las plantas con el gen *AtMPK3* silenciado tienen parcialmente afectada la respuesta al ABA en la inhibición del cierre estomático, sin embargo responden de la misma manera que las plantas *wt* en la promoción del cierre de los estomas inducida por esta hormona. Dado que la expresión de *AtMPK3* está fuertemente reducida pero no completamente silenciada en las líneas antisentido, la inhibición sólo parcial observada en la inhibición del cierre estomático en respuesta al ABA podría deberse en principio a la expresión residual de la MAPK en dichas plantas. Una posibilidad alternativa es que la reducción en la expresión de la MAPK sea compensada por otros elementos de señalización que actúan de manera paralela. Este último mecanismo

ciertamente parece ocurrir en el caso de la promoción del cierre estomático por el ABA, dado que las líneas antisentido para *AtMPK3* y las controles difieren en la respuesta a la hormona sólo cuando se bloquea el aumento de pH inducido por el ABA por medio del ácido débil butirato, capaz de permear la membrana plasmática. Estos experimentos indican que cuando las células de la guarda son tratadas con ABA, la alcalinización del citosol actúa en una vía paralela a la de *AtMPK3* y es capaz de compensar parcialmente la reducción en su expresión en las plantas silenciadas, permitiendo así que ocurra el cierre estomático normal en ellas. Por último, dado que el promotor utilizado para expresar la construcción antisentido se encuentra permanentemente activo en células de la guarda maduras, la posibilidad de que además exista una adaptación compensatoria a largo plazo de las cascadas de señalización en las plantas antisentido no puede ser descartada.

Tanto la inhibición de la apertura como la promoción del cierre estomático por H_2O_2 se encuentran afectadas en las plantas silenciadas en *AtMPK3*. La inhibición de la apertura está parcialmente inhibida en estas plantas, mientras que la promoción del cierre se encuentra virtualmente abolida. Estos resultados están de acuerdo con trabajos previos que muestran que *AtMPK3* se activa por H_2O_2 (Kovtun *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002). Al revés de lo que sucede en el caso del ABA, el rol de *AtMPK3* en la señalización de la promoción del cierre inducida por H_2O_2 no puede ser compensado por otros componentes de señalización. Estos resultados muestran que *AtMPK3* juega un rol importante en la señalización del H_2O_2 en células de la guarda.

La promoción del cierre estomático en respuesta a la oscuridad también se encuentra afectado en las plantas silenciadas en *AtMPK3*. En este caso se observaron diferencias estadísticamente significativas entre estas plantas y los controles sólo al incubar plantas enteras en la oscuridad, pero no cuando se incubaron hojas solas en el buffer 10/0 utilizado para los experimentos de inhibición de la apertura estomática por ABA y H_2O_2 . Este resultado también está de acuerdo con un posible rol de *AtMPK3* en la transducción de señales del H_2O_2 , ya que recientemente se halló que este compuesto participa en la transducción de señales del cierre estomático inducido por oscuridad

(Desikan *et al.*, 2004b; She *et al.*, 2004).

El fenotipo de las plantas con el gen AtMPK3 silenciado en células de la guarda es compatible con el modelo mostrado en la figura 18 a. Así, durante el proceso de inhibición de la apertura, el ABA induciría la síntesis de H₂O₂, el cual a su vez actuaría promoviendo la defosforilación, y en consecuencia la inhibición, de las H⁺-ATPasas de la membrana plasmática (Zhang *et al.*, 2004). AtMPK3 podría actuar por lo tanto en la señalización río abajo del H₂O₂ y tal vez mediaría la inactivación de las H⁺-ATPasas. Tanto en la inhibición de cierre por H₂O₂ como por ABA se observó una reducción parcial en la sensibilidad, lo cual indica que posiblemente otros elementos de transducción actúen en paralelo con AtMPK3.

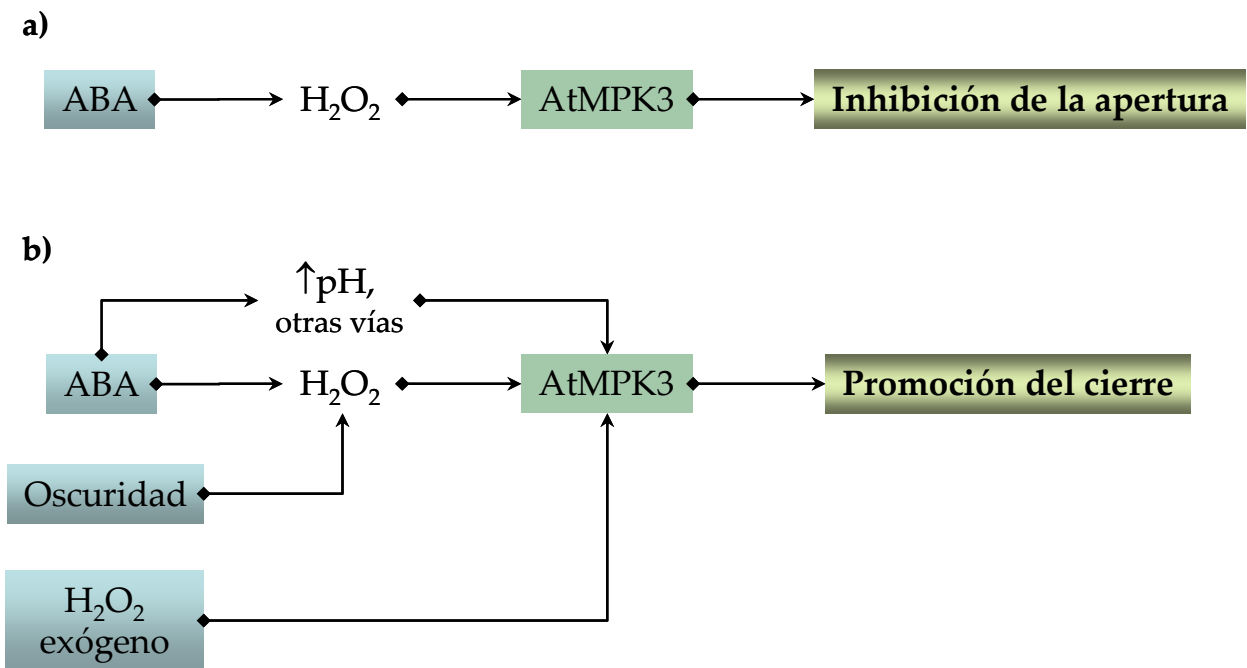


Figura 18. a) Rol de AtMPK3 en la inhibición de la apertura estomática. El ABA induce la síntesis de H₂O₂, el cual activaría AtMPK3 produciendo la inhibición de la apertura estomática. b) Rol de AtMPK3 en la promoción del cierre estomático. Tanto el ABA como la oscuridad inducen la síntesis de H₂O₂, el cual activaría AtMPK3 produciendo la promoción del cierre estomático. El H₂O₂ aplicado de manera exógena sería capaz de activar AtMPK3 para promover el cierre estomático a través de una vía posiblemente distinta de la del H₂O₂ inducido por el ABA.

En el caso de la promoción del cierre estomático, el modelo postulado para la

inhibición de la apertura no es consistente con los datos experimentales, ya que si bien las plantas silenciadas responden normalmente al ABA, son virtualmente insensibles al H₂O₂. En principio uno podría suponer que AtMPK3 es absolutamente requerida para la transducción de la señal del H₂O₂ en la promoción del cierre estomático, pero que sin embargo podrían existir otras vías de señalización independientes del H₂O₂ (como sucede en el caso de la alcalinización del citosol) que permitirían que ocurriese normalmente el cierre estomático en respuesta al ABA aún cuando la expresión de *AtMPK3* se encuentra disminuida. Sin embargo, esta propuesta no es consistente con las observaciones de Kwak *et al.* (2003), quienes estudiaron la respuesta estomática al ABA en las dobles mutantes de *A. thaliana* *AtrbohD/AtrbohF*, las cuales no muestran incremento en la cantidad de H₂O₂ cuando son tratadas con ABA debido a la disrupción de dos genes que codifican NADPH oxidasas de membrana plasmática. En estas mutantes se encuentra parcialmente inhibida la capacidad de ABA de promover el cierre estomático, lo cual indica que la transducción de señales de esta hormona a través del H₂O₂ no puede ser totalmente compensada por otros componentes de señalización. Si bien podría argumentarse que la sensibilidad normal al ABA de las plantas silenciadas podría explicarse por una inhibición incompleta de la expresión de *AtMPK3*, o por la existencia de vías alternativas de señalización del H₂O₂, ambas posibilidades son difíciles de reconciliar con el hecho de que estas plantas son casi insensibles al H₂O₂ exógeno.

Una explicación alternativa para esta aparente inconsistencia sería que el H₂O₂ exógeno actuase a través de una vía distinta a la del endógeno (cuya síntesis es inducida por ABA). Existe un antecedente en la literatura donde se describe que el H₂O₂ aplicado de manera exógena tiene un efecto distinto del generado endógenamente sobre la inducción de un gen. Avsian-Kretchmer *et al.* (2004) hallaron que la inducción de del gen de la glutatión peroxidasa *gpx1* de *Citrus sinensis* por sal está mediada por el H₂O₂ producido intracelularmente en respuesta a dicho estrés, y esta vía de activación es diferente de la inducida por el H₂O₂ agregado exógenamente. De manera consistente con esta observación, en los últimos años se acumuló evidencia

creciente de que la síntesis, degradación y distribución subcelular del H₂O₂ se encuentra finamente regulada (Apel & Hirt, 2004; Foyer & Noctor, 2005). Por lo tanto, la diferencia en el efecto del ABA y del H₂O₂ sobre la promoción del cierre estomático podría deberse a que el efecto del H₂O₂ exógeno no sea el mismo que el del generado endógenamente por el ABA. En el caso de la oscuridad, la función del H₂O₂ endógeno en la transducción de su señal en la promoción del cierre estomático no sería compensada por otros factores como en el caso del ABA. Ello indicaría *a priori* un menor grado de redundancia en su señalización que para el ABA. El modelo postulado de acción de AtMPK3 en base a los resultados obtenidos se resume en la figura 18 b.

El hecho de que las plantas silenciadas en *AtMPK3* sean insensibles al ABA en la inhibición del cierre estomático pero que sin embargo respondan normalmente a la hormona en la promoción del cierre parece indicar que la señal del ABA es transducida a través de vías de señalización diferentes en ambos fenómenos. Existen otras evidencias en la bibliografía que apoyan esta hipótesis. Hey *et al.* (1997) hallaron que el ácido okadaico, un inhibidor de fosfatasa del tipo PP1/PP2A, antagoniza el efecto del ABA sobre la inhibición de la apertura estomática pero potencia su acción sobre la promoción del cierre en *P. sativum*. Por otro lado, ciertas mutantes muestran un comportamiento dispar en ambas respuestas estomáticas al ser tratadas con ABA. La doble mutante de *A. thaliana nia1/nia2*, que tiene afectados los genes de dos nitrato reductasas, tiene alterada la síntesis del óxido nítrico en respuesta al ABA en células de la guarda. Mientras que en esta doble mutante la inhibición del cierre estomático por ABA es normal, la promoción del cierre por esta hormona se encuentra alterada. Este fenotipo es el opuesto al de las plantas antisentido para *AtMPK3*. En cambio, tanto el silenciamiento de un gen que codifica una fosfolipasa C en tabaco (Hunt *et al.*, 2003) como la mutación por inserción del gen GPA1 -que codifica la única subunidad alfa de la proteína G trimérica de *A. thaliana* (Wang *et al.*, 2001)- causan una respuesta estomática al ABA similar al de las plantas con el gen *AtMPK3* silenciado, *i.e.* una respuesta normal en la promoción del cierre pero sensibilidad reducida a la hormona en la inhibición de la apertura. Dado que la inhibición de la apertura y la promoción

del cierre estomático no son fenómenos estrictamente reversibles, ya que por ejemplo la entrada y salida de solutos no ocurre a través de los mismos canales, tiene sentido suponer que los distintos componentes de las vías de señalización del ABA puedan actuar específicamente sobre componentes involucrados en un fenómeno o el otro.

Además de ser similares a las plantas con AtMPK3 silenciado en la respuesta estomática al ABA, las mutantes *gpa1* también se les parecen en que se vuelven parcialmente insensibles al ABA en la promoción del cierre estomático cuando se impide la alcalinización citosólica inducida por el ABA mediante butirato de sodio (Wang *et al.*, 2001). Esto, sumado al hecho de que las mutantes *gpa1* tienen afectada la síntesis de H₂O₂ en células de la guarda en respuesta a la calmodulina exógena (Chen *et al.*, 2004) y al ozono (Joo *et al.*, 2005), permite especular que GPA1, el H₂O₂ y AtMPK3 podrían ser miembros de una misma vía de transducción de señales en células de la guarda.

Las evidencias halladas hasta el momento indican que AtMPK3 actúa río abajo de la producción de H₂O₂. Sin embargo, es importante mencionar que existen evidencias de la acción cascadas de MAPKs río arriba de la síntesis de H₂O₂, tanto en células de la guarda tratadas con ABA como en plantas infectadas con patógenos. Jiang *et al.*, (2003) hallaron que relativamente bajas concentraciones del inhibidor de MEKs PD98059 inhiben la síntesis de H₂O₂ inducida por ABA en células de la guarda de *V. faba*, lo cual indica que posiblemente actúe una cascada de MAPK río arriba de la síntesis de H₂O₂. Por otro lado, Yoshioka *et al.*, (2003) mostraron que en plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas con hongos posiblemente actúe río arriba de la síntesis de H₂O₂ una cascada de MAPK que incluye la MEK de tabaco MKK2. En concordancia con este estudio, la expresión en *A. thaliana* de versiones constitutivamente activas de las MEK MKK4 y MKK5 de esta especie, altamente similares a MKK2 de *N. benthamiana*, inducen la producción de H₂O₂ (Ren *et al.*, 2002). Es interesante tener en cuenta que MKK4 y MKK5 también son candidatos a participar en una cascada de señalización río arriba de AtMPK3, activada por el *elicitor* bacteriano flagelina en protoplastos de mesófilo de *A. thaliana* (Asai *et al.*, 2002).

En primera instancia, AtMPK3 no podría ser parte de cascadas que actuaran río arriba de la síntesis de H₂O₂, ya que justamente es activada en respuesta a este compuesto. Sin embargo, en los últimos años se publicaron estudios que muestran que la síntesis de H₂O₂ ocurre de manera más compleja de lo que se suponía previamente (ver revisión en Foyer & Noctor, 2005). En particular en células de la guarda, cuando son tratadas con ABA (Zhang *et al.*, 2001) u ozono (Joo *et al.*, 2005) ocurre un rápido aumento en la producción de H₂O₂ en los cloroplastos que precede su síntesis en la membrana plasmática a través de las enzimas NADPH oxidasas. La diferencia entre ambas fuentes de producción de H₂O₂ pudo determinarse mediante dos tipos de enfoques experimentales: a) a nivel subcelular a través de la visualización por microscopía de fluorescencia de células tratadas con el colorante dihidroclorofluoresceína, el cual fluoresce sólo luego de reaccionar con H₂O₂, y b) a nivel bioquímico a través de inhibidores de la fotosíntesis y de NADPH oxidasas. Joo *et al.* (2005) hallaron que la síntesis de H₂O₂ en respuesta a ozono se encuentra muy disminuida en las mutantes *gpa1* mencionadas previamente, tanto en cloroplastos como en la membrana plasmática. Dado que la síntesis de H₂O₂ en los cloroplastos precede a la de la membrana plasmática, cabría la posibilidad de que el primero activase al segundo. Si éste fuese realmente el caso, y teniendo en cuenta la similitud en la respuesta estomática al ABA entre las plantas con AtMPK3 silenciado y las mutantes *gpa1*, es posible especular que AtMPK3 transduce la señal del H₂O₂ generado en los cloroplastos para activar la síntesis de H₂O₂ en la membrana plasmática por medio de las NADPH oxidasas. Una manera de poner a prueba esta hipótesis es a través de la medición de la producción de H₂O₂ en los cloroplastos de las plantas antisentido para AtMPK3 en respuesta al ABA: si AtMPK3 sólo actuase río abajo de la síntesis de H₂O₂ la producción de H₂O₂ sería normal, mientras que si actuase río arriba de la síntesis de este compuesto por las NADPH oxidasas, debería observarse una producción disminuida.

Un trabajo muy reciente, publicado durante la escritura de esta tesis, muestra que la inhibición de la expresión en toda la planta de la MAPK de tabaco NtMPK4 -de

secuencia muy similar a AtMPK4 de *A. thaliana*- inhibe el cierre estomático en respuesta a ozono, pero no al ABA, y causa hipersensibilidad a dicho gas (Gomi *et al.*, 2005). Dado que, además de la similitud de secuencia, AtMPK4 y NtMPK4 se asemejan en que ambas se expresan en células de la guarda y en que la mutación de su gen impide la activación de varios genes que responden a la hormona ácido jasmónico (Gomi *et al.*, 2005; Petersen *et al.*, 2000), es posible suponer que AtMPK4 cumple en *A. thaliana* un rol similar al de NtMPK4 en tabaco. Si así fuera, AtMPK4 podría ser también una MAPK candidata a participar en la señalización en células de la guarda, aunque no en la vía activable por ABA. Suhita *et al.* (2004) estudiaron el comportamiento estomático en las mutantes de *A. thaliana ost1* (Mustilli *et al.*, 2002) y *jar1* (Staswick *et al.*, 2002). Estos autores hallaron que mientras la mutante insensible al ABA *ost1* tiene bloqueada la producción de H₂O₂ en respuesta a dicha hormona, la mutante *jar1*, insensible a metil jasmonato, hormona que también induce el cierre estomático, tiene la bloqueada la producción de H₂O₂ en respuesta a este compuesto. La mutante *ost1* responde normalmente a metil jasmonato y *jar1* al ABA, lo cual sugiere que la señalización río arriba de la producción de H₂O₂ difiere para ambas hormonas. Dado que las mutantes de AtMPK4 y de NtMPK4 tienen alterada la inducción de genes por ácido jasmónico, similar al metil jasmonato, se puede especular que estas dos MAPKs participen en la vía de señalización que está bloqueada en la mutante *jar1*.

En el trabajo ya mencionado donde se estudió la producción de H₂O₂ en respuesta a ozono en células de la guarda de *A. thaliana* (Joo *et al.*, 2005), los autores hallaron que la síntesis de dicha molécula ocurre en minutos primero en los cloroplastos, posteriormente en la membrana plásmática, y al cabo de una hora se propaga a otras células epidérmicas. Esta observación sugiere que las células de la guarda podrían actuar como sensores de ozono y transmitir la señal de su presencia a través de la propagación de una señal de H₂O₂ a células vecinas, pudiendo quizás llegar a desencadenar la respuesta de hipersensibilidad (HR) inducida por este gas. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que estos experimentos se realizaron en

epidermis aisladas, y por lo tanto no permiten considerar la influencia de posibles sitios de percepción de ozono dentro del interior de la hoja. De cualquier manera, estos resultados dejan abierta la interesante posibilidad de que las células de la guarda, dada su posición en la insertase entre la planta la atmósfera, y teniendo en cuenta su capacidad de percibir numerosos estímulos, podrían actuar como sensores de moléculas provenientes del exterior de la planta, como el ozono, feromonas producidas por otras plantas, estímulos moleculares (*elicitors*) derivados de patógenos, etc. y transmitir rápidamente esa señal a células en el interior de la planta. Si las plantas silenciadas en *AtMPK3* efectivamente participan en la misma vía de señalización de GPA1 como se planteó anteriormente, podría esperarse que también tuviesen afectada su respuesta al ozono. En ese caso, constituirían una muy buena herramienta para determinar su relevancia como sensores de ozono, ya que sólo tienen afectada la expresión de su gen en células de la guarda. Se esperaría que en estas plantas -o en plantas que expresen una construcción antisentido para el gen GPA1 bajo el control del mismo promotor específico de células de la guarda- por ejemplo esté afectada la respuesta HR inducida por tratamiento con ozono.

El resultado obtenido en los experimentos previos a esta tesis (ver 1.d), que muestra que el inhibidor de MAPK p38 SB203580 es capaz de inhibir la apertura estomática inducida por la luz, es difícil de reconciliar con *AtMPK3* como un supuesto blanco de acción del inhibidor, ya que uno esperaría que las plantas antisentido para *AtMPK3* tuviesen un comportamiento estomático similar al causado por el inhibidor. De todas maneras, los efectos de los inhibidores utilizados en células animales suelen no ser tan claros y reproducibles en las plantas, como lo muestra el caso del estudio de la función la proteína G trimérica en vegetales. Su estudio a través de los fármacos usuales en animales produjo una serie de resultados contradictorios y su función sólo pudo ser confirmada con el advenimiento de las herramientas de la biología molecular (Assmann & Jones, 2004).

A pesar de que los resultados obtenidos con SB203580 no fueron en absoluto concluyentes, nos interesamos en la posibilidad de que la treonina (T) 106, responsable

en gran medida de la especificidad del inhibidor de MAPKs p38 (ver 1.d) pueda tener alguna relación con la función biológica de p38 y AtMPK3. Ello surgió a partir de interesantes evidencias circunstanciales que sugieren que este aminoácido podría estar relacionado con una función evolutivamente conservada de ciertas MAPKs. Por un lado, como se discutió en la introducción, sólo las MAPKs p38 en mamíferos y sólo AtMPK3 en *A. thaliana* poseen una treonina en la posición equivalente. Por otra parte, ambas MAPKs se inducen en respuesta a estímulos similares: AtMPK3 se induce por estrés oxidativo (Kovtun *et al.*, 2002) y osmótico (Droillard *et al.*, 2002), al igual que p38 (Kyriakis *et al.*, 2001); y ambas MAPKs parecen participar en la respuesta inmune innata en los organismos respectivos río abajo de receptores del tipo *Toll* (Asai *et al.*, 2002; Cecil & Klemsz, 2003; Vasselon *et al.*, 2002). Dentro de las plantas, la conservación de la treonina dentro del bolsillo de unión del ATP en AtMPK3 no sólo está limitada a *A. thaliana*. Al hacer una búsqueda entre las secuencias de plantas depositadas en el GenBank utilizando la secuencia aminoacídica de AtMPK3 como sonda, se halló que sobre un total de 148 secuencias correspondientes a MAPKs, las 15 más similares a dicha proteína todas presentaban la treonina (T) en la posición mencionada, mientras que de las 133 restantes, sólo 14 la tenían (estos datos son actualizados al año 2005). De las 15 MAPKs más similares a la ATMPK3, la mayor parte fue descrita en la bibliografía como activables por estímulos similares a los de AtMPK3. En conjunto, estas evidencias apoyan la idea de que la T106 de p38 podría cumplir una función evolutivamente conservada en plantas y animales relacionada con la respuesta al estrés oxidativo y la inmunidad innata. El estudio comparativo entre MAPKs de plantas y animales que presenten la treonina en el bolsillo de unión del ATP permitiría quizás encontrar patrones estructurales comunes relacionados con la respuesta inmune y al estrés oxidativo. Por otra parte, dado el extenso conocimiento existente sobre las MAPKs p38 (Roux & Blenis, 2004), su comparación con las MAPKs vegetales permitiría facilitar el estudio de este tipo de cascadas de MAPKs en las plantas general.

4.b) Efecto del etileno sobre la sensibilidad estomática al ABA en *A. thaliana*

Los resultados hallados en esta tesis muestran evidencia de que el etileno es capaz de modular la sensibilidad estomática al ABA de las células de la guarda de *A. thaliana*. Tanto las hojas de esta especie tratadas con el precursor biosintético del etileno ACC a una concentración de 1 μM , como las de la mutante sobreproductora de etileno *eto1*, muestran una sensibilidad reducida al ABA. La reducción de la sensibilidad a esta hormona causada por el ACC no tiene lugar en las mutantes insensibles al etileno *ein2*, y es revertida por el STS, un inhibidor de la acción del etileno. A la concentración utilizada el ACC por sí solo fue incapaz de aumentar el efecto de la luz sobre la apertura estomática o de causar la apertura estomática en la oscuridad, lo cual indica que el ACC antagoniza el efecto de ABA. Durante la escritura de esta tesis fue publicado un trabajo donde los autores obtuvieron resultados muy similares a los hallados en esta tesis (Tanaka *et al.*, 2005). Estos autores observaron que el ACC, a una concentración de 10 μM , es capaz de disminuir la sensibilidad estomática al ABA en el mismo genotipo de *A. thaliana* utilizado en esta tesis. De manera similar a lo hallado por nosotros, estos autores encontraron el ACC no antagoniza el efecto del ABA sobre el cierre estomático en las mutantes insensibles al etileno *etr1* y *ein3*, mientras que las mutantes sobreproductoras de etileno *eto1* son menos sensibles al ABA, pero no a la oscuridad, en dicha respuesta fisiológica. Los autores también demostraron que al tratar plantas enteras con etileno gaseoso a una concentración de 100 $\mu\text{l/l}$ se inhibe su cierre estomático en respuesta al ABA y a la desecación, situación que también ocurre en las mutantes *eto1*. Estos resultados concuerdan con los nuestros excepto en que los autores hallaron que el antagonismo del ACC sobre la acción del ABA se produce a una concentración de 10 μM en vez de 1 μM . La discrepancia en la concentración de ACC a la cual se observa dicho efecto entre este trabajo y el de Tanaka *et al.* (2005) es muy probable que se deba a que estos autores realizaron las mediciones estomáticas en epidermis aisladas en vez de en hojas

enteras como en nuestro caso. En las hojas enteras es posible que las células de toda la hoja permitan una conversión más rápida y eficiente de ACC en etileno, por lo que sería lógico suponer que en este caso menores concentraciones de ACC causasen el mismo efecto que mayores concentraciones en hojas aisladas. Estos autores no muestran resultados obtenidos a concentraciones de ACC diferentes de 10 μM .

Los resultados hallados en esta tesis, en conjunto con los de Tanaka *et al.* (2005), aportan evidencia en favor de la hipótesis planteada en la sección 3.c.2), que predice la existencia de los siguientes efectos secuenciales: cuando la raíz percibe una abundante disponibilidad de agua, sin llegar a ser una inundación, promueve la síntesis de bajas cantidades del precursor del etileno ACC, el cual es convertido en la hormona en el vástago, donde causa la disminución de la sensibilidad estomática al ABA. Sin embargo, harían falta más experimentos para probar de una manera más fehaciente la hipótesis. Por ejemplo, esta hipótesis predice que las plantas levemente sobregadas producen una cantidad mayor de etileno que las plantas regadas normalmente. Dado que el etileno produce numerosos efectos sobre el desarrollo de la planta y también es sintetizado en respuesta a diversos tipos estrés, sería de esperar que el etileno, además de modificar la sensibilidad estomática al ABA, provocase diversas respuestas en otros órganos y tejidos de la planta que en conjunto permitan mejorar la respuesta adaptativa de la planta. Dado que el etileno es inducido durante la respuesta a diversos estreses (entre ellos el hídrico), y seguramente participa en la adaptación de las plantas a esta situación (Klee, 2004), parece a primera vista paradójico que pueda ser capaz de antagonizar el efecto del ABA. Es posible que en el caso del control del cierre estomático el etileno pueda contrabalancear el efecto del ABA de manera de permitir cierto grado de fotosíntesis. En ese sentido, es interesante el que hayamos encontrado que el ACC antagoniza el efecto del ABA sólo a relativamente baja concentración (1 μM), y que las mutantes *eto1*, que muestran sensibilidad disminuida al ABA, presenten sólo una leve sobreproducción de etileno.

Es conveniente considerar dos situaciones ambientales diferentes bajo las cuales el antagonismo del etileno sobre la acción del ABA podría contribuir a una mejor

adaptación de la planta:

1) Un escenario en el que la planta esté sometida a una situación de estrés hídrico que no sea extrema. Bajo esta situación, el etileno y el ABA, ambos sintetizados en respuesta al estrés, podrían llevar información diferente. Así por ejemplo, las cantidades en que se sintetice -o se relocalice en el caso del ABA- cada hormona podría depender de diferentes parámetros internos de la planta. De esa manera, cada hormona podría transmitir información que, al menos en el caso de la regulación de los movimientos estomáticos, podría ser contrapuesta. Entonces el etileno, si se encuentra a bajas concentraciones, limitaría la capacidad del ABA de promover el cierre estomático o de inhibir su apertura, permitiendo así una mayor fijación de carbono en los casos en que el estrés no sea tan importante. Ante una mayor carencia de agua, posiblemente se sintetizarían mayores cantidades de etileno, que no serían capaces de antagonizar el efecto del ABA sobre el cierre estomático.

2) Una situación de riego en leve exceso. Como se discutió anteriormente en 3.c.2, bajo situaciones de inundación se produce la síntesis de ACC en las raíces, el cual viaja hasta las regiones aéreas de la planta, donde es convertido en etileno. Bajo condiciones de leve exceso de agua, posiblemente ocurra una leve hipoxia que induciría la síntesis de bajas cantidades de ACC en las raíces. El etileno en las hojas a partir del ACC aumentaría la tasa transpiratoria a través de la disminución de la sensibilidad al ABA, permitiendo de esta manera una más rápida eliminación del agua en exceso en la cercanía de la raíz y por consiguiente una restauración del flujo normal de oxígeno a este órgano. Una visión alternativa del mismo fenómeno sería que el hipotético ACC sintetizado en las raíces podría llevar una señal de este órgano a las hojas que indique la existencia de una abundante disponibilidad de agua. En tal caso, sería ventajoso para la planta la disminución de la sensibilidad estomática al ABA, ya que una mayor apertura estomática permitiría aumentar la fijación de carbono, mientras que el aumento concomitante en la transpiración no sería problemático bajo condiciones de alta disponibilidad de agua.

Estos experimentos aportan una evidencia más sobre la diferencia que puede

existir en las vías de transducción hormonales en distintos órganos y procesos de la planta. Como se discutió en la Introducción, el etileno modula la acción del ABA en la germinación y en la elongación de la raíz en *A. thaliana* (Beaudoin *et al.*, 2000; Ghassemian *et al.*, 2000). Sin embargo, dicha modulación no ocurre de igual manera en ambos procesos fisiológicos, y también es diferente en las células de la guarda. Por ejemplo, en las mutantes insensibles al etileno *ein2* se encuentra disminuida la sensibilidad al ABA en el crecimiento de la raíz, aumentada en la germinación, y sin cambios en el control de los movimientos estomáticos. El agregado de ACC tiene un efecto similar en la geminación y en el control de los movimientos estomáticos (no tiene un efecto por sí solo pero antagoniza la acción del ABA), sin embargo es capaz de inhibir el crecimiento de las raíces, tal como lo hace el ABA. En este último proceso, la sensibilidad al ABA de las mutantes *eto1*, sobreproductoras de etileno, es mayor o menor que la de las plantas *wt* dependiendo de la concentración de ABA. Estos y otros ejemplos indican que, si bien existen elementos de señalización específicos de distintas hormonas y estímulos que actúan en toda la planta, el moldeado fino de las vías de transducción de señales, y sobre todo la interacción que ocurre entre ellas, parece variar considerablemente según el órgano y proceso estudiado. De acuerdo con esta idea, los resultados de Sutton *et al.* (2000) indican que la modulación de la actividad de los canales de potasio por el ABA ocurre a través de vías de señalización distintas en células de la guarda y de mesófilo.

Por último, es interesante mencionar la conexión de los resultados obtenidos en esta tesis con la producción antropogénica de etileno, originada a partir de la combustión de combustibles fósiles. En regiones altamente contaminadas, como en la Ciudad de México, la concentración atmosférica de este gas puede alcanzar valores de 40 $\mu\text{l/l}$ (Altuzar *et al.*, 1997), varias veces mayor que una concentración de etileno capaz de provocar el cierre estomático en varias especies (5,1 $\mu\text{l/l}$), según lo descrito por Taylor & Gunderson (1986). Por lo tanto el etileno originado a partir de la combustión podría llegar a interferir con los mecanismos adaptativos de *A. thaliana* (y posiblemente de otras plantas) ante las situaciones ambientales mencionadas

anteriormente.

Los resultados obtenidos en esta tesis contribuyen al conocimiento de la compleja red de señalización que controla el movimiento de los poros estomáticos. Estudios posteriores que identifiquen tanto los elementos río arriba como río abajo de la cascada de MAPK a la cual pertenece AtMPK3 permitirán definir con precisión su rol en la red de señalización de las células de la guarda. De la misma manera, la profundización del estudio del efecto antagónico del etileno sobre la acción del ABA en los movimientos estomáticos permitirá saber cómo es que ocurre la interacción entre estas hormonas y cómo ésta contribuye a mejorar la adaptación de las plantas al medio ambiente.

5. Bibliografía

- Ahlfors R, Macioszek V, Rudd J, Brosche M, Schlichting R, Scheel D, Kangasjarvi J** (2004) Stress hormone-independent activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana* during ozone exposure. *Plant J* **40**: 512-522
- Allen G, Muir S, Sanders D** (1995) Release of Ca^{2+} from individual plant vacuoles by both InsP3 and cyclic ADP-ribose. *Science* **298**: 735-737
- Allen GJ, Chu SP, Schumacher K, Shimazaki CT, Vafeados D, Kemper A, Hawke SD, Tallman G, Tsien RY, Harper JF, Chory J, Schroeder JI** (2000) Alteration of Stimulus-Specific Guard Cell Calcium Oscillations and Stomatal Closing in *Arabidopsis det3* Mutant. *Science* **289**: 2338-2342
- Alonso JM, Hirayama T, Roman G, Nourizadeh S, Ecker JR** (1999) EIN2, a Bifunctional Transducer of Ethylene and Stress Responses in *Arabidopsis*. *Science* **284**: 2148-2152
- Altuzar, V, Pacheco, M, Tomas, SA, Arriaga, JL, Zelaya-Angel, O, Sanchez-Sinencio, F** (2001) Analysis of ethylene concentration in the Mexico City atmosphere by photoacoustic spectroscopy. *Anal Sci* **17**: S541-S543
- Anderson J, Huprikar S, Kochian L, Lucas W, Gaber R** (1992) Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 3736-3740
- Anderson N, Maller J, Tonks N, Sturgill T** (1990) Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature* **343**: 651-653
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 373-399
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J** (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**: 977-983
- Assmann SM, Simoncini L, Schroeder JI** (1985) Blue light activates electrogenic ion pumping in

guard cell protoplasts of *Vicia faba*. **318**: 285-287

Avsian-Kretchmer O, Gueta-Dahan Y, Lev-Yadun S, Gollop R, Ben-Hayyim G (2004) The Salt-Stress Signal Transduction Pathway That Activates the *gpx1* Promoter Is Mediated by Intracellular H₂O₂, Different from the Pathway Induced by Extracellular H₂O₂. *Plant Physiology* **135**: 1685-1696

Beaudoin N, Serizet C, Gosti F, Giraudat J (2000) Interactions between Abscisic Acid and Ethylene Signaling Cascades. *Plant Cell* **12**: 1103-1116

Bechtold N, Ellis J, Pelletier G. 1993. In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences, Paris, Life Sciences* **316**: 1194-1199

Bevan M (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research* **12**: 8711-8721

Beyer EM 1976. A potent inhibitor of ethylene action. *Plant Physiology* **58**, 268-271.

Blackman, PG, Davies, WJ (1983) The effects of cytokinins and ABA on stomatal behaviour of maize and *Commelina*. *J Exp Bot* **34**: 1619-1626

Blatt M (1992) K⁺ channels of stomatal guard cells. Characteristics of the inward rectifier and its control by pH. *J. Gen. Physiol.* **99**: 615-644

Blatt MR, Armstrong F (1993) K⁺ Channels of stomatal guard-cells - abscisic-acid-evoked control of the outward rectifier mediated by cytoplasmic Ph. *Planta* **191**: 330-341

Bleecker AB, Kende H (2000) ETHYLENE: A Gaseous Signal Molecule in Plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **16**: 1-18

Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, Ed 1st. American Society of Plant Physiologists

Burnett EC, Desikan R, Moser RC, Neill SJ (2000) ABA activation of an MBP kinase in *Pisum sativum* epidermal peels correlates with stomatal responses to ABA. *J Exp Bot* **51**: 197-205

Calderini O, Glab N, Bergounioux C, Heberle-Bors E, Wilson C (2001) A Novel Tobacco

- Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase Kinase, NtMEK1, Activates the Cell Cycle-regulated p43Ntf6 MAP Kinase. *J Biol Chem* **276**: 18139-18145
- Cecil AA, Klemsz MJ** (2004) p38 activation through Toll-like receptors modulates IFN- γ -induced expression of the Tap-1 gene only in macrophages. *J Leukoc Biol* **75**: 560-568
- Chae HS, Faure F, Kieber JJ** (2003) The *eto1*, *eto2*, and *eto3* Mutations and Cytokinin Treatment Increase Ethylene Biosynthesis in Arabidopsis by Increasing the Stability of ACS Protein. *Plant Cell* **15**: 545-559
- Chang C, Bleecker AB** (2004) Ethylene Biology. More Than a Gas. *Plant Physiology* **136**: 2895-2899
- Chang L, Karin M** (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**: 37-40
- Chen J-G, Pandey S, Huang J, Alonso JM, Ecker JR, Assmann SM, Jones AM** (2004) GCR1 Can Act Independently of Heterotrimeric G-Protein in Response to Brassinosteroids and Gibberellins in Arabidopsis Seed Germination. *Plant Physiology* **135**: 907-915
- Chen YL, Huang RF, Xiao YM, Lu P, Chen J, Wang XC** (2004) Extracellular calmodulin-induced stomatal closure is mediated by heterotrimeric G protein and H₂O₂. *Plant Physiology* **136**: 4096-4103
- Chen Z, Gallie DR** (2004) The Ascorbic Acid Redox State Controls Guard Cell Signaling and Stomatal Movement. *Plant cell* **16**: 1143-1162
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735-743
- Cominelli E, Galbiati M, Vavasseur A, Conti L, Sala T, Vuylsteke M, Leonhardt N, Dellaporta S, Tonelli C** (2005) A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance. *Curr Biol* **15**: 1196-1200
- Crews C, Erikson R** (1992) Purification of a Murine Protein-Tyrosine/Threonine Kinase that Phosphorylates and Activates the Erk-1 Gene Product: Relationship to the Fission Yeast *byr1* Gene Product. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 8205-8209
- Das, VSR, Rao, IM, Raghavendra, AS** (1976) Reversal of abscisic acid-induced stomatal closure by

benzyladenine. *New Phytol* **76**: 449-452

Deblaere R, Bytebier B, De Greve H, Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, Leemans J (1985)

Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*- mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.* **13**: 4777-4788

Desikan R, Cheung M-K, Bright J, Henson D, Hancock JT, Neill SJ (2004) ABA, hydrogen

peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *J Exp Bot* **55**: 205-212

Desikan R, Cheung MK, Clarke A, Golding S, Sagi M, Fluhr R, Rock C, Hancock J, Neill S

(2004) Hydrogen peroxide is a common signal for darkness- and ABA- induced stomatal closure in *Pisum sativum*. *Functional Plant Biology* **31**: 913-920

Dietrich P, Hedrich R (1994) Interconversion of fast and slow gating modes of GCAC1, a guard

cell anion channel. *Planta* **195**: 301-304

Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR (1980) Broad Host Range DNA Cloning System for

Gram-Negative Bacteria: Construction of a Gene Bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 7347-7351

Dodd I (2003) Hormonal Interactions and Stomatal Responses. *Journal of Plant Growth Regulation*

22: 32-46

Droillard M, Boudsocq M, Barbier-Brygoo H, Lauriere C (2002) Different protein kinase families

are activated by osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana* cell suspensions. Involvement of the MAP kinases AtMPK3 and AtMPK6. *FEBS Lett* **527**: 43-50

Eckert M, Kaldenhoff R (2000) Light-induced stomatal movement of selected *Arabidopsis thaliana*

mutants. *J Exp Bot* **51**: 1435-1442

Edwards D, Kerp H, Hass H (1998) Stomata in early land plants: an anatomical and

ecophysiological approach. *J Exp Bot* **49**: 255-278

Ekengren SK, Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar SP, Martin GB (2003) Two MAPK cascades, NPR1,

and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. *The Plant J* **36**: 905-917

- Eyers P, Craxton M, Morrice N, Cohen P, Goedert M** (1998) Conversion of SB 203580-insensitive MAP kinase family members to drug-sensitive forms by a single amino-acid substitution. *Chem Biol* **5**: 321-328
- Fan L, Zhao Z, Assmann S** (2004) Guard cells: a dynamic signaling model. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 537-546
- Foyer CH, Noctor G** (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* **17**: 1866-1875
- Garcia-Mata C, Gay R, Sokolovski S, Hills A, Lamattina L, Blatt MR** (2003) Nitric oxide regulates K⁺ and Cl⁻ channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 11116-11121
- Ghassemian M, Nambara E, Cutler S, Kawaide H, Kamiya Y, McCourt P** (2000) Regulation of Abscisic Acid Signaling by the Ethylene Response Pathway in Arabidopsis. *Plant cell* **12**: 1117-1126
- Gilroy S, Trewavas A** (2001) Signal processing and transduction in plant cells: the end of the beginning? *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 307-314
- Goh C, Nam H, Park Y** (2003) Stress memory in plants: a negative regulation of stomatal response and transient induction of rd22 gene to light in abscisic acid-entrained Arabidopsis plants. *Plant J* **36**: 240-255
- Gomi K, Ogawa D, Katou S, Kamada H, Nakajima N, Saji H, Soyano T, Sasabe M, Machida Y, Mitsuhara I, Ohashi Y, Seo S** (2005) A Mitogen-Activated Protein Kinase NtMPK4 Activated by SIPKK Is Required for Jasmonic Acid Signaling and Involved in Ozone Tolerance via Stomatal Movement in Tobacco. *Plant Cell Physiol* (en prensa).
- Grichko VP, Glick BR** (2001) Ethylene and flooding stress in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **39**: 1-9
- Gum RJ, McLaughlin MM, Kumar S, Wang Z, Bower MJ, Lee JC, Adams JL, Livi GP, Goldsmith EJ, Young PR** (1998) Acquisition of Sensitivity of Stress-activated Protein Kinases to the p38 Inhibitor, SB 203580, by Alteration of One or More Amino Acids within the ATP Binding

Pocket. *J Biol Chem* **273**: 15605-15610

Guo F-Q, Young J, Crawford NM (2003) The Nitrate Transporter AtNRT1.1 (CHL1) Functions in Stomatal Opening and Contributes to Drought Susceptibility in Arabidopsis. *Plant cell* **15**: 107-117

Guzman P, Ecker JR (1990) Exploiting the Triple Response of Arabidopsis To Identify Ethylene-Related Mutants. *Plant Cell* **2**: 513-523

Hetherington A, Brownlee C (2004) The generation of Ca(2+) signals in plants. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 401-427

Hetherington A, Woodward F (2003) The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* **424**: 901-908

Hey SJ, Bacon A, Burnett E, Neill SJ (1997) Abscisic acid signal transduction in epidermal cells of *Pisum sativum* L. Argenteum: both dehydrin mRNA accumulation and stomatal responses require protein phosphorylation and dephosphorylation. *Planta* **202**: 85-92

Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227**: 1229-1231.

Hugouvieux V, Kwak J, Schroeder J (2001) An mRNA cap binding protein, ABH1, modulates early abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *Cell* **106**: 477-487

Hunt L, Mills L, Pical C, Leckie C, Aitken F, Kopka J, Mueller-Roeber B, McAinsh M, Hetherington A, Gray J (2003) Phospholipase C is required for the control of stomatal aperture by ABA. *Plant J* **34**: 47-55

Irving H, Gehring C, Parish R (1992) Changes in Cytosolic pH and Calcium of Guard Cells Precede Stomatal Movements. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 1790-1794

Jackson MB (2002) Long-distance signalling from roots to shoots assessed: the flooding story. *J Exp Bot* **53**: 175-181

Jacob T, Ritchie S, Assmann SM, Gilroy S (1999) Abscisic acid signal transduction in guard cells is mediated by phospholipase D activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 12192-12197

- Jiang J, An GY, Wang PC, Wang PT, Han JF, Jin YB, Song CP** (2003) MAP kinase specifically mediates the ABA-induced H₂O₂ generation in guard cells of *Vicia faba* L. Chinese Science Bulletin **48**: 1919-1926
- Jonak C, Okresz L, Bogre L, Hirt H** (2002) Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. Current Opinion in Plant Biology **5**: 415-424
- Joo JH, Wang SY, Chen JG, Jones AM, Fedoroff NV** (2005) Different signaling and cell death roles of heterotrimeric G protein alpha and beta subunits in the *Arabidopsis* oxidative stress response to ozone. Plant Cell **17**: 957-970
- Kinoshita T, Shimazaki K-i** (1999) Blue light activates the plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells. EMBO J **18**: 5548-5558
- Kinoshita T, Shimazaki K-i** (2001) Analysis of the Phosphorylation Level in Guard-Cell Plasma Membrane H⁺-ATPase in Response to Fusicoccin. Plant Cell Physiol. **42**: 424-432
- Klee HJ** (2004) Ethylene Signal Transduction. Moving beyond Arabidopsis. Plant Physiology **135**: 660-667
- Knight H, Knight M** (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. Trends Plant Sci **6**: 262-267
- Kohler B, Hills A, Blatt MR** (2003) Control of Guard Cell Ion Channels by Hydrogen Peroxide and Abscisic Acid Indicates Their Action through Alternate Signaling Pathways. Plant Physiology **131**: 385-388
- Koncz C, Schell J.** 1986. The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. Molecular and General Genetics **204**, 383–396.
- Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J** (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen- activated protein kinase cascade in plants. Proc Natl Acad Sci USA **97**: 2940-2945
- Kultz D** (1998) Phylogenetic and Functional Classification of Mitogen- and Stress-Activated Protein Kinases. Journal of Molecular Evolution **46**: 571-588

- Kwak J, Kim S, Hong S, Nam H** (1997) Evaluation of 515 expressed sequence tags obtained from guard cells of *Brassica campestris*. *Planta* **202**: 9-17
- 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 J* **22**: 2623-2633
- Kyriakis J** (2001) Life-or-death decisions. *Nature* **414**: 265-266
- Leckie CP, McAinsh MR, Allen GJ, Sanders D, Hetherington AM** (1998) Abscisic acid-induced stomatal closure mediated by cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 15837-15842
- Lee S, Choi H, Suh S, Doo IS, Oh KY, Choi EJ, Taylor ATS, Low PS, Lee Y** (1999) Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. *Plant Physiology* **121**: 147-152
- Lee Y, Ho Jung Lee, Crain RC, Lee A, Korn SJ** (1994) Polyunsaturated fatty acids modulates stomatal aperture and two distinct K⁺ channel currents in guard cells. *Cellular Signalling* **6**: 181-186
- Lemichez E, Wu Y, Sanchez J-P, Mettouchi A, Mathur J, Chua N-H** (2001) Inactivation of AtRac1 by abscisic acid is essential for stomatal closure. *Genes & Dev.* **15**: 1808-1816
- Lemitri-Chlieh F, MacRobbie EAC, Brearley CA** (2000) Inositol hexakisphosphate is a physiological signal regulating K⁻ inward rectifying conductance in guard cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 8687-8692.
- Leonhardt N, Kwak JM, Robert N, Waner D, Leonhardt G, Schroeder JI** (2004) Microarray Expression Analyses of *Arabidopsis* Guard Cells and Isolation of a Recessive Abscisic Acid Hypersensitive Protein Phosphatase 2C Mutant. *Plant cell* **16**: 596-615
- Levchenko V, Konrad KR, Dietrich P, Roelfsema MRG, Hedrich R** (2005) Cytosolic abscisic acid activates guard cell anion channels without preceding Ca²⁺ signals. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 4203-4208

- Lewis T, Shapiro P, Ahn N** (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* **74**: 49-139
- Li J, Kinoshita T, Pandey S, Ng C, Gygi S, Shimazaki K, Assmann S** (2002) Modulation of an RNA-binding protein by abscisic-acid-activated protein kinase. *Nature* **418**: 793-797
- Li J, Wang X-Q, Watson MB, Assmann SM** (2000) Regulation of Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure and Anion Channels by Guard Cell AAPK Kinase. *Science* **287**: 300-303
- Liang Y, Dubos C, Dodd I, Holroyd G, Hetherington A, Campbell M** (2005) AtMYB61, an R2R3-MYB transcription factor controlling stomatal aperture in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* **15**: 1201-1206
- Limmongkon A, Giuliani C, Valenta R, Mittermann I, Heberle-Bors E, Wilson C** (2004) MAP kinase phosphorylation of plant profilin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **324**: 382-386
- Lohse G, Hedrich R** (1992) Characterization of the plasma membrane H⁺ ATPase from *Vicia faba* guard cells modulation by extracellular factors and seasonal changes. *Planta* **188**: 206–214
- Lu C, Han MH, Guevara-Garcia A, Fedoroff NV** (2002) Mitogen-activated protein kinase signaling in postgermination arrest of development by abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 15812-15817
- Luan S, Li W, Rusnak F, Assmann S, Schreiber S** (1993) Immunosuppressants Implicate Protein Phosphatase Regulation of K⁺ Channels in Guard Cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 2202-2206
- MAPK Group, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Kreis M, Zhang S, Hirt H** (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science* **7**: 301-308
- McAinsh B, Hetherington, M. R.C.A. M.** (1990) Abscisic acid-induced elevation of guard cell cytosolic Ca²⁺ precedes stomatal closure. *Nature* **343**: 186-188
- McAinsh MR, Clayton H, Mansfield TA, Hetherington AM** (1996) Changes in stomatal behavior

- and guard cell cytosolic free calcium in response to oxidative stress. *Plant Physiology* **111**: 1031-1042
- McCarty D, Chory J** (2000) Conservation and innovation in plant signaling pathways. *Cell* **103**: 201-209
- Merritt F, Kemper A, Tallman G** (2001) Inhibitors of Ethylene Synthesis Inhibit Auxin-Induced Stomatal Opening in Epidermis Detached from Leaves of *Vicia Faba* L. *Plant Cell Physiol.* **42**: 223-230
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* **9**: 490-498
- Mizoguchi T, Hayashida N, Yamaguchi-Shinozaki K, Kamada H, Shinozaki K** (1993) ATMPKs: a gene family of plant MAP kinases in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **336**: 440-444
- Mizoguchi T, Irie K, Hirayama T, Hayashida N, Yamaguchi-Shinozaki K, Matsumoto K, Shinozaki K** (1996) A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 765-769
- Mori IC, Muto S** (1997) Abscisic acid activates a 48-kilodalton protein kinase in guard cell protoplasts. *Plant Physiology* **113**: 833-839
- Morris PC** (2001) MAP kinase signal transduction pathways in plants. *New Phytologist* **151**: 67-89
- Morrison D, Davis R** (2003) Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 91-118
- Mott K, Buckley T** (2000) Patchy stomatal conductance: emergent collective behaviour of stomata. *Trends Plant Sci* **5**: 258-262
- Muller-Rober B, Ellenberg J, Provart N, Willmitzer L, Busch H, Becker D, Dietrich P, Hoth S, Hedrich R** (1995) Cloning and electrophysiological analysis of KST1, an inward rectifying K⁺ channel expressed in potato guard cells. *EMBO J* **14**: 2409-2416

- Murashige T & Skoog F** 1962 A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**, 473-497.
- Murata Y, Pei ZM, Mori IC, Schroeder J** (2001) Abscisic acid activation of plasma membrane Ca²⁺ 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
- Mustilli AC, Merlot S, Vavasseur A, Fenzi F, Giraudat J** (2002) Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* **14**: 3089-3099
- Nakagami H, Kiegerl S, Hirt H** (2004) OMTK1, a Novel MAPKKK, Channels Oxidative Stress Signaling through Direct MAPK Interaction. *J Biol Chem* **279**: 26959-26966
- Nakagami H, Pitzschke A, Hirt H** (2005) Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends Plant Sci* **10**: 339-346
- Nakamura RL, McKendree Jr WL, Hirsch RE, Sedbrook JC, Gaber RF, Sussman MR** (1995) Expression of an Arabidopsis Potassium Channel Gene in Guard Cells. *Plant Physiology* **109**: 371-374
- Newman T, de Bruijn FJ, Green P, Keegstra K, Kende H, McIntosh L, Ohlrogge J, Raikhel N, Somerville S, Thomashow M, Retzel E, Somerville C** (1994) Genes Galore: A Summary of Methods for Accessing Results from Large-Scale Partial Sequencing of Anonymous Arabidopsis cDNA Clones. *Plant Physiol.* **106**: 1241-1255
- Ng C, Carr K, McAinsh M, Powell B, Hetherington A** (2001) Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature* **410**: 596-599
- Nuhse TS, Peck SC, Hirt H, Boller T** (2000) Microbial Elicitors Induce Activation and Dual Phosphorylation of the Arabidopsis thaliana MAPK 6. *J Biol Chem* **275**: 7521-7526
- Ono K, Han J** (2000) The p38 signal transduction pathway Activation and function. *Cellular Signalling* **12**: 1-13

- Pandey S, Assmann SM** (2004) The Arabidopsis Putative G Protein-Coupled Receptor GCR1 Interacts with the G Protein {alpha} Subunit GPA1 and Regulates Abscisic Acid Signaling. *Plant cell* **16**: 1616-1632
- Payne D, Rossomando A, Martino P, Erickson A, Her J, Shabanowitz J, Hunt D, Weber M, Sturgill T** (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J* **10**: 885-892
- 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
- Peng ZY, Weyers JDB**.1994. Stomatal sensitivity to abscisic acid following water deficit stress. *J Exp Bot* **45**, 835-845
- Petersen M, Brodersen P, Naested H, Andreasson E, Lindhart U, Johansen B, Nielsen HB, Lacy M, Austin MJ, Parker JE, Sharma SB, Klessig DF, Martienssen R, Mattsson O, Jensen AB, Mundy J** (2000) *Arabidopsis* MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**: 1111-1120
- Plesch G, Ehrhardt T, Mueller-Roeber B** (2001) Involvement of TAAAG elements suggests a role for Dof transcription factors in guard cell-specific gene expression. *Plant J* **28**: 455-464
- Pozo Od, Pedley KF, Martin GB** (2004) MAPKKK{alpha} is a positive regulator of cell death associated with both plant immunity and disease. *EMBO J* **23**: 3072-3082
- Radin JW**. 1984. Stomatal responses to water stress and abscisic acid in phosphorus deficient cotton plants. *Plant Physiology* **76**: 392-394
- Radin JW, Ackerson RC**. 1981. Water relations of cotton plants under nitrogen deficiency III. Stomatal conductance, photosynthesis, and abscisic acid accumulation during drought. *Plant Physiology* **67**: 115-119
- Radin JW, Hartung W, Kimball BA, Mauney JR**. 1988. Correlation of stomatal conductance with photosynthetic capacity of cotton only in a CO₂-enriched atmosphere: mediation by abscisic acid? *Plant Physiology* **88**: 1058-1062

- Radin JW, Parker LL, Guinn G.** 1982. Water relations of cotton plants under nitrogen deficiency. V. Environmental control of abscisic acid accumulation and stomatal sensitivity to abscisic acid. *Plant Physiology* **70**: 1066-1070
- Raven JA** (2002) Selection pressures on stomatal evolution. *New Phytologist* **153**: 371–386
- Ren DT, Yang HP, Zhang SQ** (2002) Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **277**: 559-565
- Ritchie S, McCubbin A, Ambrose G, Kao T-h, Gilroy S** (1999) The Sensitivity of Barley Aleurone Tissue to Gibberellin Is Heterogeneous and May Be Spatially Determined. *Plant Physiology* **120**: 361-370
- Rodbell M** (1980) The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature* **284**: 17-22
- Rodriguez JL, Davies WJ.** 1982. The effect of temperature and ABA on stomata of *Zea mays* L. *J Exp Bot* **33**: 977-987
- Roelfsema MRG, Prins HBA** (1995) Effect of abscisic acid on stomatal opening in isolated epidermal strips of *abi* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **95**: 373-378
- Rossomando A, Payne D, Weber M, TW S** (1988) Evidence that pp. 42, a major tyrosine kinase target, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 6940–6943
- Roux PP, Blenis J** (2004) ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 320-344
- Sambrook J, MacCallum, P** (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3 ra ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Schenk PM, Kazan K, Manners JM, Anderson JP, Simpson RS, Wilson IW, Somerville SC, Maclean DJ** (2003) Systemic Gene Expression in *Arabidopsis* during an Incompatible Interaction with *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiology* **132**: 999-1010
- Schmidt C, Schelle I, Liao Y, Schroeder J** (1995) Strong Regulation of Slow Anion Channels and

- Abscisic Acid Signaling in Guard Cells by Phosphorylation and Dephosphorylation Events. Proc Natl Acad Sci USA **92**: 9535-9539
- Schroeder J, Allen G, Hugouvieux V, Kwak J, Waner D** (2001) Guard cell signal transduction. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **52**: 627-658
- Schroeder JI, Hagiwara S** (1989) Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. Nature **338**: 427-430
- 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. Plant cell **13**: 61-72
- Serrano EE, Zeiger E, Hagiwara S** (1988) Red Light Stimulates an Electrogenic Proton Pump in *Vicia* Guard Cell Protoplasts. Proc Natl Acad Sci USA **85**: 436-440
- Sharma PC, Ito A, Shimizu T, Terauchi R, Kamoun S, Saitoh H** (2003) Virus-induced silencing of WIPK and SIPK genes reduces resistance to a bacterial pathogen, but has no effect on the INF1-induced hypersensitive response (HR) in *Nicotiana benthamiana*. Molecular Genetics and Genomics **269**: 583-591
- Sharrocks AD, Yang S-H, Galanis A** (2000) Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases. Trends in Biochemical Sciences **25**: 448-453
- She XP, Song XG, He JM** (2004) Role and relationship of nitric oxide and hydrogen peroxide in light/dark-regulated stomatal movement in *Vicia faba*. Acta Botanica Sinica **46**: 1292-1300
- Sheen J** (1996) Ca²⁺-Dependent Protein Kinases and Stress Signal Transduction in Plants. Science **274**: 1900-1902
- Smith MA, Jones NMM, Page SL, Dirda MP** (1984) Pressure-Sensitive Tape and Techniques for its Removal From Paper. Journal of the American Institute for Conservation **23**: 101-103
- Snaith, PJ, Mansfield, TA** (1982) Control of the CO₂ responses of stomata by indol-3ylacetic acid and abscisic acid. J Exp Bot **33**: 360-365
- Staswick PE, Tiryaki I, Rowe ML** (2002) Jasmonate response locus JAR1 and several related

- Arabidopsis genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell* **4**: 1405–1415
- Staxen I, Pical C, Montgomery LT, Gray JE, Hetherington AM, McAinsh MR** (1999) Abscisic acid induces oscillations in guard-cell cytosolic free calcium that involve phosphoinositide-specific phospholipase C. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 1779-1784
- Sturgill T, Ray L** (1986) Muscle proteins related to microtubule associated protein-2 are substrates for an insulin-stimulatable kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **134**: 565-571
- Suhita D, Raghavendra AS, Kwak JM, Vavasseur A** (2004) Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiology* **134**: 1536-1545
- Sutton F, Paul SS, Wang X-Q, Assmann SM** (2000) Distinct Abscisic Acid Signaling Pathways for Modulation of Guard Cell versus Mesophyll Cell Potassium Channels Revealed by Expression Studies in *Xenopus laevis* Oocytes. *Plant Physiology* **124**: 223-230
- Szyroki A, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MRG, Ache P, Reintanz B, Deeken R, Godde M, Felle H, Steinmeyer R, Palme K, Hedrich R** (2001) KAT1 is not essential for stomatal opening. *PROC NATL ACAD SCI USA* **98**: 2917-2921
- Taiz L, Zeiger E** (1998) *Plant Physiology*, Ed 2nd. Sinauer Associates Inc.
- Tanaka Y, Sano T, Tamaoki M, Nakajima N, Kondo N, Hasezawa S** (2005) Ethylene Inhibits Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure in Arabidopsis. *Plant Physiology* **138**: 2337-2343
- Tanoue et al.**, 2000 A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat. Cell Biol.* **2**: 110–116
- Tardieu F, Davies WJ.** 1992. Stomatal response to abscisic acid is a function of current plant water status *Plant Physiology* **98**: 540 545
- Taylor GE Jr, Gunderson CA** (1986) The response of foliar gas exchange to exogenously applied ethylene. *Plant Physiol* **82**: 653-657

- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815
- Thiel G, Blatt MR** (1994) Phosphatase antagonist okadaic acid inhibits steady-state K⁺ currents in guard cells of *Vicia faba*. *Plant J* **5**: 727-733
- Tong L, Pav S, White D, Rogers S, Crane K, Cywin C, Brown M, Pargellis C** (1997) A highly specific inhibitor of human p38 MAP kinase binds in the ATP pocket. *Nat Struct Biol* **4**: 311-316
- Vasselon T, Detmers PA** (2002) Toll Receptors: a Central Element in Innate Immune Responses. *Infect. Immun.* **70**: 1033-1041
- Waddington, CH**, ed (1957) *The Strategy of the Genes*. Macmillan Company
- Wang KL-C, Li H, Ecker JR** (2002) Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks. *PLANT CELL* **14**: S131-151
- Wang X-Q, Ullah H, Jones AM, Assmann SM** (2001) G Protein Regulation of Ion Channels and Abscisic Acid Signaling in *Arabidopsis* Guard Cells. *Science* **292**: 2070-2072
- Wang J, Zhang S, Stacey G** (2004) Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway in *Arabidopsis* by chitin. *Mol Plant Pathol* **5**: 125-135
- Ward JM, Pei ZM, Schroeder JI** (1995) Roles of Ion Channels in Initiation of Signal Transduction in Higher Plants. *Plant cell* **7**: 833-844
- Webb A, Hetherington AM** (1997) Convergence of the Abscisic Acid, CO₂, and Extracellular Calcium Signal Transduction Pathways in Stomatal Guard Cells. *Plant Physiology* **114**: 1557-1560
- Weyers JDB, Paterson NW** (2001) Plant hormones and the control of physiological processes. *New Phytologist* **152**: 375-407
- Yoshioka H, Numata N, Nakajima K, Katou S, Kawakita K, Rowland O, Jones JDG, Doke N** (2003) *Nicotiana benthamiana* gp91phox Homologs NbrbohA and NbrbohB Participate in H₂O₂ Accumulation and Resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant cell* **15**: 706-718

- Young PR, McLaughlin MM, Kumar S, Kassis S, Doyle ML, McNulty D, Gallagher TF, Fisher S, McDonnell PC, Carr SA, Huddleston MJ, Seibel G, Porter TG, Livi GP, Adams JL, Lee JC** (1997) Pyridinyl Imidazole Inhibitors of p38 Mitogen-activated Protein Kinase Bind in the ATP Site. *J Biol Chem* **272**: 12116-12121
- Zhang S, Liu Y, Klessig D** (2000) Multiple levels of tobacco WIPK activation during the induction of cell death by fungal elicitors. *Plant J* **23**: 339-347
- Zhang X, Wang H, Takemiya A, Song C-p, Kinoshita T, Shimazaki K-i** (2004) Inhibition of Blue Light-Dependent H⁺ Pumping by Abscisic Acid through Hydrogen Peroxide-Induced Dephosphorylation of the Plasma Membrane H⁺-ATPase in Guard Cell Protoplasts. *Plant Physiology* **136**: 4150-4158
- Zhang X, Zhang L, Dong F, Gao J, Galbraith DW, Song C-P** (2001) Hydrogen Peroxide Is Involved in Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure in *Vicia faba*. *Plant Physiology* **126**: 1438-1448
- Zhang X, Zhang L, Dong FC, Gao JF, Galbraith DW, Song CP** (2001) Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Physiology* **126**: 1438-1448