

UNIVERSITAT JAUME I

Escuela Superior de Tecnología y Ciencias Experimentales



MÁSTER UNIVERSITARIO EN INVESTIGACIÓN Y
BIOTECNOLOGÍA AGRARIAS

**Participación del ABA en la respuesta de las plantas a la
combinación de sequía y calor**

Estudiante: Damián Balfagón Sanmartín

Tutor: Aurelio Gómez Cadenas
Sara Izquierdo Zandalinas

Convocatoria: Julio 2016

Índice

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Estrés abiótico en plantas.....	3
1.2. ABA, principal hormona de respuesta a estrés abiótico	4
1.2.1. Biosíntesis y metabolismo del ABA	4
1.2.2. Señalización mediada por ABA.....	6
1.3. Combinación de diferentes estreses abióticos.....	8
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1. Material vegetal, condiciones de cultivo y tratamientos de estrés	11
3.2. Características de crecimiento.....	12
3.3. Transpiración y conductancia estomática	12
3.4. Análisis hormonal	12
3.5. Análisis estadístico	13
4. RESULTADOS	14
4.1. Crecimiento de las plantas.....	14
4.2. Transpiración y conductancia estomática	18
4.3. Contenido hormonal	19
5. DISCUSIÓN	22
6. CONCLUSIONES	27
7. BIBLIOGRAFÍA.....	28

1. Introducción

1.1. *Estrés abiótico en plantas*

Las plantas, debido su carácter inmóvil, están sometidas frecuentemente a condiciones desfavorables ocasionadas por alteraciones en el medio ambiente que modifican su desarrollo óptimo. Mediante la selección natural, las plantas han desarrollado una serie de mecanismos que les permiten sobrevivir en estas situaciones adversas.

El concepto de estrés es una noción relativa que depende del tipo de planta y de las condiciones medioambientales específicas que se consideren. Por ejemplo, el déficit hídrico es uno de los estreses más perjudiciales y extendidos. Sin embargo, las xerofitas no sólo han colonizado los ambientes áridos, sino que éstos constituyen el hábitat más adecuado para ellas. En estas especies, la presencia de humedad relativa alta puede llegar a ser perjudicial y, por tanto, convertirse en una situación de estrés.

Hay diversas condiciones medioambientales adversas que pueden provocar estrés en la planta: la sequía, la salinización del suelo y/o del agua de riego, las temperaturas extremas, el viento fuerte, el encharcamiento del suelo, etc. El constante cambio climático, especialmente agravado por actividades antropogénicas, ha conducido a incrementos de las emisiones de CO₂ y de la temperatura, agudizando el deterioro de la agricultura (IPCC 2014). En este escenario climático, las plantas deben hacer frente a un amplio rango de estreses medioambientales, que cuando ocurren simultáneamente pueden tener consecuencias severas. Las condiciones desfavorables producen en las plantas dos tipos de alteraciones principales: respuestas y adaptaciones. El término respuesta se define como cualquier alteración que se produce en las plantas como consecuencia de un estrés, mientras que el concepto de adaptación es más restringido y se refiere a aquellas modificaciones heredables que aumentan la probabilidad de que una planta sobreviva y se reproduzca en un ambiente particular.

Las repuestas de la planta dependen del genotipo y del estado de desarrollo de la misma en el momento del estrés, de la duración y la severidad del mismo y de los factores ambientales que lo provoquen. La mayoría de las respuestas y adaptaciones parecen estar reguladas por los niveles hormonales y por los cambios en la sensibilidad frente a ellos. De forma general, se considera que las fitohormonas forman parte del

mecanismo de transmisión de la señal producida por los estímulos ambientales (Davies and Zhang 1991).

1.2. ABA, principal hormona de respuesta a estrés abiótico

Las fitohormonas son compuestos naturales de las plantas que tienen un papel esencial en las respuestas al estrés abiótico (Peleg and Blumwald 2011, De Ollas et al. 2013, Miura and Tada 2014, Yoshida et al. 2014). Entre ellas, el ácido abscísico (ABA) se considera el principal regulador de las respuestas de las plantas al déficit hídrico o salinidad ya que promueve la reducción del crecimiento, la senescencia foliar, el cierre estomático, el ajuste osmótico, el aumento de la conductividad de las raíces y la inducción génica (Zeevaart and Creelman 1988, Skriver 1990). Los cambios hormonales, en general, causan una reducción del crecimiento y un incremento de la tolerancia al estrés. Se puede establecer un paralelismo entre los efectos opuestos de las hormonas vegetales sobre el crecimiento y la tolerancia al estrés. Aparentemente, la tolerancia al estrés es incompatible con el crecimiento óptimo y este antagonismo está coordinado por diferentes rutas de transducción de la señal hormonal.

1.2.1. Biosíntesis y metabolismo del ABA

La biosíntesis de ABA se inicia en los plástidos y tiene como precursor un carotenoide C_{40} , la zeaxantina. A su vez, la zeaxantina se transforma en anteraxantina y, posteriormente, la anteraxantina se convierte en violaxantina a través de la enzima zeaxantina epoxidasa. La enzima 9-*cis*-epoxycarotenoide dioxigenasa actúa sobre isómeros de violaxantina, produce una escisión en la molécula y la transforma en xantonina. La xantonina, a su vez, se oxida en AB-aldehído por la acción de la xantonina oxidasa en el citoplasma, y seguidamente, por la acción de la enzima AB-aldehído oxidasa, se oxida para formar la molécula activa de ABA (Fig. 1). Entre los mutantes de *Arabidopsis thaliana* de la biosíntesis del ABA destacan *aba1-1*, *aba3* y *aba4*, deficientes en la síntesis de violaxantina por la mutación presente en el gen de la zeaxantina epoxidasa. En el mutante *aba1-1*, por ejemplo, la biosíntesis de ABA es aproximadamente del 3% de la acumulada en el genotipo silvestre (Assmann et al. 2000).

La inactivación del ABA tiene lugar a partir de vías metabólicas en las que el ABA puede ser conjugado o catabolizado. En la mayoría de tejidos, la inactivación catabólica del ABA se lleva a cabo a través de la hidroxilación en la posición 8' para formar un intermediario inestable, el 8'-hidroxi-ABA, el cual posteriormente se cicla espontáneamente (y/o enzimáticamente) para formar ácido faseico (PA). El PA puede ser reducido en la posición 4' para formar ácido dehidrofaseico (DPA). En este proceso actúan la enzima citocromo P450 ABA 8'-hidroxalasa, en primer lugar, y la enzima ácido faseico reductasa para la consiguiente formación de DPA. Además, se forman cantidades pequeñas de otros metabolitos que proceden del ABA, como el 7'-hidroxi-ABA o el 1',4'-diol-ABA. Por otra parte, el ABA puede ser conjugado a una molécula de glucosa por la acción de la ABA UDP-glucosiltransferasa (UGT) para producir ABA-GE, considerado una forma de almacenamiento o transporte de ABA que se acumula en la vacuola y el apoplasto. El ABA-GE puede ser convertido de nuevo en ABA mediante la actividad hidrolítica de las enzimas B-glucosidasa 1 y 2 (BG1 y BG2) (Fig. 1). Así, la ruta de conjugación del ABA se considera una vía de acumulación rápida ABA activo.

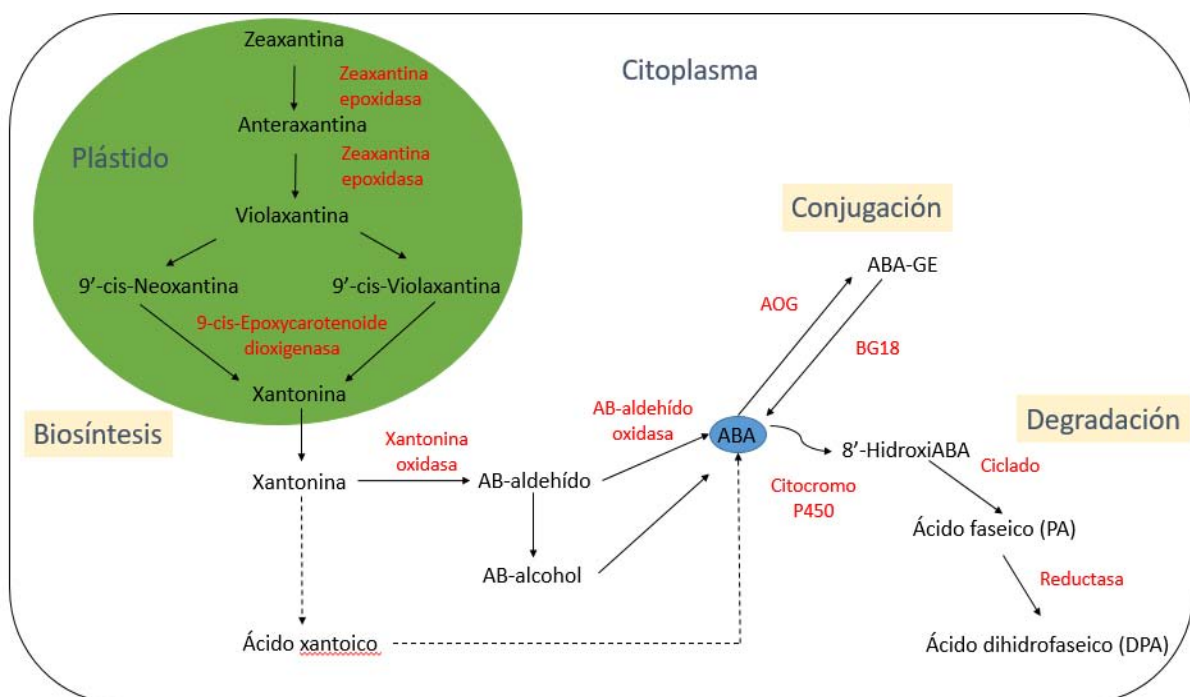


Fig. 1. Esquema del metabolismo del ABA en plantas: biosíntesis, conjugación y degradación. Las principales enzimas de las rutas aparecen en rojo, mientras que los compuestos intermediarios son presentados en negro.

1.2.2. Señalización mediada por ABA

Existen tres componentes principales en la señalización mediada por ABA aguas arriba: los receptores de ABA PYR/PYL/RCAR (Pyrabactin Resistance/Pyrabactin Resistance-Like/Regulatory Component of ABA Receptors), la proteína fosfatasa tipo 2C (PP2C; regulador negativo) y la proteína SNF1 quinasa 2 (SnRK2; regulador positivo). En ausencia de ABA, PP2C inactiva SnRK2 por desfosforilación. En respuesta a un estímulo ambiental, el ABA interacciona con los receptores PYR/PYL/RCAR y este conjunto se une a PP2C, inhibiendo su actividad. La inhibición de PP2C permite la actividad quinasa de SnRK2, que a su vez fosforila y activa a factores de transcripción tipo bZIP o proteínas de membrana (Fig. 2). Este complejo de señalización puede formarse tanto en el citoplasma como en el núcleo celular (Umezawa et al. 2010). Se conocen numerosos reguladores transcripcionales que son diana de la señalización del ABA y comprenden factores de transcripción tipo dominio básico de cremallera de leucina (bZIP), tipo dominio básico Hélice-Loop-Hélice (bHLH), o proteínas homeodominio (HD) con dominios cremallera de leucina (HD-Zip). El ABA está implicado en la regulación transcripcional de genes relacionados principalmente con la tolerancia de las plantas a distintos estreses abióticos. Muchos de los genes regulados por ABA contienen secuencias conservadas en sus promotores llamadas ABRE (ABA-responsive elements; PyACGTGG/TC), típicamente reconocidas por factores de transcripción tipo bZIP (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2007, Umezawa et al. 2010, Nakashima and Yamaguchi-Shinozaki 2013). Las proteínas de unión a secuencias ABRE (AREB) o también llamados factores ABRE-binding (ABFs) son factores de transcripción tipo bZIP. Entre la subfamilia de bZIP del grupo A, los factores de transcripción AREB1/ABF2, AREB2/ABF4 y ABF3 son inducidos por deshidratación, salinidad y tratamiento de ABA en tejidos vegetativos y son considerados proteínas clave que cooperativamente regulan la expresión de genes ABRE-dependientes en la señalización mediada por ABA en condiciones de estrés (Yoshida et al. 2010).

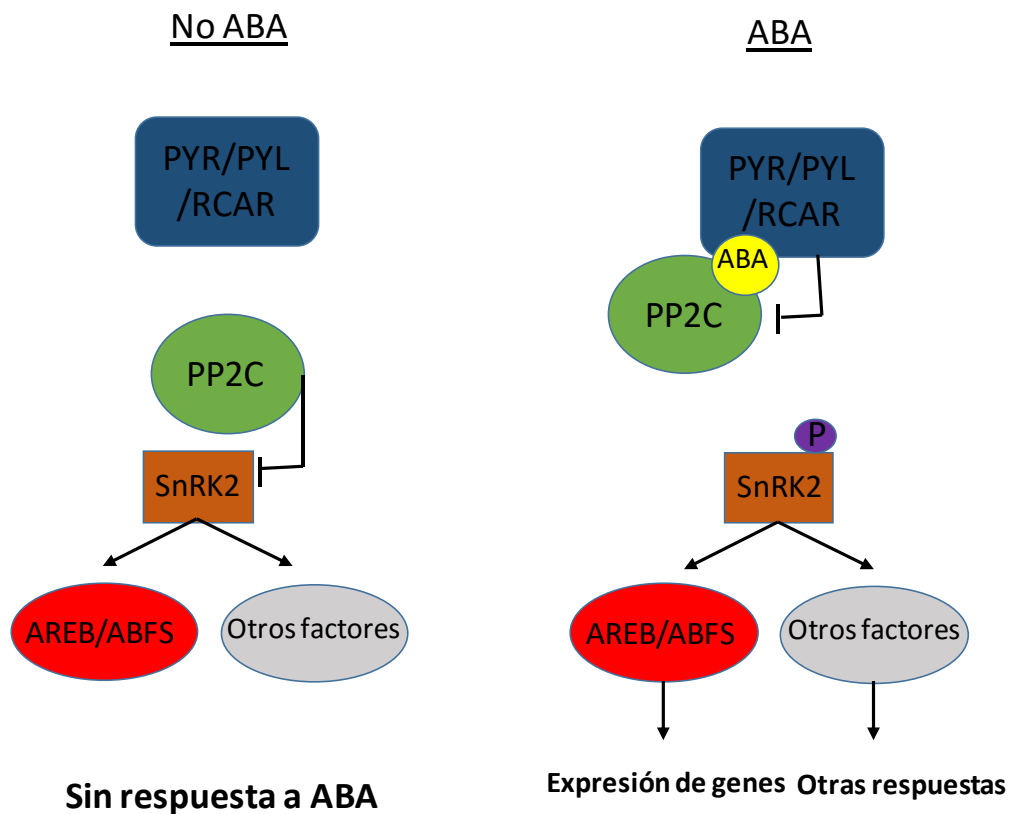


Fig. 2. Visualización esquemática de la señalización mediada por ABA. PYR/PYL/RCAR (Pyrobactin resistance 1/ Pyrabactin resistance 1-like/ Regulatory Component of ABA Receptor), PP2C (Phosphatase Protein 2C type), SnRK2 (Serine/threonine-protein Kinase 2), AREB/ABFs (ABA-binding proteins/ ABA-binding factors).

Estudios realizados con el mutante de *Arabidopsis thaliana* insensible a ABA (*abi1-1*) han permitido profundizar en la señalización mediada por esta hormona en las células guarda (Koornneef et al. 1984, Merlot et al. 2001). ABI1 es una fosfatasa PP2C cuya función principal se encuentra en las células guarda mediando la señalización dependiente de ABA dirigida al cierre estomático bajo ciertas condiciones de déficit hídrico (Merlot et al. 2001). La mutación de ABI1 se encuentra en su dominio catalítico y consiste en un cambio de amino ácido de glicina a aspartato. Este mutante presenta una fuerte reducción de la actividad catalítica de la PP2C ABI1, de forma que la SnRK2, principalmente OST1, queda constitutivamente inactivada, incluso en presencia ABA unido a receptores PYL/PYR/RCAR. De este modo, el mutante *abi1-1* mantiene un estado negativo en la señalización mediada por ABA en las células guarda (Moes et al. 2008), de forma que los procesos que participan en el cierre estomático, como la

producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) a partir de proteínas RBOH, la activación de canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática y de canales iónicos SLAC1, están inactivos de forma constitutiva (Munemasa et al. 2011, Daszkowska-Golec and Szarejko 2013). Estudios anteriores han sugerido que el ácido jasmónico (JA) podría estar implicado en las respuestas estomáticas a estreses abióticos (Munemasa et al. 2011, Daszkowska-Golec and Szarejko 2013, Murata et al. 2015) y que la producción de ROS en células guarda depende también de los jasmonatos. De este modo, los jasmonatos interaccionan con la ruta de señalización del ABA incrementando el flujo de Ca^{2+} (Munemasa et al. 2011, Daszkowska-Golec and Szarejko 2013). Además de JA, el ácido salicílico (SA) podría promover cierre estomático induciendo la acumulación de ROS y la inactivación de canales de K^+ en células guarda (Khokon et al. 2011).

1.3. Combinación de diferentes estreses abióticos

Bajo condiciones normales, las plantas están sometidas a la combinación de diferentes estreses abióticos (Mittler 2006, Mittler and Blumwald 2010, Suzuki et al. 2014). Estudios recientes han demostrado que las respuestas fisiológicas y moleculares de las plantas a distintas combinaciones de estreses abióticos son específicas, no siendo resultado de la suma de los efectos de los estreses individuales. (Mittler and Blumwald 2010, Suzuki et al. 2014, Boeck et al. 2015, Hu et al. 2015, Liu et al. 2015, Zhang et al. 2015). Por lo tanto, el estudio de las respuestas de las plantas a la combinación de estreses es de vital importancia para el desarrollo de plantas tolerantes a la combinación de éstos. La sequía y las altas temperaturas representan una de las combinaciones de estrés más frecuentes que ocurren en la naturaleza (Savin and Nicolas 1996, Jiang and Huang 2001, Mittler 2006, Craufurd et al. 2008, Boeck et al. 2015). Estudios previos han mostrado que el transcriptoma de plantas sometidas a la combinación de sequía y altas temperaturas es diferente al de plantas sometidas a estas condiciones por separado (Rizhsky et al. 2002, Rizhsky et al. 2004, Mittler 2006), sugiriendo que el desarrollo de cultivos tolerantes a las distintas combinaciones de estreses abióticos requiere un estudio más detallado del impacto de estas condiciones ambientales sobre las plantas y cultivos (Mittler and Blumwald 2010).

Estudios anteriores han demostrado que mutantes deficientes en la biosíntesis de ABA (*aba1-1*) o en la señalización de ABA (*abi1-1*) resultan ser significativamente más sensibles a la combinación de salinidad y altas temperaturas con respecto al genotipo silvestre Ler (Suzuki et al. 2016), sugiriendo que el ABA podría estar implicado en la aclimatación de las plantas a condiciones combinadas de estrés abiótico. Sin embargo, se desconoce si esta implicación está relacionada con la función del ABA en la regulación de la expresión génica durante la combinación de estreses, o refleja el papel de esta hormona en la regulación de la apertura estomática durante el estrés. Así pues, en este trabajo se pretende elucidar el papel del ABA durante la combinación de sequía y calor y profundizar en la respuesta estomática de las plantas ante la combinación de estos factores abióticos.

2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es determinar el papel del ABA en las respuestas de las plantas a la combinación de sequía y calor. Para ello, se han establecido los siguientes objetivos parciales:

- a) Evaluar el impacto de la combinación de sequía y calor en plantas de *Arabidopsis thaliana* deficientes (*aba1-1*) e insensibles (*abi1-1*) a ABA respecto al genotipo silvestre (Ler).
- b) Estudiar la implicación de la apertura estomática en la respuesta de las plantas a la combinación de sequía y calor.
- c) Establecer las posibles relaciones hormonales en la respuesta de las plantas a la combinación de sequía y calor.

3. Materiales y métodos

3.1 Material vegetal, condiciones de cultivo y tratamientos de estrés

Plantas de *Arabidopsis thaliana* Ler (cv Landsberg erecta), *aba1-1* y *abi1-1* (Assmann et al. 2000) fueron cultivadas en macetas de 240 cm² usando como sustrato una mezcla de turba:perlita (80:20) bajo condiciones controladas en cámaras de cultivo: ciclo 22°C/18°C y 8h/16h luz/oscuridad, intensidad lumínica de 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y humedad relativa del 70%. Todos los tratamientos de estrés fueron realizados en paralelo. El déficit hídrico se aplicó retirando el riego a plantas de 10 días hasta alcanzar el 40% del peso del sustrato, normalmente a los 20-25 días. El estrés por calor se llevó a cabo manteniendo las plantas a 38 °C durante 8 horas. La combinación de déficit hídrico y calor se efectuó sometiendo a plantas en déficit hídrico a 38 °C durante 8 horas. La Fig. 3 muestra un esquema de los tratamientos de estrés llevados a cabo.

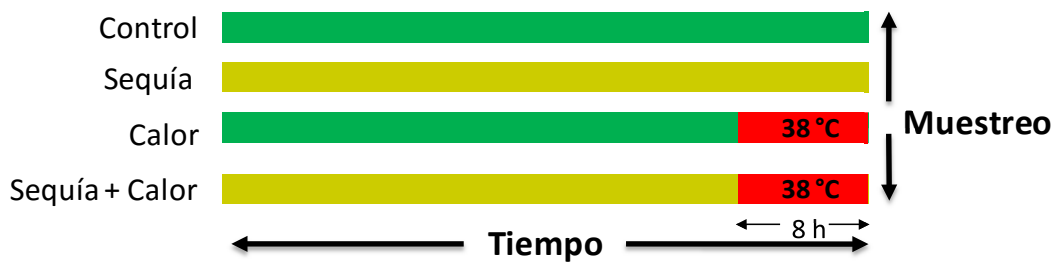


Fig. 3. Esquema de las condiciones de cultivo y los tratamientos de estrés individuales y combinados aplicados en plantas Ler, *aba1-1* y *abi1-1*.

Las rosetas de plantas Ler, *aba1-1* y *abi1-1* se muestrearon al mismo tiempo y todas las medidas fisiológicas se realizaron en paralelo. Tras los tratamientos de estrés, las plantas se recuperaron en condiciones control (22 °C/18°C y riego habitual) durante 5 días para valorar su supervivencia. La temperatura y la humedad relativa se registraron regularmente usando un USB portátil registrador de datos (OM-EL-USB-2-LCD-PLUS, OMEGA Engineering, INC., Stamford, Connecticut, USA).

3.2. Características de crecimiento

El peso fresco, peso seco y el diámetro de las rosetas se calcularon tal y como se describe en Suzuki et al. (2016). El contenido relativo de agua (RWC) se calculó pesando rosetas inmediatamente después de los tratamientos de estrés para obtener el peso fresco (FW). Las rosetas se mantuvieron en un matraz con agua durante 8-10 horas en oscuridad, permitiendo la completa hidratación, y se volvieron a pesar para obtener el peso turgente (TW). A continuación se secaron a 40°C durante 4 días y se pesaron de nuevo para obtener el peso seco (DW). Finalmente, se calculó el RWC (%) mediante la fórmula: $[(FW - DW) \times (TW - DW)^{-1}] \times 100$. Tras la recuperación de los estreses durante 5 días bajo condiciones control, se calculó el % de supervivencia de plantas silvestres Ler así como de los mutantes.

3.3. Transpiración y conductancia estomática

La transpiración y conductancia estomática se midieron en paralelo en plantas Ler, *aba1-1* y *abi1-1* sometidas a déficit hídrico, altas temperaturas y la combinación de ambos estreses usando un analizador de gas por infrarrojos portátil LCpro+ (ADC bioscientific Ltd., Hoddesdon. UK). Tras estabilizarse el instrumento, se tomaron al menos diez medidas en tres hojas distintas realizando tres réplicas para cada genotipo y tratamiento de estrés.

3.4. Análisis hormonal

La extracción y análisis de hormonas se llevaron a cabo tal y como se describe en Durgbanshi et al. (2005). La extracción se llevó a cabo a partir de 0,5 g de tejido fresco en 2 mL de agua ultrapura y 50 ng de [²H₆]-ácido abscísico, [C₁₃]-ácido salicílico y ácido dehidrojasmonico en un molinillo de bolas (MillMix20, Domel, Železniki, Slovenija). A continuación, los extractos se centrifugaron a 10000 g y 4 °C durante 10 minutos, el sobrenadante se recuperó y se ajustó el pH a 3 con 30% de ácido acético. Más tarde se realizaron dos particiones del extracto acuoso con 2 mL de dietil-éter, y finalmente la fase orgánica se recuperó y evaporó en una centrífuga de vacío (Speed Vac, Jouan, Saint Herblain Cedex, France). Una vez seco, el residuo se resuspendió en 500 µL de 10:90 MeOH:H₂O mediante sonicación. La solución resultante se filtró a través de

jeringas con membrana de 0.22 μm PTFE (Albet S.A., Barcelona, Spain) y se inyectó directamente en un sistema cromatográfico UPLC (Acquity SDS, Waters Corp., Milford, MA, USA). Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo mediante una columna de fase reversa C18 (Gravity, 50 \times 2.1 mm tamaño de partícula 1.8- μm , Macherey-Nagel GmbH, Alemania) y un gradiente de MeOH:H₂O (con 0,1% de ácido acético) a un flujo de 300 $\mu\text{L min}^{-1}$. Las hormonas se cuantificaron a partir de un espectrofotómetro de masas de triple cuadrupolo TQS (Micromass, Manchester, UK) conectado en línea a una fuente de iones tipo Z-electrospray.

3.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software Statgraphics Plus v.5.1. (Statistical Graphics Corp., Herndon, VA, United States). Los resultados presentados se evaluaron a partir de un análisis ANOVA de una cola seguido de un test posthoc Tukey cuando se detectaron diferencias significativas. Los datos hacen referencia a la media \pm SD (* $p < 0.05$).

4. Resultados

4.1. Crecimiento de las plantas

En primer lugar se analizaron los parámetros de crecimiento: peso fresco y seco de las rosetas, RWC, el diámetro y la supervivencia de plantas *Ler*, *aba1-1*, *abi1-1* sometidas a sequía (S), estrés por calor (C) y combinación de sequía y estrés por calor (S+C) (Figs. 4-9).

Las plantas *aba1-1* mostraron una reducción del peso fresco, peso seco y RWC en respuesta a sequía y a la combinación de sequía y calor respecto a *Ler*. Además, los tratamientos de sequía y combinación de estrés redujeron significativamente el diámetro de plantas *aba1-1*, en comparación con el genotipo silvestre (Figs. 4-5). La supervivencia de las plantas *Ler* y *aba1-1* fue del 100% en respuesta a los estreses individuales. Sin embargo, el 75% de las plantas *Ler* y únicamente el 43% de las plantas *aba1-1* sobrevivieron tras la combinación de sequía y calor (Fig. 6).

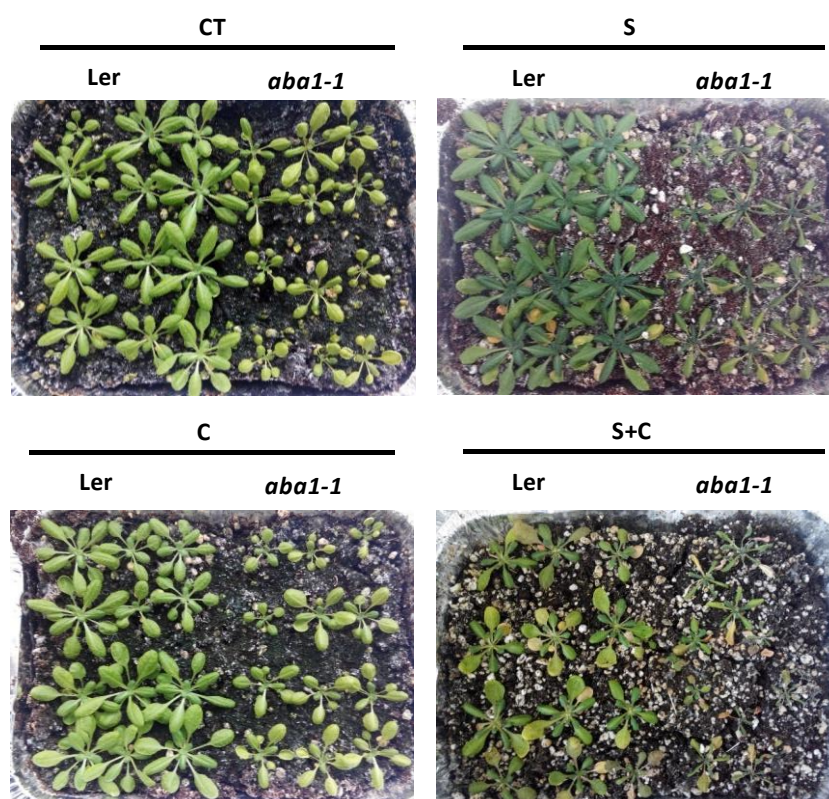


Fig. 4. Plantas *Ler* y *aba1-1* crecidas en situaciones control (CT) y sometidas a sequía (S), calor (C) y a la combinación de sequía y calor (S+C).

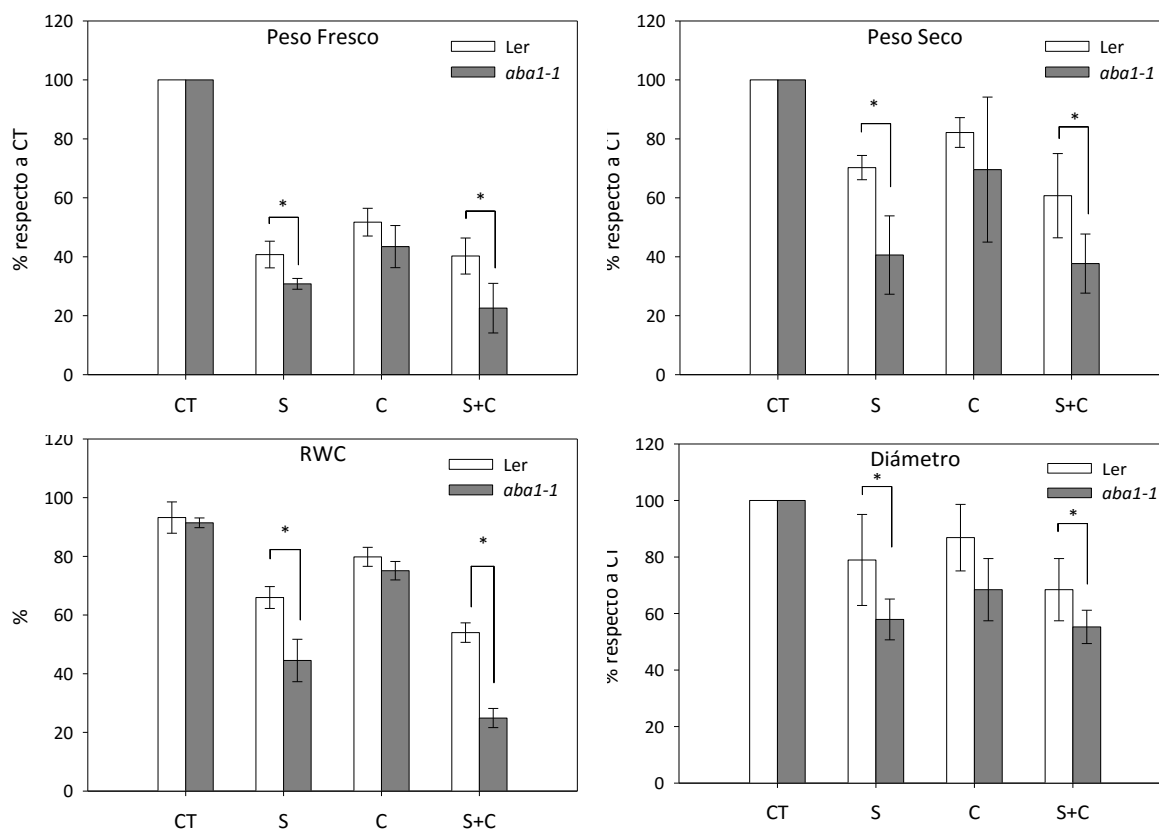


Fig. 5. Parámetros de crecimiento de las plantas *aba1-1* en respuesta a sequía (S), calor (C) y a la combinación de sequía y calor (S+C). *, diferencias significativas a $p \leq 0.05$.

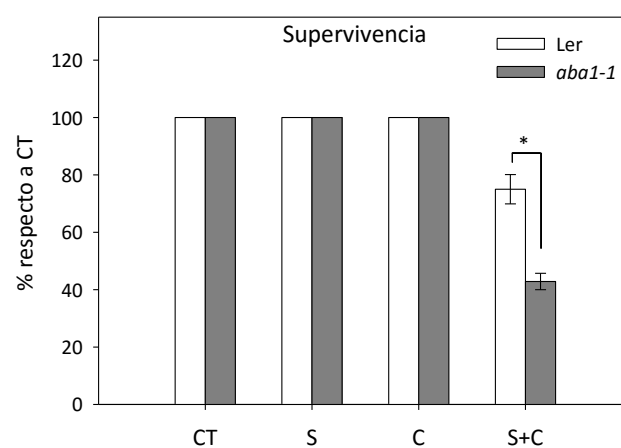


Fig. 6. Supervivencia de plantas Ler y *aba1-1* en respuesta a sequía (S), calor (C) y a la combinación de sequía y calor (S+C). *, diferencias significativas a $p \leq 0.05$.

Por otra parte, las plantas *abi1-1* mostraron una reducción significativa del peso fresco y seco en respuesta a todos los tratamientos de estrés respecto al genotipo silvestre Ler. Sin embargo, sólo se observó una reducción de RWC y diámetro en plantas *abi1-1* en respuesta a sequía aplicada de forma individual o combinada con estrés por calor con respecto a Ler (Fig. 7-8).

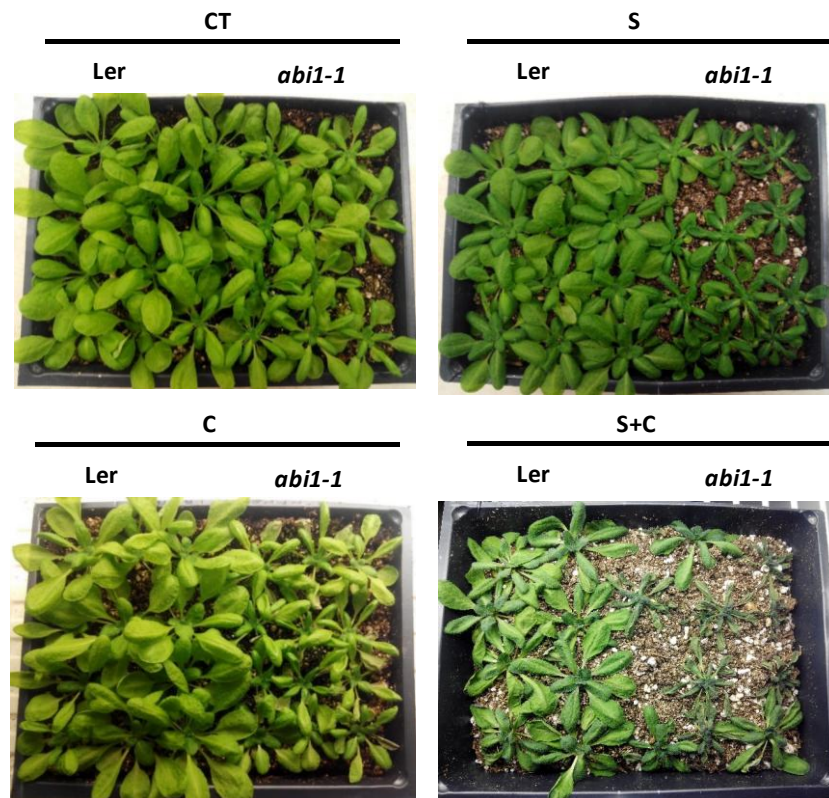


Fig. 7. Plantas Ler y *abi1-1* crecidas en situaciones control (CT) y sometidas a sequía (S), calor (C) y a la combinación de sequía y calor (S+C).

Tanto plantas silvestres Ler como *abi1-1* mostraron una supervivencia del 100% en respuesta a los estreses individuales. No obstante, mientras que la supervivencia de las plantas Ler fue del 95% en condiciones de estrés combinado, sólo alrededor del 40% de las plantas *abi1-1* sobrevivieron a este tratamiento (Fig. 9).

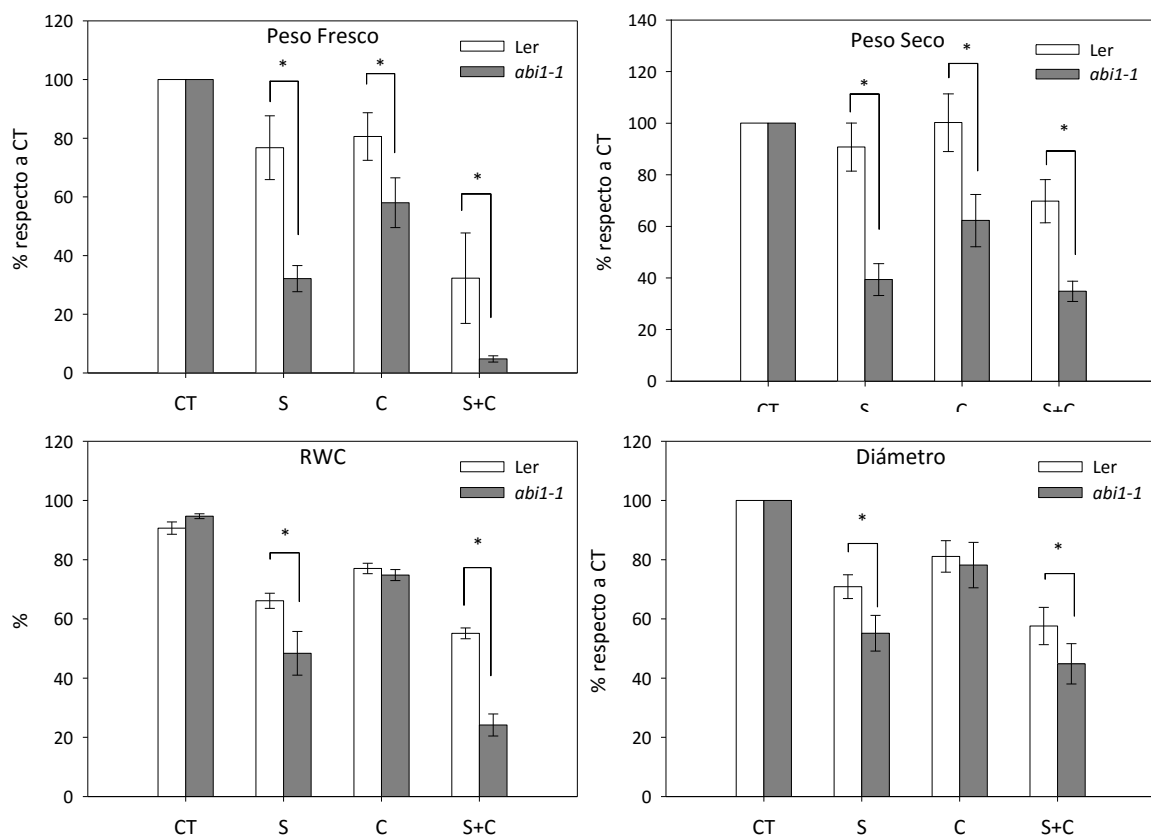


Fig. 8. Parámetros de crecimiento de las plantas *abi1-1* en respuesta a sequía (S), calor (C) y a la combinación de sequía y calor (S+C). *, diferencias significativas a $p \leq 0.05$.

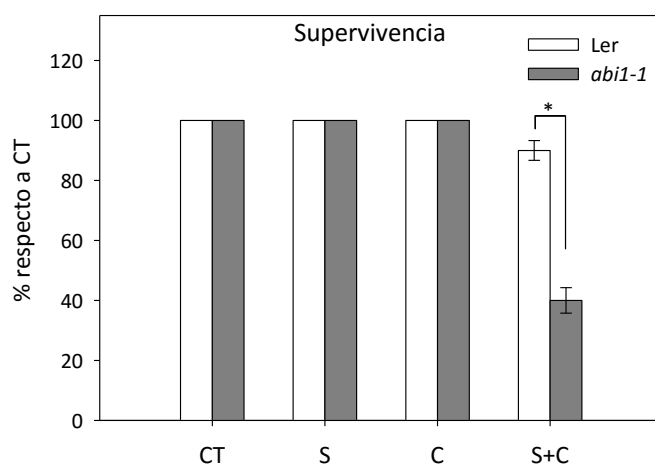


Fig. 9. Supervivencia de plantas Ler y *abi1-1* en respuesta a sequía (S), calor (C) y a la combinación de sequía y calor (S+C). *, diferencias significativas a $p \leq 0.05$.

4.2. Transpiración y conductancia estomática

Para determinar si las diferencias observadas entre la supervivencia de las plantas *aba1-1* y *abi1-1* con respecto a la del genotipo silvestre en respuesta al estrés combinado estaban relacionadas con las respuestas estomáticas, se midió la conductancia estomática (g_s) y la transpiración (E) en condiciones de sequía, estrés por calor y combinación de sequía y calor (Figs. 10-11). En general, bajo condiciones control y en respuesta a todos los estreses, la conductancia estomática y la transpiración de las plantas de *aba1-1* fue significativamente mayor que en plantas Ler. Ambos parámetros tuvieron un mismo patrón de respuesta a los distintos estreses en Ler y *aba1-1*: mientras que la sequía no tuvo un efecto marcado sobre la conductancia estomática y la transpiración de las plantas, el estrés por calor indujo un notable incremento en ambos parámetros. Finalmente, la combinación de sequía y calor indujo un descenso en los valores de conductancia estomática en ambos genotipos mientras que no indujo cambio alguno en los valores de transpiración respecto al control (Fig. 10).

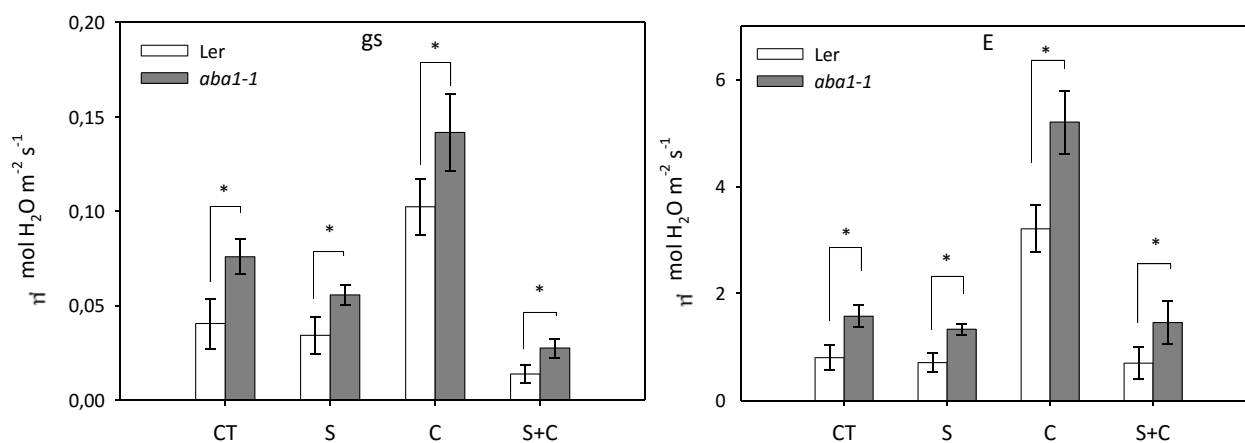


Fig. 10. Conductancia estomática (g_s) y transpiración (E) de plantas Ler y *aba1-1* en respuesta a sequía (S), calor (C) y a la combinación de sequía y calor (S+C). *, diferencias significativas a $p \leq 0.05$.

De forma similar, los valores de conductancia estomática y de transpiración fueron en general superiores en plantas *abi1-1* sometidas a los estreses individuales y en situaciones control con respecto al genotipo silvestre. Mientras que la sequía indujo una reducción ligera en ambos parámetros fisiológicos en plantas Ler y *abi1-1*, el estrés por calor incrementó sus valores por encima de niveles control. La combinación de sequía y calor redujo los valores de conductancia estomática y de transpiración hasta valores similares a los encontrados en respuesta a sequía en plantas Ler y *abi1-1*. Únicamente la transpiración en situaciones de estrés combinado fue superior a la encontrada durante la sequía en plantas *abi1-1* (Fig. 11).

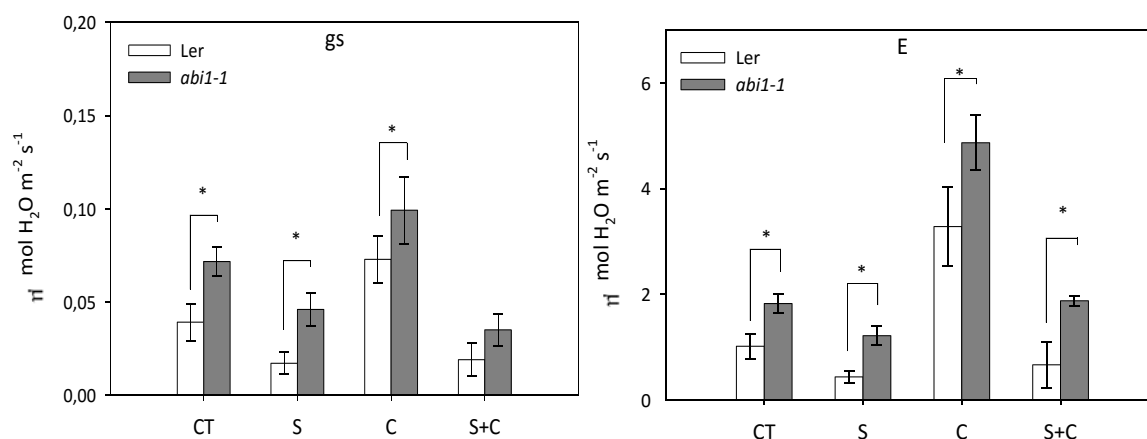


Fig. 11. Conductancia estomática (gs) y transpiración (E) de plantas Ler y *abi1-1* en respuesta a sequía (S), calor (C) y a la combinación de sequía y calor (S+C). *, diferencias significativas a $p \leq 0.05$.

4.3. Contenido hormonal

Con el fin de averiguar si las respuestas estomáticas observadas en respuesta a los estreses individuales y combinados están relacionadas con la acumulación de ABA, JA y/o SA, se midieron los niveles hormonales en las plantas Ler, *abi1-1* y *aba1-1* sometidas a los diferentes estreses (Figs. 12-13).

Los niveles de ABA en el mutante *aba1-1* fueron significativamente menores tanto en condiciones de estrés individual como combinado, así como en la situación control,

con respecto al genotipo silvestre. Además, se observó que en ambos genotipos, Ler y *aba1-1*, la acumulación de ABA fue notablemente mayor en la situación de combinación de estrés que en la situación control. Con respecto a la acumulación foliar de JA, no se observaron diferencias significativas entre las plantas Ler y *aba1-1* en condiciones control, sequía o calor. Así, los estreses individuales no tuvieron ningún efecto sobre los niveles de JA en Ler y *aba1-1*. Sin embargo, se observó una marcada acumulación de JA en plantas *aba1-1* en respuesta a la combinación de estreses, mientras que los niveles de JA permanecieron entorno a valores control en plantas Ler. Por otra parte, las plantas *aba1-1* acumularon niveles de SA significativamente superiores al genotipo silvestre en las situaciones de estrés por sequía y combinación de estreses, así como en las condiciones control. Finalmente, no se observaron diferencias significativas entre estos dos genotipos en situación de estrés por calor (Fig. 12).

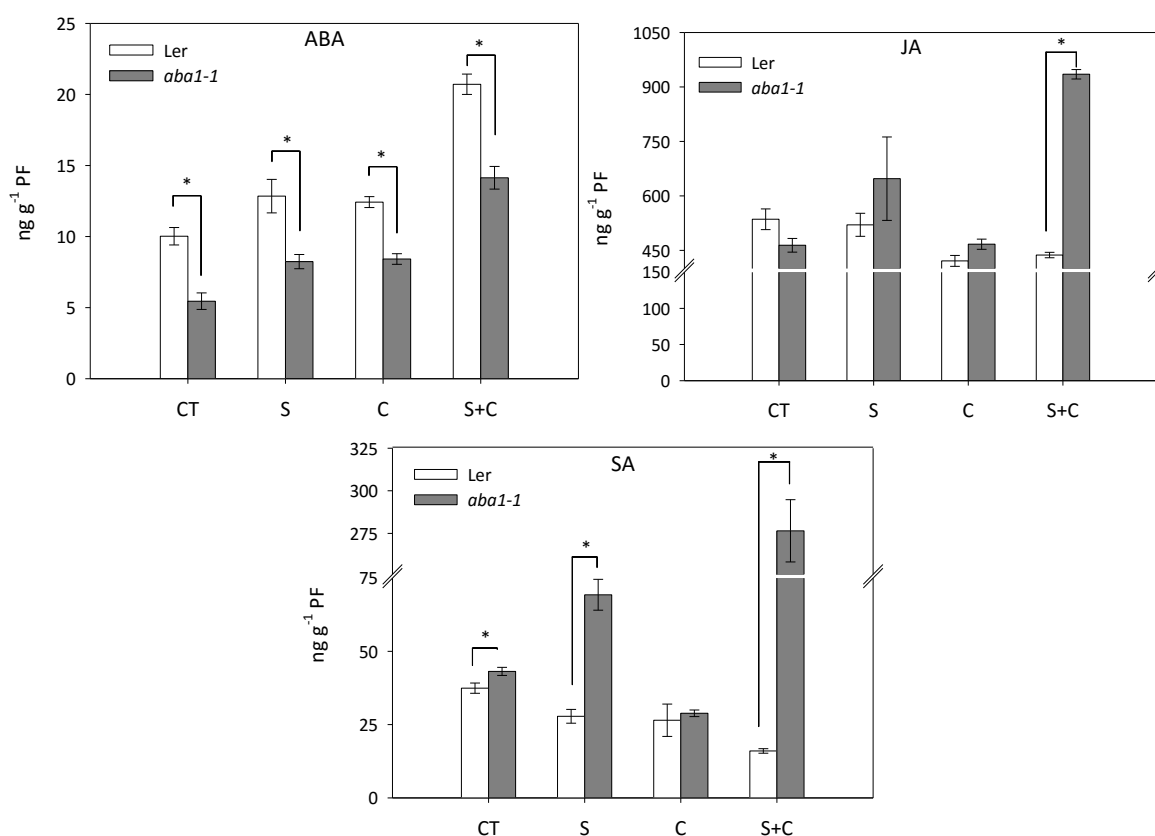


Fig. 12. Concentración de ABA, JA y SA en rosetas de plantas Ler y *aba1-1* en respuesta a sequía (S), calor (C) y a la combinación de sequía y calor (S+C). *, diferencias significativas a $p \leq 0.05$.

Como se observa en la Fig. 13, los niveles de ABA fueron significativamente más elevados en *abi1-1* que en las plantas Ler en respuesta a todos los tratamientos de estrés, especialmente en condiciones de sequía y combinación de sequía y calor. La acumulación foliar de JA fue mayor en las plantas *abi1-1* que en Ler en condiciones control, sequía y, especialmente, combinación de estrés. En cambio no hubo diferencias entre los dos genotipos en condiciones de estrés por calor. Los niveles de SA en las plantas *abi1-1* fueron significativamente mayores en todas las condiciones de estrés, así como en situaciones control, con respecto a las plantas Ler. Mientras que los valores de SA en plantas Ler se mantuvieron similares al control en todas las situaciones de estrés, en las plantas *abi1-1* los niveles aumentaron notablemente en respuesta a estrés por sequía y especialmente en combinación de sequía y calor (Fig. 13).

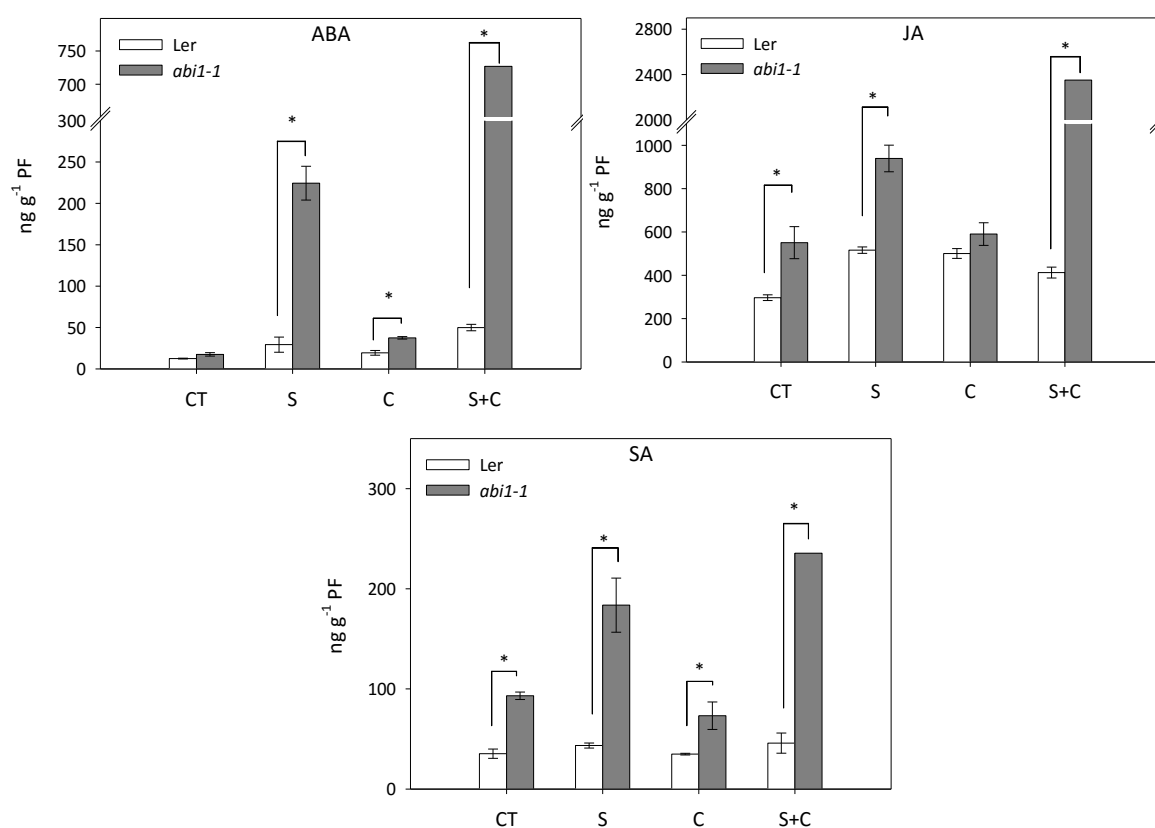


Fig. 13. Concentración de ABA, JA y SA en rosetas de plantas Ler y *abi1-1* en respuesta a sequía (S), calor (C) y a la combinación de sequía y calor (S+C). *, diferencias significativas a $p \leq 0.05$.

5. Discusión

Las plantas responden a situaciones ambientales adversas mediante cambios moleculares y fisiológicos específicos con el objetivo de minimizar los daños. La mayoría de las investigaciones de tolerancia a estreses se han centrado típicamente en el estudio de una condición ambiental adversa de forma aislada. Sin embargo, en condiciones naturales es frecuente que varios estreses abióticos ocurran de forma simultánea, generando así un estrés nuevo y único, y no una combinación aditiva de los estreses individuales (Mittler y Blumwald, 2010). Por lo tanto, el desarrollo de futuras plantas tolerantes a la combinación de estreses requerirá el conocimiento de las respuestas a múltiples factores ambientales (Suzuki et al. 2014). Concretamente, la sequía y las altas temperaturas son una de las combinaciones de estreses que más frecuentemente concurren en campo. Además, ambos factores ambientales incrementarán su incidencia en los próximos 50-100 años, afectando drásticamente a los sistemas agrícolas (IPCC, 2014).

La respuesta de las plantas a estímulos ambientales es mediada principalmente por fitohormonas, entre las que destaca el ABA. Así, tras un estímulo ambiental, se produce un aumento de los niveles de ABA y ésta, a su vez, regula el cierre estomático y la expresión de genes relacionados con las respuestas adaptativas de las plantas (Gómez-Cadenas et al. 2015).

Recientemente se ha destacado el papel del ABA en la tolerancia de las plantas a la combinación de salinidad y altas temperaturas (Suzuki et al. 2016). Concretamente, se ha comprobado que los mutantes deficientes en ABA (*aba1-1*) e insensibles a esta hormona (*abi1-1*) son más susceptibles a la combinación de salinidad y altas temperaturas que el genotipo silvestre (Ler). Sin embargo, se desconoce si esta susceptibilidad a la combinación de estreses se debe a la disfunción en la regulación estomática de estos mutantes o es resultado de la deficiencia en la expresión de genes dependientes de ABA.

Así pues, este trabajo se ha centrado en el estudio de las respuestas de mutantes deficientes en ABA (*aba1-1*) e insensibles a esta hormona (*abi1-1*) a la combinación de

sequía y altas temperaturas con el objetivo de profundizar en el papel del ABA en esta combinación de factores ambientales.

Los resultados obtenidos muestran que tanto los mutantes *aba1-1* como *abi1-1* son más susceptibles a la combinación de estrés por sequía y calor que el genotipo silvestre Ler (Figs. 4 - 9), demostrando así que el ABA tiene un papel importante en la tolerancia de las plantas a otra combinación de estreses (sequía y altas temperaturas). En este sentido, se ha observado una disminución en el peso fresco, el peso seco, el RWC y el diámetro en los mutantes *aba1-1* y *abi1-1* respecto a plantas Ler (Figs. 5, 8). Además, la supervivencia de *aba1-1* y *abi1-1* ha resultado ser un 53% y 42% menor que plantas Ler, respectivamente (Figs. 6, 9).

Estudios anteriores han sugerido que la regulación de la temperatura foliar dependiente de la transpiración juega un papel importante en la tolerancia de las plantas a la combinación de sequía y altas temperaturas (Mittler 2002, Rizhsky et al. 2004, Zandalinas et al. 2016). Por tanto, con el fin de evaluar si la importancia del ABA durante la combinación de sequía y calor está relacionada con la regulación estomática, se ha analizado la conductancia estomática y la transpiración de plantas Ler, *aba1-1* y *abi1-1* sometidas a sequía, calor y la combinación de ambos estreses (Figs. 10, 11). Los valores de conductancia estomática y transpiración en condiciones control han sido mayores en plantas *aba1-1* y *abi1-1* con respecto a plantas Ler, indicando que en ausencia de estrés, existen diferencias en cuanto a la regulación estomática probablemente debidas a la menor acumulación de ABA o a la insensibilidad a la misma, respectivamente (Figs. 10, 11). En respuesta a sequía, la conductancia estomática y la transpiración de *aba1-1* y *abi1-1* han sido superiores a las del genotipo silvestre. Estas respuestas se asocian a la escasa acumulación de ABA en plantas *aba1-1* y a la insensibilidad a la hormona de las plantas *abi1-1*. Además, este último mutante acumula cantidades de la hormona significativamente superiores a Ler en respuesta a sequía, probablemente asociado a la necesidad de cerrar estomas en situaciones de déficit hídrico. Contrariamente, en las situaciones de estrés por calor, tanto en las plantas silvestres Ler como en los mutantes *aba1-1* y *abi1-1* se ha observado un aumento de la conductancia estomática y de la transpiración, lo que apuntaría a una apertura de estomas dirigida probablemente a enfriar las hojas vía

aumento en la transpiración (Figs. 10, 11). Además, tanto la conductancia estomática como la transpiración han sido superiores en ambos mutantes respecto a plantas Ler, señalando de nuevo diferencias en la regulación estomática debidas a la alteración en la acumulación/señalización de ABA. Finalmente, en respuesta a la combinación de sequía y altas temperaturas, las plantas Ler han mostrado un aumento destacado del contenido en ABA que se corresponde con la bajada en la conductancia estomática y por tanto en la transpiración (Figs. 10, 12). Estos datos sugieren que en situaciones de combinación de sequía y calor, el efecto de la sequía dirigido a minimizar las pérdidas de agua prevalecería sobre el efecto de las altas temperaturas dirigido a enfriar la superficie foliar vía transpiración. En plantas deficientes en ABA (*aba1-1*) e insensibles a la hormona (*abi1-1*), la conductancia estomática y la transpiración han resultado inferiores a los valores observados en situaciones de calor, e incluso a los valores control (Figs. 10, 11). Estos datos sugieren que existen mecanismos adicionales e independientes al ABA que estarían implicados con la regulación del cierre estomático en situaciones de combinación de estrés. Uno de estos mecanismos podría estar relacionado con la acumulación de H₂O₂, el cual se ha observado en trabajos anteriores que induce cierre estomático en plantas *abi1-1* (Murata et al. 2001). Además del H₂O₂, estudios anteriores han sugerido que otras hormonas como JA y SA podrían estar implicadas en la regulación del cierre de estomas (Khokon et al. 2011, Murata et al. 2015). En este sentido, la marcada acumulación de JA y SA en plantas *aba1-1* y *abi1-1* en situaciones de combinación de estrés podría estar implicada en la disminución de la conductancia estomática observada en estas plantas respecto a la encontrada en situaciones de estrés por calor (Fig. 12, 13). Así pues, estos resultados sugieren la existencia de mecanismos de *cross-talk* entre hormonas dirigidos a suplir las funciones hormonales en los casos en los que existe una deficiencia funcional del ABA.

En general, el cierre de estomas en situaciones de combinación de sequía y calor podría explicar la mayor sensibilidad de las plantas a la combinación de estreses, ya que provoca una menor transpiración respecto a situaciones de calor, que a su vez podría dar lugar a una menor capacidad de la planta para enfriar la superficie foliar. Además, la menor supervivencia de los mutantes *aba1-1* y *abi1-1* respecto al genotipo silvestre en situaciones de combinación de sequía y calor no se debería a la

desregulación estomática producida por la deficiencia funcional del ABA, ya que otros mecanismos de señalización (hormonales y posiblemente ROS) estarían implicados en la disminución de la apertura estomática supliendo así la función del ABA en el cierre estomático. En este sentido, durante la combinación de estrés se ha producido un aumento notable en la acumulación de SA y JA en ambos mutantes. Estas hormonas podrían estar implicadas en el cierre estomático en estas condiciones de forma independiente al ABA induciendo la síntesis de óxido nítrico (NO) y activando la función del Ca^{2+} y SLAC1 (Fig. 14) (Daszkowska-Golec and Szarejko 2013, Murata et al. 2015).

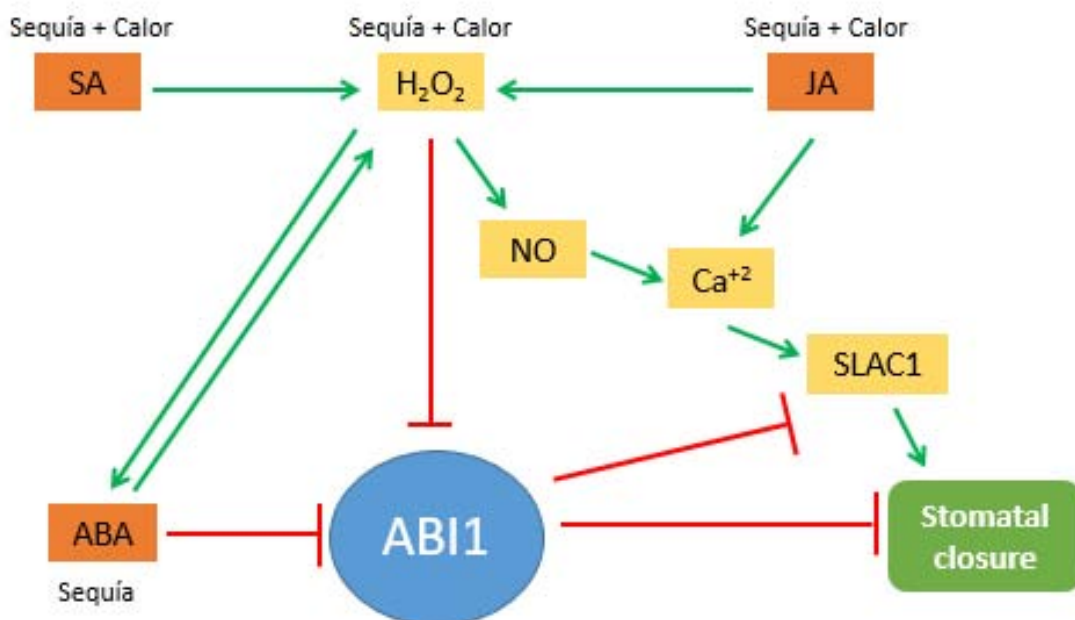


Fig. 14. Modelo hipotético para la regulación de la apertura estomática en los mutantes *aba1-1* y *abi1-1* durante la combinación de sequía y calor.

Además de estas hormonas, el H_2O_2 podría estar implicado también en el cierre de los estomas en mutantes insensibles al ABA tal y como se ha sugerido anteriormente (Murata et al. 2001). Por tanto, los resultados de este trabajo apuntan a un mecanismo hormonal alternativo al ABA que podría mediar en las respuestas estomáticas de las plantas sujetas a la combinación de estreses. No obstante, se requieren estudios adicionales para evaluar la implicación real del H_2O_2 y de las hormonas en la regulación estomática durante la combinación de factores ambientales.

Por lo tanto, la mayor sensibilidad de los mutantes *aba1-1* y *abi1-1* respecto a plantas Ler durante la combinación de sequía y calor vendría dada por la atenuación en la expresión de genes dependientes de ABA, incluyendo aquellos transcritos relacionados con la tolerancia a estrés. En este sentido, trabajos previos han constatado que tras tratar con ABA plantas Ler y *abi1-1*, este mutante sólo expresa un 8,6% de los genes expresados en el genotipo silvestre (Hoth et al. 2002). Por otra parte, se ha descrito que en condiciones de estrés combinado por salinidad y calor, existen 699 transcritos sobre-expresados específicamente por esta combinación de estrés, y de entre ellos, el grupo más numeroso (11%) está relacionado con respuestas mediadas por ABA (Suzuki et al. 2016). Estos resultados, junto con los obtenidos en este trabajo, remarcan la importancia del ABA activando genes específicos que resultan clave en la tolerancia de las plantas a situaciones de estrés combinado.

6. Conclusiones

1. La mayor sensibilidad de las plantas a la combinación de estrés respecto a los estreses individuales se debe en parte a la incapacidad de enfriar las hojas debido al cierre de estomas y a la disminución en la transpiración. Así pues, durante la combinación de sequía y calor los efectos producidos por el déficit hídrico enfocados a reducir la pérdida de agua prevalecen sobre los efectos de las altas temperaturas dirigidos a enfriar la superficie foliar.
2. El ABA tiene un papel significativo en la respuestas de las plantas a la combinación de sequía y calor.
3. La mayor sensibilidad de los mutantes *aba1-1* y *abi1-1* a la combinación de estrés con respecto al genotipo silvestre no está relacionada con la regulación estomática, sugiriendo que la expresión de genes dependientes de ABA es clave en la tolerancia de las plantas a la combinación de sequía y calor.
4. Existen mecanismos de señalización independientes al ABA relacionados con la disminución de la apertura estomática durante la combinación de sequía y calor. Así, tanto JA como SA podrían intervenir en la reducción de la conductancia estomática durante la combinación de sequía y calor.

7. Bibliografía

- Assmann SM, Snyder JA, Lee Y-RJ (2000) ABA-deficient (*aba1*) and ABA-insensitive (*abi1-1*, *abi2-1*) mutants of *Arabidopsis* have a wild-type stomatal response to humidity. *Plant, Cell Environ* 23:387–395.
- Boeck HJ De, Bassin S, Verlinden M, Zeiter M, Hiltbrunner E (2015) Simulated heat waves affected alpine grassland only in combination with drought. *New Phytol* 209:531–541.
- Craufurd PQ, Flower DJ, Peacock JM (2008) Effect of heat and drought stress on sorghum (*Sorghum Bicolor*). I. panicle development and leaf appearance. *Exp Agric* 29:61–76.
- Daszkowska-Golec A, Szarejko I (2013) Open or close the gate – stomata Action under the control of phytohormones in drought stress conditions. *Front Plant Sci* 4:138.
- Davies J, Zhang J (1991) Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. 42:55–76.
- De Ollas C, Hernando B, Arbona V, Gómez-Cadenas A (2013) Jasmonic acid transient accumulation is needed for abscisic acid increase in citrus roots under drought stress conditions. *Physiol Plant* 147:296–306.
- Durgbanshi A, Arbona V, Pozo O, Miersch O, Sancho J V, Gómez-Cadenas A (2005) Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 53:8437–42.
- Gómez-Cadenas A, Vives V, Zandalinas SI, Manzi M, Sánchez-Pérez AM, Pérez-Clemente RM, Arbona V (2015) Abscisic acid : a versatile phytohormone in plant signaling and beyond. *Curr Protein Pept Sci* 16:413–434.
- Hoth S, Morgante M, Sanchez J-P, Hanafey MK, Tingey S V, Chua N-H (2002) Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abi1-1* mutant. *J Cell Sci*

- 115:4891–900.
- Hu X, Wu L, Zhao F, Zhang D, Li N, Zhu G, Li C, Wang W (2015) Phosphoproteomic analysis of the response of maize leaves to drought, heat and their combination stress. *Front Plant Sci* 6:1–21.
- Jiang Y, Huang B (2001) Drought and heat stress injury to two cool-season turfgrasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. *Crop Sci* 41:436–442.
- Khokon MAR, Okuma E, Hossain MA, Munemasa S, Uraji M, Nakamura Y, Mori IC, Murata Y (2011) Involvement of extracellular oxidative burst in salicylic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant, Cell Environ* 34:434–443.
- Koornneef M, Reuling G, Karssen CM (1984) The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 61:377–383.
- Liu Z, Xin M, Qin J, Peng H, Ni Z, Yao Y, Sun Q (2015) Temporal transcriptome profiling reveals expression partitioning of homeologous genes contributing to heat and drought acclimation in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biol* 15:1–20.
- Merlot S, Gosti F, Guerrier D, Vavasseur A, Giraudat J (2001) The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *Plant J* 25:295–303.
- Mittler R (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci* 11:15–19.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7:405–410.
- Mittler R, Blumwald E (2010) Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. *Annu Rev Plant Biol* 61:443–462.
- Miura K, Tada Y (2014) Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Front Plant Sci* 5:1–12.
- Moes D, Himmelbach A, Korte A, Haberer G, Grill E (2008) Nuclear localization of the mutant protein phosphatase *abi1* is required for insensitivity towards ABA

- responses in Arabidopsis. Plant J 54:806–19.
- Munemasa S, Hossain MA, Nakamura Y, Mori IC, Murata Y (2011) The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase, CPK6, functions as a positive regulator of methyl jasmonate signaling in guard cells. Plant Physiol 155:553–561.
- Murata Y, Mori IC, Munemasa S (2015) Diverse stomatal signaling and the signal integration mechanism. Annu Rev Plant Biol 66:369–392.
- Murata Y, Pei Z-M, Mori IC, Schroeder J (2001) Abscisic acid activation of plasma Membrane Ca^{2+} channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants. Plant Cell 13:2513–2523.
- Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K (2013) ABA signaling in stress-response and seed development. Plant Cell Rep 32:959–70.
- Peleg Z, Blumwald E (2011) Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. Curr Opin Plant Biol 14:290–295.
- Rizhsky L, Liang H, Mittler R (2002) The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. Plant Physiol 130:1143–1151.
- Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Davletova S, Mittler R (2004) When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. Plant Physiol 134:1683–1696.
- Savin R, Nicolas M (1996) Effects of short periods of drought and high temperature on grain growth and starch accumulation of two malting Barley cultivars. Aust J Plant Physiol 23:201–210.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. J Exp Bot 58:221–7.
- Skriver K (1990) Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. PLANT CELL ONLINE 2:503–512.
- Suzuki N, Basil E, Hamilton JS, Inupakutika, Madhuri A Zandalinas SI, Tripathy D, Yuting

- L, Dion E, Fukui G, Kumazaki A, Nakano R, Rivero RM, Verbeck GF, Azad RK, Blumwald E, Mittler R (2016) ABA is required for plant acclimation to a combination of salt and heat stress. *PLoS One* Accepted.
- Suzuki N, Rivero RM, Shulaev V, Blumwald E, Mittler R (2014) Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytol* 203:32–43.
- Umezawa T, Nakashima K, Miyakawa T, Kuromori T, Tanokura M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2010) Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. *Plant Cell Physiol* 51:1821–1839.
- Yoshida T, Fujita Y, Sayama H, Kidokoro S, Maruyama K, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2010) AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *Plant J* 61:672–85.
- Yoshida T, Mogami J, Yamaguchi-Shinozaki K (2014) ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. *Curr Opin Plant Biol* 21:133–139.
- Zandalinas SI, Rivero RM, Martínez V, Gómez-Cadenas A, Arbona V (2016) Tolerance of citrus plants to the combination of high temperatures and drought is associated to the increase in transpiration modulated by a reduction in abscisic acid levels. *BMC Plant Biol* 16:105.
- Zeevaart JAD, Creelman RA (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39:439–473.
- Zhang YP, E ZG, Jiang H, Wang L, Zhou J, Zhu DF (2015) A comparative study of stress-related gene expression under single stress and intercross stress in rice. *Genet Mol Res* 14:3702–3717.