

TESIS DOCTORAL

POSIBLES FUNCIONES DE LA FAMILIA GÉNICA DE LA GLUTAMATO DESCARBOXILASA EN *POPULUS*

Alicia Garrido Aranda 2015

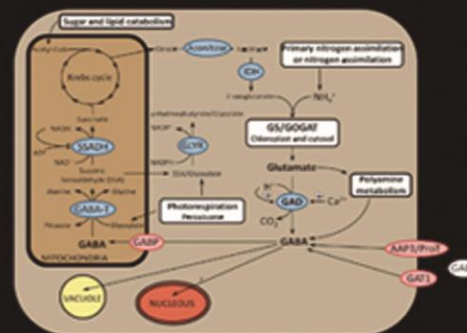


UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular y Bioquímica

Programa de Doctorado en Biología Celular y Molecular

TESIS DOCTORAL

POSIBLES FUNCIONES DE LA FAMILIA GÉNICA DE LA
GLUTAMATO DESCARBOXILASA
EN *POPULUS*



Autora: Alicia Garrido Aranda

Directores: Fernando Gallardo Alba y Juan Jesús Molina Rueda

Noviembre 2015



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
Departamento de Biología Molecular y Bioquímica

TESIS DOCTORAL

POSIBLES FUNCIONES DE LA FAMILIA GÉNICA DE LA
GLUTAMATO DESCARBOXILASA EN *POPULUS*

Alicia Garrido Aranda

Noviembre 2015



Publicaciones y
Divulgación Científica

AUTOR: Alicia Garrido Aranda

 <http://orcid.org/0000-0003-4275-2756>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

Dr. Fernando Gallardo Alba, profesor del departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga, y el Dr. Juan Jesús Molina Rueda, Investigador post-doctoral de la Universidad de Málaga

Certifican:

Que la Tesis Doctoral titulada “Posibles funciones de la familia génica de la glutamato descarboxilasa en *Populus*”, presentada por la licenciada Alicia Garrido Aranda para optar al grado de Doctor por la Universidad de Málaga con mención internacional, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga y reúne los requisitos exigidos para su defensa ante el tribunal

En Málaga, a 17 de Septiembre de 2015

Fdo.: Fernando Gallardo Alba

Fdo.: Juan Jesús Molina Rueda

Memoria de la tesis doctoral presentada por

Alicia Garrido Aranda

Para optar al grado de doctor en Biología con mención internacional por la Universidad de Málaga

Directores: Dr. Fernando Gallardo Alba y Dr. Juan Jesús Molina Rueda

Lugar: Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga

Proyectos que la han financiado:

AGL2009- 11404 del Plan Nacional I+D+i

Málaga, 17 de Septiembre de 2015

Fdo.: Fernando Gallardo Alba

Fdo.: Juan Jesús Molina Rueda

A mi familia
A Raúl

Tabla de contenido

Agradecimientos

Abreviaturas

Capítulo 1: Introducción general	1
Características de las GADs en plantas	3
Familia génica de la glutamato descarboxilasa	5
Expresión de los genes <i>GAD</i>	8
Síntesis de GABA y su contexto metabólico.....	11
1. Ruta del GABA shunt y estrés.....	11
2. Fuentes alternativas de GABA y su transporte.....	12
3. Funciones clásicas y recientes de la GAD y el GABA.....	14
4. <i>Populus</i> como especie modelo.....	16
Objetivos del estudio	19
Capítulo 2: Presence of GABA in differentiating xylem and evolution of the calmodulin binding domain in glutamate decarboxylases support a role for GABA in plant xylem development	21
Introduction	23
Results and Discussion	25
Glutamate decarboxylase expression under bent stimulus	25
GABA immunolocalization in stem	26
CaMBDs in GADs.....	29
Conclusions	34
Capítulo 3: Posibles papeles de los genes glutamato descarboxilasa de <i>Populus</i> en condiciones normales de crecimiento	35
Introducción.....	37
Resultados.....	40
Genes que codifican la glutamato descarboxilasa en <i>Populus trichocarpa</i>	40
Expresión relativa de los genes que codifican para PtGADs y localización de GABA en diferentes tejidos de plantas de <i>P. tremula x P. alba</i>	46
Expresión de los genes <i>PtaGAD</i> y localización de GABA en tallo y peciolo.	47
Expresión de los genes <i>PtaGAD</i> y localización de GABA en hojas.....	50
Expresión de los genes <i>PtaGAD</i> y localización de GABA en raíz	52
Expresión de los genes <i>PtaGAD</i> en flores femeninas	54
Relación entre la expresión de los genes <i>PtaGAD</i> y otros genes implicados en el metabolismo del GABA en <i>P. tremula x P. alba</i>	54
Discusión	56
GADs en <i>Populus</i>	56
Posible papel de la <i>PtaGAD2</i> en el desarrollo vascular	56

Posible participación de la PtaGAD1 en órganos fotosintéticos	59
La PtaGAD3 puede estar implicada en la asimilación de N en la raíz	60
PtaGAD5 y PtaGAD6 pueden tener un papel relacionado con estrés	61
Conclusiones.....	62
Capítulo 4: Efectos del glutamato y el GABA sobre el desarrollo y crecimiento de la raíz en <i>Populus</i> y expresión de los genes GAD.....	63
Introducción.....	65
Resultados y discusión	67
El glutamato favorece el crecimiento de la raíz principal, y el GABA fomenta el desarrollo de raíces secundarias en plántulas <i>P. tremula x P. alba in vitro</i>	67
Distribución de la señal de GABA en las diferentes regiones de la raíz	69
Niveles de mensajeros de los genes <i>PtaGAD</i> en las regiones de la raíz	71
Posibles papeles de los genes <i>PtaGAD</i> en raíces de <i>P. tremula x P. alba</i> y expresión de genes relacionados	72
Conclusiones.....	78
Capítulo 5: Expresión de la familia génica glutamato descarboxilasa de <i>Populus tremula x P. alba</i> frente a estreses abióticos	79
Introducción.....	81
Resultados y discusión	83
Estrés por calor	83
Efecto del calor en los niveles de mensajeros de los genes <i>PtaGAD</i> y los genes implicados en el metabolismo de GABA	84
Estrés por frío	86
Efecto del frío en la expresión relativa de los genes <i>PtaGAD</i> y de los genes implicados en el metabolismo de GABA	87
Estrés por inundación	89
Expresión relativa de los genes <i>PtaGAD</i> y de los genes implicados en el metabolismo de GABA como consecuencia de la inundación de las plantas	91
Estrés por sequía.....	94
Niveles de mensajeros relativos de los genes del GABA shunt en sequía: <i>GAD</i> , <i>GABA-T</i> y <i>SSADH</i>	95
Estrés por sal.....	97
Niveles de mensajeros relativos de los genes del GABA shunt en estrés por sal ..	98
Expresión relativa de los genes del GABA shunt en tallo de <i>P. tremula x P. alba</i> en estrés por sal a diferentes concentraciones a largo plazo	100
Conclusiones.....	100
Capítulo 6: Conclusiones generales "General conclusions"	103
Capítulo 7: Resúmenes de los capítulos en inglés "Summaries of the chapters" .	107
Chapter 1 (General introduction).....	109

Chapter 2	115
Chapter 3	117
Chapter 4	121
Chapter 5	125
Capítulo 8: Materiales y métodos	129
Estudios bioinformáticos: búsqueda de secuencias GADs y realización de los árboles filogenéticos	131
Análisis de las secuencias promotoras.....	131
Análisis de las secuencias CaMBD	132
Material biológico	132
Recolección de muestras de <i>Populus</i> en condiciones normales	132
Tratamientos de estreses abióticos	133
Crecimiento de raíces en cultivo in vitro.....	134
Extracción de ARN y análisis de los mensajeros mediante qPCR.....	134
Análisis de datos de expresión.....	137
Northern blotting	138
Fijación e inclusión del material.....	138
Cortes histológicos	139
Tinción con azul de toluidina	139
Inmunolocalización de GABA	139
Bibliografía.....	141

Agradecimientos

Agradezco muy sinceramente a mi director, Fernando Gallardo Alba, la gran oportunidad que me brindó al aceptarme en su grupo de investigación. Agradecerle también su amabilidad, cercanía en todo momento y su implicación en la corrección de esta memoria.

Las palabras no son suficientes para agradecer la labor de mi director Juan Jesús Molina Rueda. En primer lugar, quiero agradecerte el aceptar dirigir esta tesis. En segundo lugar, darte las gracias por darme la oportunidad de realizar una estancia en el laboratorio de EEUU en el que realizabas tu post-doc. Esa estancia marco un antes y un después en mi tesis doctoral. Además de aprender infinidad de cosas, conservo multitud de anécdotas que nunca olvidare como el desalojo de nuestra residencia, los momentos foot longs, la cervecita y hamburguesa de los viernes en el karaoke, el momento Whitney (casi nos quedamos sin foto)... y mil historias más. Gracias por tu implicación en todas las fases de la tesis: planificación, diseño experimental, discusión de resultados, correcciones del manuscrito, etc. En definitiva, estar día a día conmigo luchando para que saliera hacia delante. Eres un gran científico pero eres aún mejor persona. Gracias por ser mi mentor! MIL GRACIAS Codi!

Quisiera agradecer esta tesis también a Francisco J. Ruíz Cantón porque gracias a él me inicie en este apasionante mundo de la investigación. Gracias por confiar desde el primer momento en mí y por tus consejos. También, tengo que agradecerte que me permitieras continuar mi formación con el proyecto europeo, ese proyecto tan emocionante con excursiones diarias al jardín botánico de la Concepción, aunque llevase un pequeño hándicap de 20 litros. Gracias Cantón.

I would like to thank Dr. E. G. Kirby (Ned) for allowing me to do a short stay in his lab. I want thank him for his closeness and kindness at all times. Thank you for being patient with my English as well. Also, I would like to thank Dra. CJ Tsay for allowing me to work in her lab, teaching a new techniques and making me feel at home. I would also like to thank Dr. Scott for teaching during that time the metabolites extraction protocol and his kindness.

Y qué decir del grupo de la muerte (PCD), que más que compañeros los considero grandes amigos. Muchas gracias Vicky por tu apoyo constante, es imposible tener mejor compi de poyata. Gracias por hacerme ver la diferencia entre una poyata en la que se trabaja con proteínas y una en la

que se trabaja con ARN. Nunca olvidaré tus lecciones de inglés, ahora se que matter se pronuncia en UK "mata... de tomate" y en US "playa de... Maro". Como buenos gordacos, nuestros mejores momentos los pasábamos comiendo en el césped sobre tu batamanta sueca o saliendo a comer fuera (como no recordar el café helado que aunque pareciera increíble estaba frío). Muchas gracias Rizos. Nandis eres una persona que dejas huella en aquellos que te conocen. Me siento muy afortunada de haber tenido el placer de compartir laboratorio con una gran científica como tú. Muchas gracias por todos tus consejos, por todas las charlas que hemos tenido, de las que he aprendido mucho, y por ser una persona que lo da todo sin esperar nada a cambio. Julio, al principio no me acostumbraba a tener una persona al lado con los rizos tan cortos como los tuyos (aunque tú te empeñabas en dejarlos crecer). Es un placer haberte tenido como compañero y te deseo lo mejor. Muchas gracias por iniciarme en el mundo de los westerns. Bueno y me queda otra rizos, Eva, que aunque estaba en tierras enemigas "mi arma" cada vez que necesitaba su ayuda ahí estaba ella encantada de dármela. Gracias Dra. Lucas.

Tampoco quiero dejar de agradecer a la gente de Canton's Lab: Sara, Said, Marco y Sonia. Gracias por acompañarme en el inicio de mi aventura.

Quisiera agradecer también a mis compañeros del departamento, tanto los del laboratorio de los Kikas como los Marquez, por ayudarme cuando lo he necesitado y darme ánimos cada vez que me veáis. Por otro lado, me gustaría darles las gracias al laboratorio de microbiología del edificio I+D por permitirnos usar sus fitotrones, ya que sin ellos hubiera sido imposible llevar a cabo parte de los experimentos de esta tesis.

Me gustaría darles las gracias a mis amigos los biolocos. Gracias por vuestra paciencia y por estar siempre ahí cuando lo he necesitado.

Quiero agradecerles infinitamente a mis padres lo que soy a día de hoy. Gracias por darme ánimos en todo momento, en apoyarme en todas las decisiones que tomo, aunque no sean de vuestro gusto, en levantarme cuando me caigo, escucharme y en definitiva por quererme tanto.

Gracias a mi familia por estar siempre a mi lado.

En especial quiero agradecerle a Raúl su amor incondicional, el compartir el día a día conmigo, sacarme una sonrisa cuando estoy triste y el darme fuerza en mis peores momentos. A tu lado todo parece más fácil, te quiero.

Abreviaturas

AAT	aspartato aminotransferasa
ACS	aminociclopropanocarboxilato sintasa (ACC sintasa)
ACO	ACC oxidasa
ADH	alcohol deshidrogenasa
AMT1.2	transportador de amonio de alta afinidad
AtGAD	glutamato descarboxilasa de <i>Arabidopsis</i>
ATP	adenosín trifosfato
BLAST	(Basic Local Alignment Search Tool) programa de análisis de similitud de secuencias
BLASTP	BLAST con secuencias de proteínas
CaM	calmodulina
CaMBD	dominio de unión de calmodulina
cDNA	ADN complementario
Ciclo GS/GOGAT	ciclo glutamina sintetasa/ glutamato sintasa
Cq	ciclo al cual aumenta la intensidad de emisión del fluoróforo respecto al ruido de fondo
GAD	glutamato descarboxilasa
GABA	ácido gamma-aminobutírico
GABP	permeasa de GABA
GABA-T	GABA transaminasa
GAT	transportador mitocondrial de GABA
GDH	glutamato deshidrogenasa
GHB	ácido gamma-hidroxibutírico
GLYR	glioxilato reductasa
GRF	(Growth-Regulating Factor) Factor regulador del crecimiento
IDH	isocitrato deshidrogenasa
mRNA	ARN mensajero
MS	medio de Murashige y Skoog
NAD⁺	nicotinamida adenina dinucleótido forma oxidada
NADH	NAD ⁺ reducido
NH₄⁺	amonio

NO₃⁻	nitrato
NiR	nitrito reductasa
NR	nitrato reductasa
NRT	transportador de nitrato (NTR1.2: de baja afinidad; NRT2.1: de alta afinidad)
PAL	fenilalanina amonio liasa
PLP	piridoxal 5´fosfato
PLPBD	dominio de unión de PLP
PT-AAT	Aspartato aminotransferasa de origen procariota
PtaGAD	GAD de <i>Populus tremula x Populus alba</i>
PtGAD	GAD de <i>Populus trichocarpa</i>
qPCR	PCR en tiempo real
ROS	especies reactivas de oxígeno
SSA	semialdehído succínico
SSADH	semialdehído succínico deshidrogenasa
Z1	región meristemática en la raíz
Z2	región de elongación en la raíz
Z3	región de absorción en la raíz
Z4	región de predominancia de raíces laterales en la raíz
Z5	región de transporte en la raíz
3´UTR	(untranslated región) región 3´ no traducida del gen

Capítulo 1

Introducción general

Este capítulo es una versión en castellano del trabajo: Molina-Rueda JJ, Garrido-Aranda A, Gallardo F (2015) Glutamate decarboxylase. Capítulo 7 en Amino Acid in Higher Plants, Ed.JPF D'Mello. CAB international, Oxfordshire, UK, pp 139-141 (ISBN 9781780642635)

Contribución de Alicia Garrido Aranda a la publicación: Planteamiento del capítulo, búsqueda de información y redacción.

Aunque hace más de 50 años que se describió que la glutamato descarboxilasa (GAD) lleva a cabo la descarboxilación del glutamato para producir GABA, y en animales ha sido muy estudiada debido al papel del GABA como neurotransmisor, la información disponible sobre las GADs de plantas es aún limitada, conociéndose sólo algunos aspectos de la regulación por calcio de su actividad enzimática o de expresión de algunos de los genes de su familia génica. El GABA es un metabolito que tradicionalmente se ha asociado a estrés, pero su papel en plantas todavía no está claro. En las últimas dos décadas los resultados experimentales obtenidos sobre la GAD y el GABA, destacando las alteraciones fenotípicas mostradas por plantas tratadas con GABA y por plantas transgénicas para GAD, han generado preguntas interesantes sobre el posible papel de este metabolito y la enzima en señalización en plantas.

En esta introducción se desarrollaran los siguientes puntos: 1) características de los dominios de las GADs en plantas, incluyendo el dominio de unión a calmodulina (CaMBD) y su adquisición durante la evolución; 2) la familia génica GAD de diferentes especies de plantas y su regulación; 3) transporte y metabolismo del GABA; y 4) papeles del GABA en plantas como metabolito, considerando sus propiedades físico-químicas y su posible papel como molécula señal. También se discute un posible papel de la GAD y el GABA en el desarrollo vascular de plantas leñosas.

Características de las GADs en plantas

La GAD es una enzima citosólica que cataliza la descarboxilación del glutamato para producir CO_2 y GABA mediante el consumo de protones, lo que ha sido considerado relevante para el control del pH citosólico. El GABA se ha asociado tradicionalmente con el estrés en plantas, y algunos tipos de estrés conllevan una acidificación citosólica, siendo el consumo de protones de la reacción catalizada por la GAD un mecanismo celular para hacer frente al estrés. La familia génica GAD se ha estudiado en muy pocas especies de plantas, la mayoría de los estudios se han desarrollado en angiospermas aunque también se han realizado algunos trabajos en nuestro laboratorio en una gimnosperma (pino). La actividad GAD de plantas está regulada por pH y por la unión a calmodulina (CaM) en presencia de calcio (Ca^{2+}) (Crawford y col., 1994; Arazi y col., 1995; Bouche y Fromm, 2004). La enzima es más activa a pH ácido (ej. 5,8) que a pH neutro, siendo la activación a pH ácido (inferior a 6,5) casi independiente de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, aunque a pH neutro es esencial la presencia de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ para su activación (Snedden y col., 1996). La existencia de diversos procesos

fisiológicos y señales medioambientales que activan vías de transducción de señales que disminuyen el pH citosólico y/o aumentan los niveles de Ca^{2+} podrían afectar a la actividad GAD y la producción de GABA.

La GAD está codificada por una pequeña familia de genes nucleares (Akama y col., 2001). En animales se han descrito dos tipos de GADs de pesos moleculares diferentes, 65 y 67 kDa (Ueno y col., 2012), en cambio en plantas hasta el momento sólo se ha detectado una forma GAD y su tamaño se sitúa entre los 43 y 62 kDa (Shelp y col., 2012a). Todas las secuencias GAD de plantas disponibles en la base de datos GenBank poseen un dominio central que lleva a cabo la catálisis e interacción con el cofactor, piridoxal 5'-fosfato (PLP). Este dominio está muy conservado en las GADs y posee la secuencia conservada SSEA (serina-serina-ácido glutámico-alanina) típica en descarboxilasas involucrada en la interacción con el PLP, además de un residuo de aspartato y una secuencia conservada SGHK (serina-glicina-histidina-lisina) en el centro activo (Fig. 1; Sukhareva y Mamaeva, 2002). Por otro lado, la mayoría de las secuencias GAD de plantas contiene un dominio de unión a CaM en el extremo carboxilo (CaMBD) ausente en las secuencias GAD de animales (Molina-Rueda y col., 2010; Fig. 1). Esta región está menos conservada que el dominio central PLP. El CaMBD posee unos 28 aminoácidos, con algunos residuos conservados, como las lisinas flanqueantes al dominio y un triptófano localizado en la región central del dominio en una secuencia WKK (triptófano-lisina-lisina), siendo claves para la unión de CaM al dominio (Baum y col., 1996; Arazi y col., 1995; Molina-Rueda y col., 2010). El CaMBD posee una estructura secundaria, que ha sido identificada por programas de reconocimiento de estructuras secundarias (O'Neil y DeGrado, 1990), que consiste en una hélice alfa anfipática en la que el triptófano conservado se localiza en la mitad longitudinal hidrofóbica y los residuos cargados en la mitad longitudinal hidrofílica. CaMBD actúa como un dominio autoinhibidor de la actividad enzimática ocupando el centro activo, y su liberación mediante la unión a Ca^{2+} /CaM activa la enzima. Aunque es importante destacar que no todas las GADs de plantas están reguladas por la unión Ca^{2+} /CaM, ya que se ha descrito que algunos CaMBD de GADs no unen CaM, como es el caso de una GAD de arroz (Akama y col., 2007). Aquellas GADs que no poseen un CaMBD funcional se ha visto que muestran un menor grado de conservación del extremo carboxilo respecto a las que sí lo presentan.

La interacción de GAD con Ca^{2+} /CaM también se ha descrito como un posible mecanismo del ensamblaje de la holoenzima, pero hasta la fecha sólo unos pocos

trabajos han considerado la caracterización de la holoenzima. Las holoenzimas nativas GAD poseen un tamaño entre 550 y 340 kDa (Shelp y col., 2012a; Zik y col., 2006), pero las aproximaciones clásicas de la purificación de la proteína y el uso de anticuerpos específicos para determinar las características de la holoenzima no han sido concluyentes.

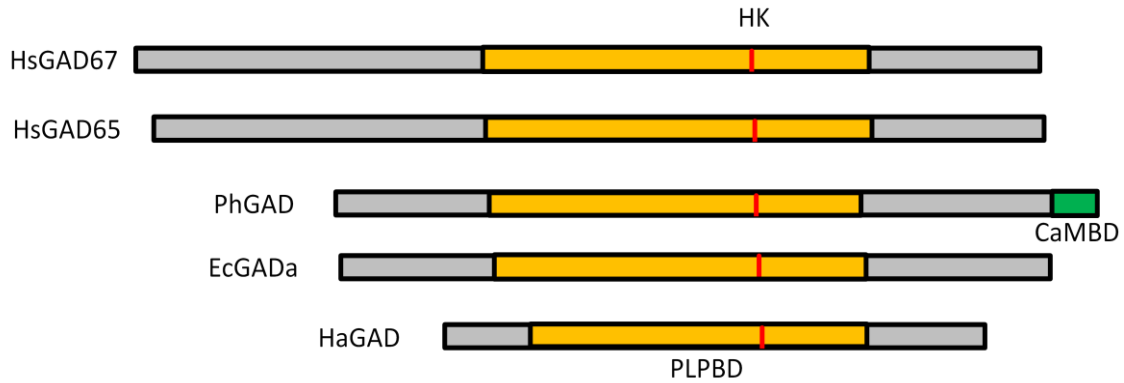


Figura 1. Comparación de los polipéptidos GAD de organismos de los diferentes reinos. El dominio de unión a PLP (PLPBD), el dominio de unión a calmodulina (CaMBD) y la secuencia conservada HK en el PLPBD se muestran en la figura. Animales: *Homo sapiens* HsGAD67 (número de acceso: Q99259.1; 594 aa, 66.9 kDa) y HsGAD65 (Q05329.1; 585 aa, 65.4 kDa); Plantas: *Petunia hybrida*, PhGAD (Q07346.1; 500 aa, 56.7 kDa); Bacteria: *Escherichia coli*, EcGADa (P69908.1; 466 aa, 52.7 kDa); Archaea: *Halobacterium sp.* HaGAD (Q07346.1; 355 aa, 37.4 kDa). Los datos para definir los dominios y la localización se obtuvieron de Sukhareva y Mamaeva (2002).

Familia génica de la glutamato descarboxilasa

A pesar de que el GABA es una molécula ubicua presente tanto en procariotas como en eucariotas, la GAD está codificada por sólo uno o dos genes, a excepción de las plantas, en que el número de genes que codifican para GAD es más variable (Sukhareva y Mamaeva, 2002; Tabla 1), desde sólo un gen en el genoma de *Aquilegia coerulea* hasta diez en el genoma de *Glycine max* (Phytozome v9.0). El genoma de *Arabidopsis thaliana* ha sufrido una reducción importante durante la evolución (Yang y col., 2013), aún así todavía en su genoma hay cinco genes que codifican GAD. Tal y como ocurre en *A. thaliana*, en la mayoría de las plantas la presencia de varios genes que codifican GAD sugieren que ha podido ocurrir un fenómeno de especialización pudiendo ejercer cada GAD un papel diferente. La duplicación génica que afecta a los genes GAD de plantas probablemente se ha producido durante la evolución antes y después de la especialización ya que, el árbol filogenético correspondiente a las

proteínas GAD de especies de los diferentes grupos taxonómicos de plantas principales mostró posibles ortólogos (Fig. 2, Pt1, At5, Eg3, Sl1, Zm4 y Gm 1 y 10), y también ramas con varias GADs de la misma especie, parálogos (Fig. 2, Gm5,6,7 y8; Pt2 y 3, o Pt5 y 6). Además, el número de exones se mantiene relativamente constante en los genes GADs de plantas (de 5 a 7 exones en la mayoría de ellos; Tabla 1.), en cambio se ha observado la pérdida ó acortamiento en los intrones de los genes dentro de la misma especie.

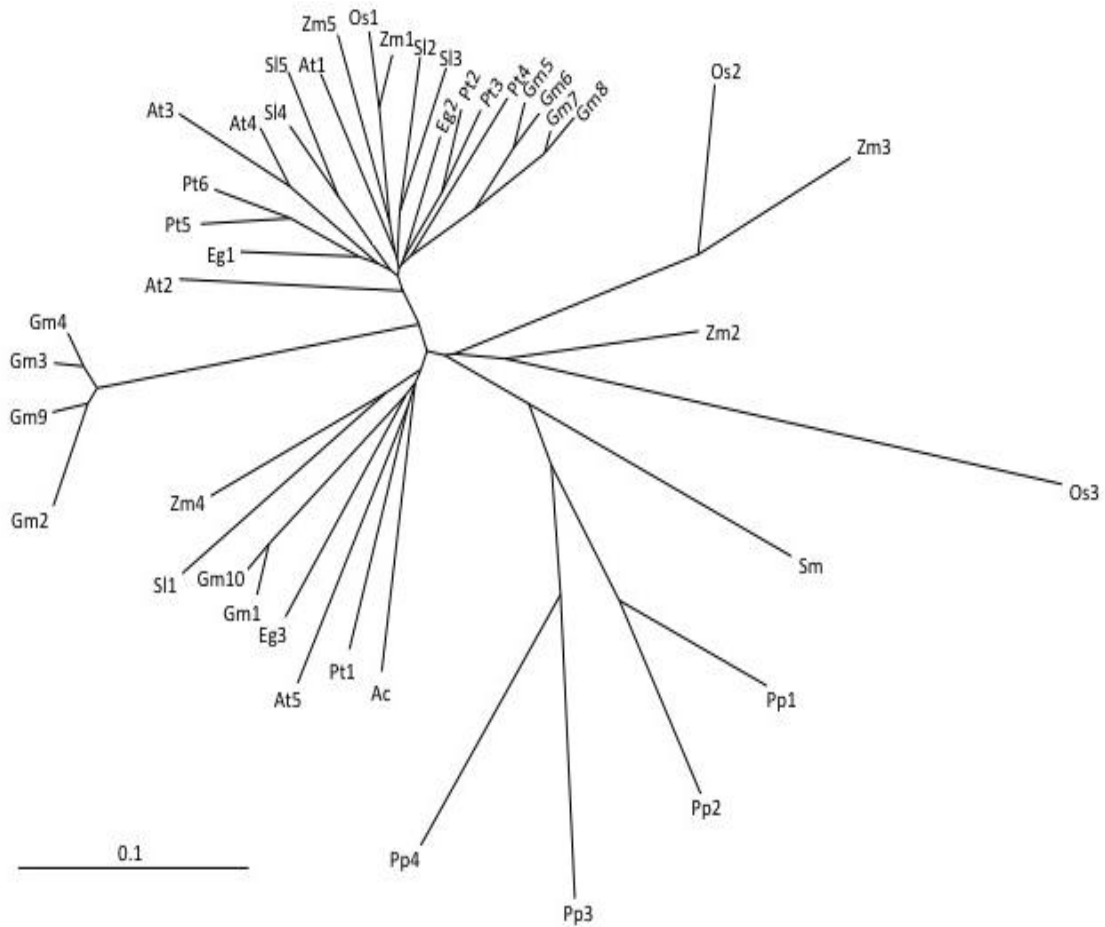


Figura 2. Análisis filogenético de las GADs de plantas. Las secuencias de aminoácidos de GADs de organismos que representan los principales grupos taxonómicos de plantas (Phytozome v9; Tabla 1.1) fueron alineados con Clustal X (v2.1) y visualizados con TreeView (v1.6.6). Ac, *Aquilegia coerulea*; At, *Arabidopsis thaliana*; Eg, *Eucalyptus grandis*; Gm, *Glycine max*; Os, *Oryza sativa*; Pp, *Physcomitrella patens*; Pt, *Populus trichocarpa*; Sl, *Solanum lycopersicum*; Sm, *Selaginella moellendorffii*; Zm, *Zea mays*.

CAPITULO 1

Tabla 1. Identificación de los genes GADs en los genomas de plantas secuenciados (Phytozome v9.0: www.phytozome.net)

Grupo taxonómico	Especie	Gen/transcrito	Nº exones	Proteína
Fabidae	<i>Populus trichocarpa</i>	<i>Potri.012G039000.1</i>	6	Pt1
		<i>Potri.004G075200.1</i>	7	Pt2
		<i>Potri.T059200.1</i>	7	Pt3
		<i>Potri.004G075300.1</i>	7	Pt4
		<i>Potri.008G141100.1</i>	7	Pt5
		<i>Potri.010G100500.1</i>	7	Pt6
	<i>Glycine max</i>	<i>Glyma16g34450.1</i>	6	Gm1
		<i>Glyma08g09650.1</i>	6	Gm2
		<i>Glyma08g09670.1</i>	6	Gm3
		<i>Glyma05g26660.1</i>	6	Gm4
		<i>Glyma14g39170.1</i>	7	Gm5
		<i>Glyma02g40840.1</i>	7	Gm6
		<i>Glyma18g04940.1</i>	7	Gm7
		<i>Glyma11g33280.1</i>	5	Gm8
Malvidae	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>At5g17330.1</i>	8	At1
		<i>At1g65960.2</i>	6	At2
		<i>At2g02000.1</i>	6	At3
		<i>At2g02010.1</i>	6	At4
		<i>At3g17760.1</i>	6	At5
	<i>Eucalyptus grandis</i>	<i>Eucgr.B02632.1</i>	8	Eg1
		<i>Eucgr.F02900.1</i>	7	Eg2
		<i>Eucgr.H00595.1</i>	6	Eg3
Asterid	<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>Solyc03g098240.2.1</i>	5	Sl1
		<i>Solyc05g054050.2.1</i>	7	Sl2
		<i>Solyc11g011920.1.1</i>	7	Sl3
		<i>Solyc04g025530.2.1</i>	7	Sl4
		<i>Solyc01g005000.2.1</i>	7	Sl5
Eudicot	<i>Aquilegia coerulea</i>	<i>Aquca_002_01342.1</i>	6	Ac1
Grass	<i>Oryza sativa</i>	<i>LOC_Os03g13300.1</i>	5	Os1
		<i>LOC_Os04g37500.1</i>	4	Os2
		<i>LOC_Os08g36320.1</i>	6	Os3
	<i>Zea mays</i>	<i>GRMZM2G098875_T01</i>	5	Zm1
		<i>GRMZM2G017110_T02</i>	6	Zm2
		<i>GRMZM2G355906_T01</i>	5	Zm3
		<i>GRMZM2G101069_T01</i>	7	Zm4
		<i>GRMZM2G826838_T01</i>	7	Zm5
Tracheophyte	<i>Selaginella moellendorffii</i>	164618	7	Sm1
Embryophyte	<i>Physcomitrella patens</i>	<i>Pp1s68_116V6.1</i>	5	Pp1
		<i>Pp1s34_308V6.2</i>	5	Pp2
		<i>Pp1s8_163V6.1</i>	6	Pp3
		<i>Pp1s10_153V6.1</i>	7	Pp4

CAPITULO 1

		++			*		++
Ph	GSEVH	KK	---	DSEV	OLEM	---	ITAWKKFVVEKKKKKTNRVC
Pt1	GKKT	VKK	---	SSREI	QEEV	---	TLYWRRLASEKR---TGAC
At1	LMVT	VKK	---	SDID	KQRT	---	ITGWKKFVADRKKT-SGIC
Gm1	TGEK	IKK	---	AAE	ETQKEI	---	AFYWKRLVDGKR---LGAC
Eg1	RVNG	VKK	---	AAE	ETQREI	---	TDAWKKFVLESKTNKNKIC
Sl1	GLHH	FHM	---	DTV	ETQKDI	---	IKHWKRIAGKKT---SGVC
Os1	LLVV	AKK	---	SE	ETQSSV	---	TEAWKKFVLAKRTN--GVC
Os2	GEEAS	---	---	IRVVK	SEA	---	VPVRKSVPLVAGKT---KGVC
Zm1	APLL	RKK	---	E	ETQSSV	---	TEAWKKFVLAKRTN--GVC
Zm3	GEEAS	---	---	ARVVK	REAVVPVHRSVSLAGGKT	---	KGVC
Angiosp	XXXXX	KKK	---	E	EXE	---	TXXWKKFVXXXKXX-XXVC
Ppi	-VTQ	FKSSAVFNEIV	---	SOKAV	---	---	KAWKKFVAOKA---NRVC
Sm1	QLDL	RKSSVFED	---	RNSQRA	---	---	FKVWKKFALSKT---NGVC
Ppa1	EHVAC	KKK	---	HNGHHHS	---	---	SR---GGHGKKHASPKA---NGVC

Figura 3. Alineamiento de la región C-terminal dónde se encuentra el CaMBD en las proteínas GAD de plantas. Las lisinas (K) flanqueantes (++) y el triptófano (W) conservado (*) se indican en la parte superior del alineamiento. Los residuos idénticos o similares están marcados en negro y gris, respectivamente. En la secuencia consenso de angiospermas (Angiosp) los residuos marcados con una X hace referencia a que en esa posición se han encontrado cuatro o más residuos distintos en las diferentes especies (Molina-Rueda y col., 2010). El guión representa un hueco que se ha introducido para optimizar el alineamiento. Os2 y Ppa1 que carecen de CaMBD. At, *Arabidopsis thaliana*; Eg, *Eucalyptus grandis*; Gm, *Glycine max*; Os, *Oryza sativa*; Ph, *Petunia × hybrid*; Ppa, *Physcomitrella patens* subsp. *patens*; Ppi, *Pinus pinaster*; Pt, *Populus trichocarpa*; Sm, *Selaginella moellendorffii*; Sl, *Solanum lycopersicum*; Zm, *Zea mays*. La tabla 1.1 muestra el número de acceso de las secuencias mostradas

CaMBD no sólo está presente en las GADs de dicotiledóneas sino también se encuentra en monocotiledóneas (*Oryza sativa* y *Zea mays*) y gimnospermas (*Pinus pinaster*) (Fig. 3). Nuestro grupo de investigación ha detectado que este dominio está conservado en la GAD de *Selaginella moellendorffii* perteneciente al filo *Lycopodiophyta*, un grupo ancestro de las plantas vasculares cuyo origen se remonta a 400 millones de años atrás. Esto demuestra que la unión de CaM al dominio de las GADs de plantas, y por lo tanto su regulación por el calcio, fueron adquisiciones muy antiguas durante la evolución de las plantas.

Expresión de los genes GAD

Durante años, la expresión de los genes *GAD* ha sido estudiada en varias especies de plantas vasculares. Los niveles de transcritos *GAD* cambian frente a estímulos externos habiendo recibido especial atención debido a la implicación del GABA en respuestas a estrés.

En condiciones normales de crecimiento, algunos genes *GAD* poseen patrones de expresión parcialmente constitutivos y con relativos altos niveles de transcritos en toda la planta, mientras que otros muestran una expresión órgano-específica o unos

niveles de mensajeros muy bajos. La familia génica *GAD* de *A. thaliana* (*AtGADs*) es un buen ejemplo de la expresión diferencial que presentan estos genes en plantas. En este caso, *AtGAD1* es órgano-específico mostrando altos niveles de transcritos en raíces, *AtGAD2* es el que se expresa mayoritariamente en todos los órganos de la planta, mientras que *AtGAD3*, *AtGAD4*, *AtGAD5* muestran niveles de mensajeros muy bajos, detectándose los genes *AtGAD4* y *AtGAD5* sólo en flores (Miyashita y Good, 2008). En algunas familias génicas *GAD* todos sus genes presentan niveles mensajeros similares en toda la planta, como es el caso de *O. sativa* (Akama y col., 2001), en cambio hay otras en las que la mayoría de los genes presentan una expresión órgano específica, como en *G. Max* (Hyun y col., 2013).

En los últimos años se han descrito patrones de expresión de *GADs* implicados en procesos fisiológicos concretos como la germinación de semillas (Hyun y col., 2013) y la maduración de frutos (Akihiro y col., 2008). Además, se les ha relacionado con procesos importantes en plantas leñosas, es el caso de un gen *GAD* de *Populus trichocarpa* cuya expresión puede estar relacionada con el proceso de xilogénesis (Sjödín y col., 2009). En plantas leñosas son escasos los trabajos de expresión de las *GADs*. Hasta el momento se ha identificado un gen *GAD* de pino que aumenta sus niveles de mensajeros durante el desarrollo del hipocótilo, mostrando también una expresión diferencial durante la producción de madera de reacción (Molina-Rueda y col., 2010). En manzano de los tres *GADs* que se han descrito, uno de ellos se expresa mayoritariamente en todos los tejidos de la planta, y otros dos presentan bajos niveles de transcritos, similar a *AtGAD3* y *AtGAD4*, por lo que se postulan como posibles genes inducidos en frutos durante diferentes tipos de estrés (Shelp y col., 2013).

El patrón de expresión de los genes *GAD* puede cambiar en respuesta a varios estreses abióticos y bióticos. Además, los genes *GAD* que no se expresan en condiciones normales de crecimiento podrían estar presentes en altos niveles en estreses medioambientales, pero el rango de tiempo de respuesta de estos genes depende de cada especie. Así por ejemplo, *AtGAD4* sólo se detecta en flores y en bajos niveles, pero los mensajeros de este gen aumentan en raíces en condiciones limitantes de oxígeno mostrando un pico de máxima expresión a las ocho horas después del estrés (Miyashita y Good, 2008). Aunque respuestas más lentas que van de ocho horas hasta varios días se han observado en otras especies (Tabla 2). El tiempo de respuesta también va a variar del tipo de estrés al que esté sometida la planta. Los transcritos de los *GADs* de *Panax ginseng* muestran su máximo pico de inducción a la hora del tratamiento por anoxia o

CAPITULO 1

por calor, y a las ocho horas del tratamiento de frío o de sal, e incluso después de ocho horas en el caso de estrés por daño mecánico (Lee y col., 2010; Tabla 2.2). Estos estudios claramente muestran que tanto la GAD como el GABA están asociados a estrés, pero todavía no está claro cuál es el papel de cada GAD en las diferentes respuestas.

Tabla 2. Tiempos de máxima de inducción de los mensajeros de los GADs en distintas especies bajo diferentes tratamientos de estrés.

Especies	Tratamiento de estrés	Gen GAD y su correspondiente tiempo del pico de inducción de máxima expresión	Referencia
<i>Arabidopsis thaliana L.</i>	Hipoxia	<i>GAD4</i> 8h	Miyashita y Good, 2008
<i>Panax ginseng C.A. Meyer</i>	Anoxia	GAD consenso 1h	Lee y col., 2010
	Frío (4°C)	8h	
	Calor (37°C)	1h	
	NaCl (100 mM)	8h	
	Heridas	24h	
	H ₂ O ₂	Inhibición	
<i>Nicotiana sylvestris</i>	NaCl (100 mM)	8h	Akcay y col., 2012
<i>Solanum lycopersicum L.</i>	Hipoxia tratamiento con CO ₂	<i>GAD1</i> 7d	Mae y col., 2012
		<i>GAD2</i> 5d	
		<i>GAD3</i> 7d	
	Hipoxia Tratamiento sin CO ₂	<i>GAD1</i> 5d	
		<i>GAD2</i> 3d	
		<i>GAD3</i> 7d	
<i>Glycine max L.</i>	Estrés biótico (<i>Phytophthora sojae</i>)	<i>GAD1</i> 6h	Hyun y col., 2013
		<i>GAD4</i> 6h	
		<i>GAD5</i> 6h	

Para poder elucidar los posibles papeles de las GADs en plantas se han realizado transgénicos alterando su expresión mediante sobre-expresión o silenciamiento. La sobre-expresión de una GAD truncada de petunia, sin los 27 aminoácidos del extremo c-terminal que corresponde al CaMBD, en tabaco, ha provocado anomalías en el desarrollo de estas plantas debido a la inhibición en la elongación de las células del córtex del tallo (Baum y col., 1996). La pérdida del dominio auto-inhibitorio regulado por Ca⁺²/CaM provoca un aumento de la actividad GAD, afectando a los niveles de glutamato y GABA, lo que sería responsable de los cambios en el desarrollo de estas plantas. Además, la sobre-expresión de GAD podría tener una aplicación

biotecnológica. Por ejemplo, la sobreproducción de OsGAD2 (de arroz) y el silenciamiento de *GABA-T* en plantas de arroz permite la acumulación de GABA en el grano (Shimajiri y col., 2013), que previene la hipertensión moderada en humanos (Tsuchida y col., 2003). La alteración de la síntesis de GABA también podría alterar las propiedades organolépticas de semillas y frutos. Para la modificación del sabor del tomate, se realizaron plantas transgénicas de tomate con un *GAD* antisentido observándose un aumento en los niveles de glutamato que provoca una maduración en el fruto (Kisaka y col., 2006). La alteración de la expresión génica parece ser la aproximación válida para entender el papel fisiológico de los genes *GAD* en las diferentes especies de plantas.

Síntesis de GABA y su contexto metabólico

1. Ruta del GABA shunt y estrés

El GABA shunt es una ruta metabólica que se describe como un baipás al ciclo de Krebs (Fig.4). El GABA shunt está compuesto por tres enzimas, la GAD es la primera de las enzimas y cataliza una reacción irreversible. La GABA transaminasa (*GABA-T*) cataliza la segunda reacción que consiste en la conversión de GABA a semialdehído succínico (SSA) usando piruvato o glioxilato como aceptor del grupo amino y genera alanina o glicina respectivamente. Además, se ha observado *in vitro* que la existencia de una actividad *GABA-T* que puede usar 2-oxoglutarato para producir glutamato. La semialdehído succínico deshidrogenasa (*SSADH*) es la tercera enzima de esta ruta alternativa y oxida el SSA para producir succinato, que entraría al ciclo de Krebs generando poder reductor NADH. La GAD se encuentra en el citosol y tanto la *GABA-T* como el *SSADH*, en la mitocondria. El GABA shunt conecta el metabolismo del nitrógeno y del carbono, considerando que el GABA puede derivarse a succinato que puede servir como fuente de carbono, y que el glutamato es el sustrato inicial de esta ruta y producto del ciclo GS/GOGAT, ciclo que se describe como la fuente principal de glutamato a partir de la asimilación de nitrógeno inorgánico. El GABA shunt puede estar regulado por pH, calcio, ATP y NADH. A pH ácido (5,8) y en presencia de calcio aumenta la actividad GAD en cambio, alto pH (8-10) regula positivamente la actividad *GABA-T* y *SSADH*. Por otro lado, altos niveles de ATP y NADH inhibe la actividad *SSADH* (Busch y Fromm, 1999). El correcto funcionamiento del GABA shunt es necesario para restringir los niveles de especies intermedias de oxígeno (ROI), ya que la deficiencia de *SSADH* en plantas causa la acumulación de

ROI, lesiones necróticas, enanismo y hipersensibilidad a estreses medioambientales (Fait y col., 2008).

En condiciones de estrés como hipoxia, sequía y otros factores el SSA no se oxida a succinato, en cambio, puede ser reducido a gammahidroxibutirato (GHB) por un grupo de proteínas de la superfamilia hidroxiiisobutirato deshidrogenasa. Esta familia incluye enzimas que reducen el SSA y el glioxilato a γ -hidroxibutirato y glicolato respectivamente. En *Arabidopsis*, se han identificado isoformas que se localizan en el citosol y en el plasto, y son dependientes de NADPH para reducir el SSA y se denominan glioxilato reductasas (GLYR). El SSA y el glioxilato se generan del metabolismo del GABA y del glicolato respectivamente, y frecuentemente se han asociado a condiciones de estrés ó a la fotorrespiración para la producción de glicolato (Allan y col., 2009). La función de estas reacciones no está clara, aunque podría estar relacionada con el consumo de poder reductor para paliar las situaciones de estrés.

2. Fuentes alternativas de GABA y su transporte

Aunque la reacción catalizada por GAD se considera la fuente principal de GABA, el catabolismo de putrescina también puede producir GABA (Fig. 4). Como ocurre con el GABA, varios tipos de estrés como sequía, sal y frío modulan los niveles de poliaminas, y estos niveles se correlacionan positivamente con la tolerancia al estrés (Krasensky y Jonak, 2012). Los niveles de GABA también pueden estar regulados por el transporte entre células y órganos de la planta. Se han descrito varios transportadores como el AAP3, ProT1 y ProT2 que tienen baja afinidad (rango mM) por el GABA. Estos transportadores también pueden contribuir al transporte de otros compuestos relacionados con estrés como glicina betaína o prolina (Grallath y col., 2005). Recientemente, se han descubierto transportadores de alta afinidad para GABA. Ejemplo de ello es un miembro de la familia de transportadores de aminoácidos en *Arabidopsis* (*AtGAT1*) que actúa como un transportador impulsado por protones, y presenta alta afinidad por el GABA (rango μ M) aunque también puede transportar otros compuestos a través de la membrana plasmática (Meyer y col., 2006). Además, un miembro que pertenece a la familia de transportadores de aminoácidos/poliaminas/organocatiónicos de *Arabidopsis* que se conoce como permeasa de GABA (GABP) se localiza en la membrana mitocondrial y fue descubierto al complementar un mutante de levadura deficiente en el transporte por lo que crecía en GABA pero no en prolina (Michaeli y col., 2011; Shelp y col., 2012c).

La existencia de varios transportadores de GABA indica la relevancia que este metabolito puede tener en metabolismo y señalización. El GABA es un punto de conexión entre metabolismo del nitrógeno y el carbono, pero también su síntesis y metabolismo parece relevante en la señalización del estado redox de la célula, el pH y la homeostasis de Ca^{2+} (Shelp y col., 2012b).

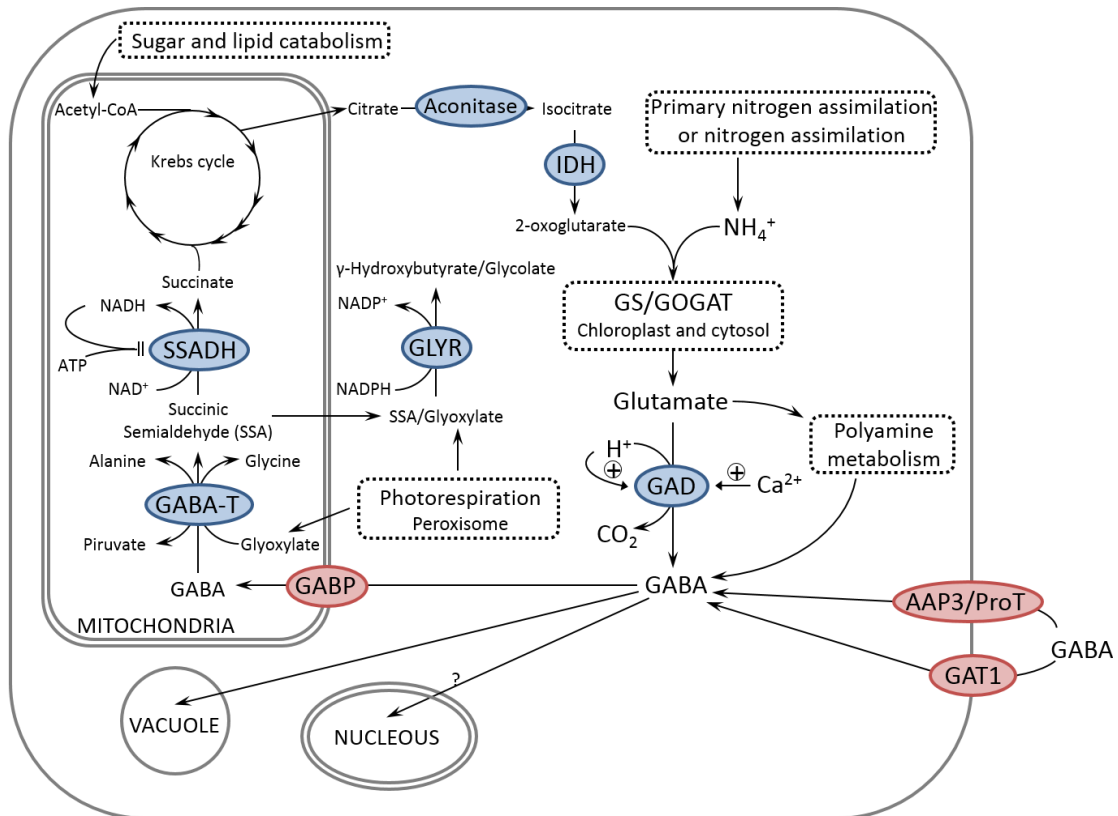


Figura 4. GABA shunt y rutas metabólicas relacionadas.

Tres enzimas están involucradas en el GABA shunt: la glutamato descarboxilasa (GAD) en el citosol, la GABA transaminasa (GABA-T) y la semialdehído succínico deshidrogenasa (SSADH) en la mitocondria. El GABA shunt está alimentado por glutamato, cuya fuente principal es a partir de amoníaco inorgánico asimilado por el ciclo glutamina sintetasa/glutamato sintasa (GS/GOGAT). El GABA shunt puede estar regulado por pH, Ca^{2+} , ATP y NADH. En condiciones reductoras cuando el NAD(P)H aumenta, por ejemplo en estrés, el semialdehído succínico (SSA) no se oxida a succinato, pero se puede reducir a γ -hidroxibutirato por la superfamilia hidroxibutirato deshidrogenasa. En el esquema se muestra un miembro de esta familia que es la semialdehído succínico/glioxilato reductasa (GLYR). Tanto SSA como glioxilato normalmente se generan a partir de GABA o de la ruta fotorrespiratoria (Allan y col., 2009). El metabolismo de putrescina también puede producir GABA. El GABA puede transportarse de célula a célula y/o en los diferentes órganos de la planta. Así, AAP3, ProT1 y ProT2 son transportadores de GABA de baja afinidad (rango mM), además pueden transportar otros compuestos sintetizados en estrés. GAT1 es un transportador de alta afinidad (rango μM) que se sitúa en la membrana plasmática. Una permeasa de GABA (GABP) se va a encargar de transferir el GABA del citosol a la mitocondria. El GABA es un punto de conexión entre el metabolismo del nitrógeno y el carbono, siendo importante en la señalización del estado redox celular, y de la homeostasis del pH y del Ca^{2+} . Otras abreviaturas, IDH: isocitrato deshidrogenasa.

3. Funciones clásicas y recientes de la GAD y el GABA

Desde hace tiempo, se han atribuido varias funciones a la GAD y al GABA. Una de las funciones de la GAD es la de tamponador del pH citosólico, ya que la reacción GAD consume protones y se activa a pH ácido (revisado en Shelp y col., 1999; Kinnersley y Turano, 2000). También, el GABA se considera un reservorio temporal de nitrógeno, habiéndose descrito que puede aumentar sus niveles después de la adición de amonio al medio o por un aumento en la degradación de proteínas pudiéndose encontrar almacenado en la vacuola hasta el 50% del GABA de la célula (Satyanarayan y Nair, 1990; Scott-Taggart y col., 1999).

Otro papel que se le ha asignado al GABA es el de osmolito compatible en situaciones de estrés. Como zwitterión, el GABA puede alcanzar altas concentraciones (rango mM) en la célula sin efectos tóxicos aparentes, al igual que ocurre con la prolina y la glicina betaína. Se ha descrito que altas concentraciones de GABA estabilizan y protegen a tilacoides aislados contra daños por congelación, excediendo incluso las propiedades crioprotectoras de la prolina y la glicina betaína a las mismas concentraciones (Heber y col., 1971).

Además, la capacidad del GABA como secuestrador del anión superóxido, del peróxido de hidrogeno y del oxígeno singlete es significativamente superior a la de la prolina, lo que apunta a un posible papel en la reducción de la producción de ROS en condiciones de estrés hídrico (Liu y col., 2011).

El GABA también se ha relacionado con la respuesta de defensa de la planta frente al ataque de patógenos. Por ejemplo, la incorporación de GABA a la dieta de larvas de fitófagos *Choristoneura rosaceana* reduce sus tasas de crecimiento, desarrollo y supervivencia (Ramputh y Bown, 1996). En la naturaleza este tipo de insectos destruyen la compartimentación vacuolar, ya que se alimentan de las hojas, lo que aumenta los niveles de H^+ en el citosol y estimula la actividad GAD y por lo tanto la síntesis de GABA en las zonas atacadas. El incremento de los niveles de GABA en hojas como resultado del ataque de insectos (Wallace y col., 1984) puede causar la inhibición de la actividad neuromuscular de los mismos después de alimentarse de ellas (Irving y col., 1979) ya que el GABA es un neurotransmisor inhibitorio en animales que hiperpolariza las membranas neuronales mediante el estímulo de canales de cloro sensibles a GABA a través de los cuales entra el cloro al interior celular (Casida, 1993; Hosie y col., 1997).

CAPITULO 1

También se ha observado variación en los niveles de GABA durante el desarrollo de las plantas. Así, altos niveles de GABA en *Arabidopsis* se han correlacionado con una reducción en la dominancia apical, provocando un alto grado de ramificación y una reducción en el tamaño de las silicuas y de una menor producción de semillas (Mirabella y col., 2008). En tabaco, *Stellaria*, arroz y *Arabidopsis*, altas concentraciones de GABA o del ratio GABA/glutamato se han correlacionado con la inhibición de la elongación del tallo o enanismo (Baum y col., 1996; Kathiresan y col., 1998; Akama y Takaiwa, 2007; Renault y col., 2011).

Recientemente, varios estudios se han centrado en otros posibles papeles del GABA en plantas como son el transporte iónico y en señalización. El hecho de que el GABA regule el transporte iónico en animales plantea la hipótesis de que también puede tener un papel similar en plantas. *Lemna minor* incrementó su crecimiento de 2 a 3 veces cuando se le añadió 5 mM de GABA en el medio en cultivo *in vitro*. Este crecimiento se asoció al incremento en el contenido mineral de las plantas tratadas, y fue inhibido con bicuculina y picrotoxina, que son antagonistas competitivo y no competitivo respectivamente de los receptores del GABA en el sistema nervioso central (Kinnersley y Lin, 2000). En plántulas de *Arabidopsis* crecidas *in vitro*, se observó que el GABA promueve la absorción de NO_3^- en condiciones limitantes de NO_3^- , pero el GABA inhibe esta adquisición en altas concentraciones de NO_3^- (Barbosa y col., 2010). Estos hallazgos soportan el papel del GABA como modulador potencial del transporte iónico en plantas. Aunque, de momento no se han identificado receptores de GABA en plantas homólogos a los receptores de GABA de animales, sí se han descrito que los receptores de glutamato (GLRs) podrían utilizar el GABA como un ligando modulador (Yu y col., 2006; Lacombe y col., 2001), por lo que esto afirmaría el papel del GABA como molécula señal. La producción de un gradiente de GABA puede estar involucrado en la orientación y el crecimiento del tubo polínico en *Arabidopsis* (Palanivelu y col., 2003), y podría potenciar la absorción de nitrato a través de la vía de señalización a larga distancia en *Brassica napus* (Beuve y col., 2004). Otros trabajos han relacionado al GABA con el etileno. Kathiresan y col., 1997 observaron que el GABA provocaba el incremento de los niveles de transcritos de la ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa (ACC sintasa) y de la oxidasa (ACC oxidasa), enzimas implicadas en la biosíntesis del etileno en plantas. Por otro lado, los estudios de Reggiani (2006) indican que tanto la señal de etileno como su síntesis son necesarias para inducir la acumulación de GABA en arroz. Además, Shi y col., (2010) mostraron que el GABA incrementaba

los niveles de ACC sintasa y de la ACC oxidasa en raíces de *Caragana* en condiciones de estrés salino, y que además alteraba los niveles de transcritos de genes relacionados con la transducción de señales, regulación transcripcional, con ROS y con el metabolismo de poliaminas. Lancien y Roberts (2006) observaron que el GABA disminuye la expresión de un gran set de genes de la familia 14-3-3 en plántulas de *Arabidopsis* en una manera dependiente de calcio, etileno y ácido abscísico (ABA). Las 14-3-3 son proteínas reguladores ubicuas que funcionan por la interacción directa con un amplio rango de proteínas diana, normalmente de manera dependiente de fosforilación. Varias enzimas claves en el metabolismo del nitrógeno y del carbono son diana de las 14-3-3 incluyendo la nitrato reductasa (NR), la glutamina sintetasa (GS), almidón sintasa III y la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), por lo que sugiere que el GABA forma parte del control del balance C/N en la planta.

Por último, el GABA también se le ha asociado con procesos de xilogénesis en árboles. Molina-Rueda y col., (2010) observaron que los niveles de GAD y GABA se asociaban al desarrollo vascular del hipocótilo en pino, y que después de un estrés mecánico, en el que se induce madera de reacción, se alteran los niveles de expresión de la GAD de pino a la vez de genes relacionados con la síntesis de etileno. Además, el GABA se localiza en tejidos vasculares incluyendo xilema en diferenciación (Molina-Rueda y col., 2015). Durante la xilogénesis se produce una muerte celular programada (PCD) que implica una entrada de Ca^{+2} que provoca una ruptura vacuolar y la disminución del pH citosólico. Ambos factores incrementan la actividad GAD.

4. *Populus* como especie modelo

La especie modelo por excelencia para la investigación vegetal ha sido *Arabidopsis* debido a que posee un tiempo de generación corto, un genoma pequeño, es fácil de crecer en el laboratorio debido a su porte pequeño y fácil de transformar para generar plantas transgénicas. Pero al tratarse de una especie herbácea anual no la hace idónea para el estudio de procesos tales como formación de madera o tolerancia a estrés por tiempos prolongados. En cambio, las plantas leñosas poseen un crecimiento secundario en el que se forma la madera, y que le proporciona el sostén necesario para desarrollar un mayor porte.

En este estudio se utilizó como especie modelo un árbol perteneciente al género *Populus* por varias razones: 1) posee un genoma compacto, sobre unas 50 veces más pequeño que el genoma de pino (Tuskan y col., 2006), y la secuencia del genoma

CAPITULO 1

completo de la especie *P. trichocarpa* se encuentra disponible (www.phytozome.net); 2) desde el punto de vista taxonómico es una especie relativamente próxima a *Arabidopsis*, ya que ambas se tratan de angiospermas dicotiledóneas pertenecientes a la clase Magnoliopsida que comparten sobre un 75% de ESTs, ayudando al estudio de los genes mediante genómica comparativa (Sterky y col., 2004); 3) es un buen modelo del estudio del proceso de formación de madera y como fuente de materias primas ligno-celulósicas para biocombustibles, ya que presenta un rápido crecimiento, es fácil de propagar vegetativamente y de transformar; 4) permite el estudio del transporte a larga distancia de agua y nutrientes, señalización sistémica, estudios del ciclo del nitrógeno y almacenaje de este en plantas perennes, adaptación a condiciones de estrés, etc. (Jansson y Douglas, 2007).

Mediante la generación de especies híbridas de *Populus* se han mejorado las características de éstas para la investigación. A día de hoy, es muy utilizado el híbrido *P. tremula x P. alba* (INRA clon 717-1-B4) que presenta un rápido crecimiento, además de ser una especie muy susceptible a la infección por *Agrobacterium tumefaciens* (Leplé y col., 1992), permitiendo usarlo como vector para generar plantas transgénicas resistentes a plagas o a condiciones ambientales extremas, y para la caracterización funcional de genes.

Objetivos del estudio

A diferencia de lo que ocurre en animales y en otros organismos, la GAD de plantas posee un dominio de unión a CaM lo que pone de manifiesto la relevancia de su regulación e implicación en diferentes procesos celulares (Turano y Fang, 1998; Zik y col., 1998; Yevtushenko y col., 2003; Oh y col., 2005), debido a que el Ca^{2+} y la CaM son componentes de muchos sistemas de transducción de señales (Bush, 1995; Yang y Poovaiah, 2003). A la posible implicación de la GAD en varios procesos, se añade la redundancia en el número de genes que codifican la proteína debido a duplicaciones génicas que han tenido lugar durante la evolución (Sukhareva y Mamaeva, 2002) y su posible especialización de funciones durante la diversificación de las plantas vasculares. Esta tesis responde al interés en determinar las funciones biológicas de la GAD en plantas superiores, que es compartida por varios grupos de investigación que están abordando este interesante reto en los diferentes modelos. Los estudios descritos en este trabajo se realizan en *Populus*, unos de los principales modelos de investigación de plantas de interés forestal (Taylor, 2002), usado previamente por el grupo investigador en varios trabajos anteriores (Gallardo y col., 1999 y 2003; Fu y col., 2003; El Katib y col., 2004; Jing et al., 2004; Pascual y col., 2008a; Molina-Rueda, 2009; Merino y col., 2014) y en el que se sospecha que la síntesis de glutamato y GABA, sustrato y producto de la reacción catalizada por la GAD, es relevante en el desarrollo vascular en base a los trabajos previos realizados en coníferas (Palomo y col., 1998; Pascual y col., 2008b, Molina-Rueda y col., 2010 y 2015).

Los objetivos específicos de este trabajo son los siguientes:

- 1) Estudiar la adquisición del dominio de unión a calmodulina (CaMBD) de las GADs de plantas vasculares.
- 2) Asignar posibles funciones a la familia génica GAD de *P. tremula x P. alba* (*PtaGAD*) en condiciones normales de crecimiento y en condiciones de estrés.
- 3) Analizar el efecto del glutamato y del GABA en la arquitectura radicular de *P. tremula x P. alba*.

Capítulo 2

Presence of GABA in differentiating xylem and evolution of the calmodulin binding domain in glutamate decarboxylases support a role for GABA in plant xylem development

Manuscript title: Presence of GABA in differentiating xylem and evolution of the calmodulin binding domain in glutamate decarboxylases support a role for GABA in plant xylem development

Authors: Juan Jesús Molina-Rueda, Alicia Garrido-Aranda, Estefanía Chapman-López, José Pisarra y Fernando Gallardo Alba.

Manuscript in preparation

Contributions of Alicia Garrido Aranda to the manuscript: Performed the experiments and wrote the paper.

Introduction

γ -aminobutyric acid (GABA) is a non-proteinogenic amino acid widely distributed among living organisms from all kingdoms. GABA is mainly synthesized through decarboxylation of glutamate by glutamate decarboxylase (GAD), and it is degraded sequentially by the enzymes GABA transaminase (GABA-T) and succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH). These three enzymes catalyze a bypass of the Krebs cycle known as GABA shunt. GABA and GABA shunt have been reported to play roles in diverse processes such as acid tolerance in bacteria (Feehily and Karatzas, 2013), thermotolerance in fungi (Cao et al., 2013), and modulating neuronal activity in animals (Watanabe, 2014). In plants, several roles have been proposed for GABA metabolism such as component in carbon and nitrogen primary metabolism (Fait et al., 2008), protection against reactive oxygen species (Liu et al., 2011), gene expression regulation including the regulation of hormone related genes (Kathiresan et al., 1997; Shi et al., 2010; Lancien and Roberts, 2006) and signaling as long distance signal (Beuve et al., 2004) and as a gradient driving pollen tube growth and guidance (Palanivelu et al., 2003).

We have previously reported a novel putative role for GABA in vascular differentiation in pine seedlings (Molina-Rueda et al., 2010, 2015b). According to this role, results showed a differential expression of pine GAD during vascular alterations associated with reaction wood development. Reaction wood in gymnosperm is called compression wood and it is specifically produced in the underside of branches and bent stems of gymnosperm species in order to return the axis to the normal vertical position or to maintain a certain angular orientation of a branch. Vascular alterations in compression wood include generally much shorter tracheids with thicker cell walls containing more lignin and less cellulose than in the opposite side (Timell, 1986). Transcript profile of genes coding for enzymes involved in the biosynthesis of ethylene (ACC synthase and oxidase), an hormone that plays clear roles in vascular development in gymnosperms, correlated with GAD transcript profile during vascular differentiation in hypocotyl and stem of pine seedlings (Molina-Rueda et al., 2010). Furthermore, in agreement with a role for GABA during vascular development, GABA was immunolocalized in differentiating xylem in pine hypocotyls (Molina-Rueda et al., 2015b). Here, to test whether the proposed GABA role in the gymnosperm might be applicable to other vascular plants, we investigated in bent poplar plants the response of

GAD expression to vascular alterations associated with the reaction wood development, which is called tension wood and is specifically produced in the upper-side of branches and bent stems of angiosperms. Additionally, the presence of GABA was analyzed in stem sections of poplar by GABA immunolocalization.

Considering the importance of the roles described for GABA production in living beings (Molina-Rueda et al., 2015a), a fine regulation of its production is expected. It has been described that GAD activity can be modulated by phosphorylation in its N-terminal in humans (Wei et al., 2004) and by pH through a regulatory mechanism mediated by its C-terminal in bacteria (Gut et al., 2009; Shin et al., 2014). Plant GAD activity not only increases by acidic pH, as described in bacteria, but also by calcium/calmodulin ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$). So far, only angiosperms, with the exception of the fungi *Saccharomyces cerevisiae* (Coleman et al., 2001), have been reported to present GADs with calmodulin binding domain (CaMBD) in their C-termini. Calcium is one of the most prominent secondary messenger in eukaryotic cells. The regulatory network mediated by $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ not only has a principal role in responses against a wide range of biotic and abiotic stresses in plants (Yang and Poovaiah, 2003; Bouché et al., 2005; Bender and Snedden, 2013; Cheval et al., 2013), but also plays a crucial role in wood formation (Fromm, 2010) and in triggering programmed cell death during xylogenesis (Bollhöner et al., 2012). We had reported the presence of a functional CaMBD in a pine GAD (Molina-Rueda et al., 2010), disclosing that the regulation of GAD by calcium had occurred in the evolution before the split between angiosperm and gymnosperm (360 mya), and suggesting a noticeable importance of calcium regulation of GADs during land plant evolution. However, when the evolutionary acquisition of CaMBD in the green lineage occurred, and whether this event played a role in the vascular plants evolution, are questions that had not received clear answers yet. Here, in order to shed some light on these intriguing issues, we also investigate the presence of CaMBDs in GADs of the principal green lineage taxa.

Results and Discussion

Glutamate decarboxylase expression under bent stimulus

Previously, we found that GAD was differentially expressed in response to compression wood development in stem of pine seedlings and that was correlated with expression of genes coding for key enzymes of ethylene biosynthesis (Molina-Rueda et al., 2010). Like compression wood, generation of tension wood is described as a mechanism by which branches and stems recover from leaning to more upright positions. Vascular alterations in tension wood include xylem fibers with higher length, thicker cell walls, and higher cellulose content and less lignin than those in normal wood (Pitre et al., 2010). If GAD plays a role in vascular development in angiosperms, its expression is expected to respond differentially to vascular alterations produced during the development of tension wood. A typical eccentric stem was observed in stained sections as consequence of reaction wood development after the bent treatment (Fig. 1A). Transcript levels of a GAD gene (*GAD1*, orthologue to the *Populus trichocarpa* gene *Potri.012G039000*) were higher in tension sides than in opposite sides in both apical and basal portion of stems (Fig. 1B). Transcript levels of other two *GADs* (*GAD2* and *GAD3*, orthologues to *Potri.004G075200* and *Potri.T059200* respectively) were also measured, but their expression patterns (data not shown) were not clearly associated to any side as previously described (Molina-Rueda, 2009). It is known that ethylene is a plant hormone involved in cambium growth and xylem differentiation in poplar (Love et al., 2009). Furthermore, a gene encoding an 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (*ACO1*), a key enzyme in ethylene biosynthesis, has been reported to be greatly induced during the generation of tension wood in poplar (Andersson-Gunnerås et al., 2003). Here the expression of this gene coding for *ACO1* showed a pattern clearly associated with tension wood and was correlated with the expression of *GAD1* (Fig. 1B).

Correlations between GAD expression or GABA treatments and ethylene production or cell elongation have been previously reported. GABA stimulated ethylene production in sunflower and both expression and activity of ACO (Kathiresan et al., 1997). Furthermore, higher GABA production caused deficiencies in cell elongation in transgenic tobacco (Baum et al., 1996) and rice plants (Akama and Takaiwa, 2007), and *Stellaria longipes* plants treated with exogenous GABA showed induction of stem elongation with low GABA concentrations and inhibition of stem elongation with high

GABA concentrations (Kathiresan et al., 1998). Additionally, exogenous GABA treatment of an Arabidopsis GABA transaminase mutant lead to cell elongation defect in root and hypocotyl and a decrease in the expression of cell-wall related genes (Renault et al., 2011). Considering these facts, and that fiber elongation and composition are altered in reaction wood when compared with normal wood, our previous results in the gymnosperm (Molina-Rueda et al., 2010, 2015b) and now in an angiosperm, support a role for GAD and GABA as possible mediators in vascular differentiation during reaction wood production.

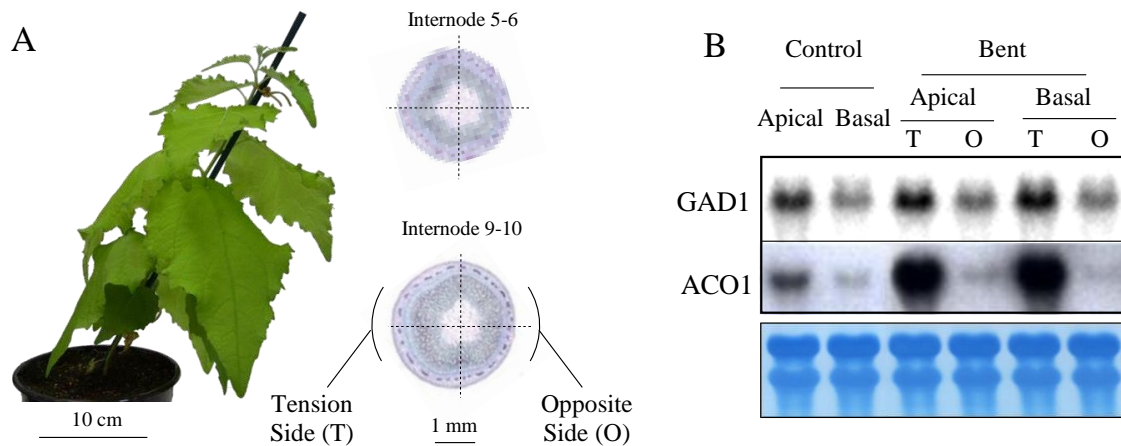


Figure 1. Expression of *P. tremula X P. alba* *GAD1* in bent stems. **A.** Picture of a 4 days bent poplar plant, and hematoxylin-eosin stain of 10 μ m sections showing a thickening associated to the tension side from two internodes. **B.** Expression of *GAD1* (KP733694), and ACC oxidase 1 (*ACO1*, KP733697), the orthologue of a ACO induced in tension wood (Andersson-Gunnerås et al., 2003), in apical (internodes 4-8) and basal (internodes 8-12) regions of stems by northern blot. 10 μ g of total RNA was used for northern blotting and stained on membranes by methylene blue for loading control. (Fig. 1A and panel showing *GAD1* expression in Fig. 1B were taken from PhD Thesis manuscript of Dr. Juan Jesús Molina Rueda, with permission).

GABA immunolocalization in stem

GABA immunolocalization was carried out as previously described for pine seedlings (Molina-Rueda et al., 2015b) to identify the structures in which GABA was present in the stem of poplar plants. Sections of apical (internode 3-4) and basal (internode 11-12) regions were stained for general structure view and tissues identification (Fig. 2A). Equivalent sections were subjected to GABA immunolocalization protocol with no primary antibody (GABA antibody) as negative control (Fig. 2B), or with GABA antibody (Fig. 2C). Negative controls for immunolocalization (Fig. 2B) showed the typical autofluorescence of secondary cell walls as previously observed in negative controls of pine sections (Molina-Rueda et al.,

2015b). GABA immunolocalization clearly revealed the presence of GABA associated with the vascular cylinder (green signal in Fig. 2C). GABA was mainly detected in xylem ray parenchyma cells and axial differentiating xylem cells in the two stem regions (Fig. 2C and Fig. 3). It has been previously reported that these two structures, wood rays and axial immature xylem cells, showed most of the GABA signal in the stem of pine seedlings (Molina-Rueda et al., 2015b).

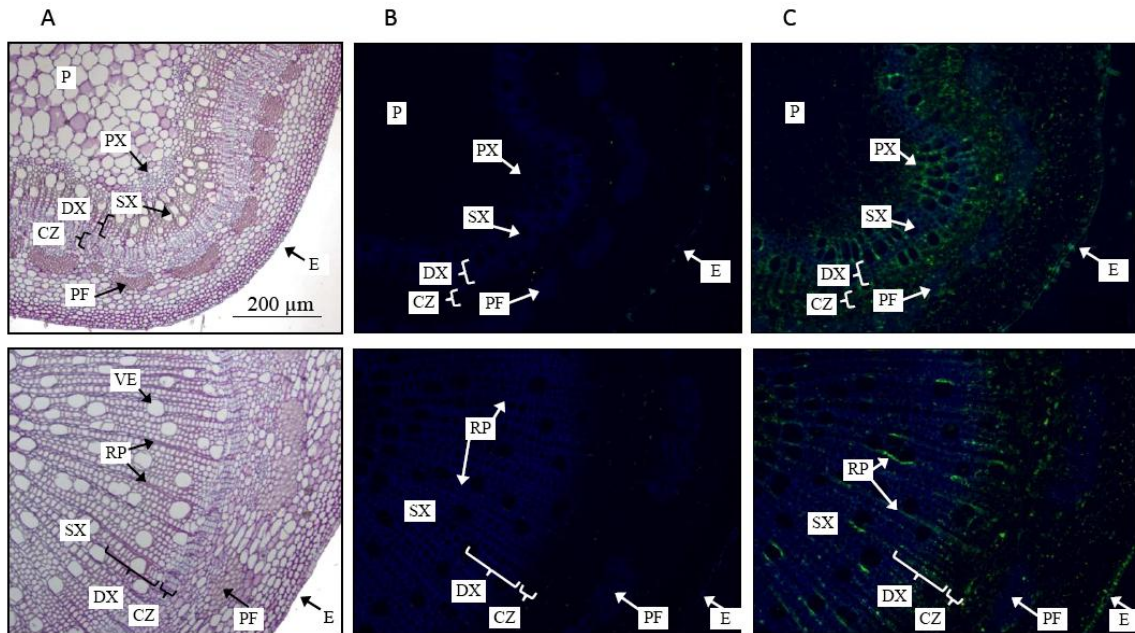


Figure 2. Structure and GABA immunolocalization in stem sections of *P. tremula* X *P. alba* plants. **A.** Hematoxylin-eosin staining of equivalent region where GABA immunolocalization was carried out (mid regions of internodes 3-4, top, and 9-10, bottom, numbering from the stem apex, considering node 1 as the first node which leaf is at least 1 cm width). **B.** Negative controls (no GABA antibody) showing only blue fluorescence from secondary cell walls of xylem differentiated cells and sclerenchyma bundles (Sc). **C.** GABA localization denoted by green labeling. CZ, cambial zone; DX, axial differentiating xylem; E, epidermis; P, pith; PF, phloem fibers; PX, primary xylem; RP, radial parenchyma; Sc, sclerenchyma bundles; SX, secondary xylem; VE, vessel element. (Results from PhD Thesis manuscript of Dr. Juan Jesús Molina Rueda, with permission).

Wood ray parenchyma acts as a radial route for the transfer of inorganic ions and other compounds from the axial xylem to the vascular cambium, which represent a strong sink tissue during growing periods (Arend et al., 2004). This transport is driven by an electrochemical gradient mainly generated by the ubiquitous proton pumping ATPases of the plasma membrane of plant cells, which have been immunolocalized in wood ray parenchyma in poplar plants (Arend et al., 2004) and it is generally coupled to proton import and therefore associated with a decrease in cytosolic pH. Considering

these evidences and that to keep the pH of the cytosol stationary (pH-stat) is a role proposed for GABA production in plants as GAD is active at low pH and catalyzes a proton-consuming reaction (Shelp et al., 1999), a role for GABA production in ray parenchyma involved in the pH buffering associated to transport of substances in this tissue seems reasonable.

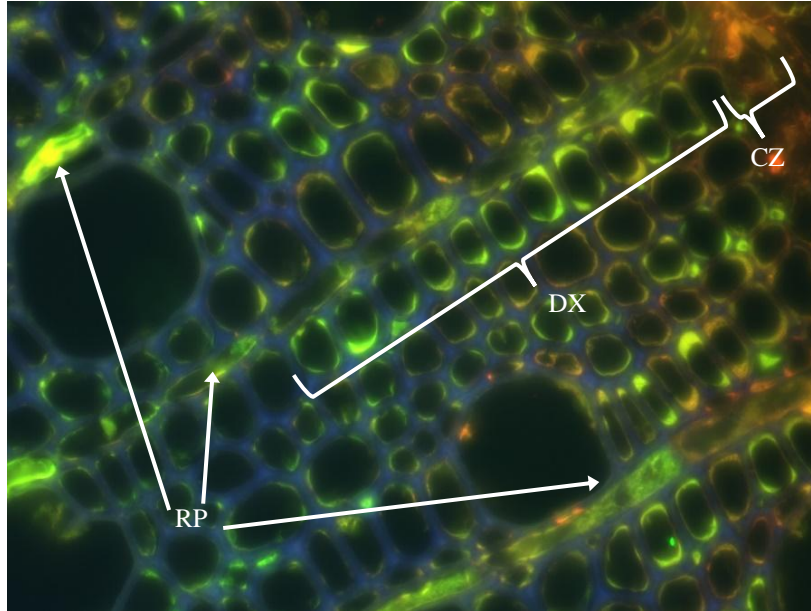


Figure 3. Details of structures that show GABA signal in basal stem sections (internode 9-10) of *P. tremula x P. alba* plants. GABA signal (green labeling) was observed in differentiating axial xylem cells (DX) and radial xylem parenchyma cells (RP). CZ, cambial zone.

GABA presence in differentiating xylem cells may be expected since this process results in a pH decrease because of vacuolar collapse, but also produces a cytosolic calcium concentration increase, two factors that raise the plant GAD activity (Ramputh and Bown, 1996). GABA production by GAD is fed by glutamate. Glutamate is a key amino acid in plant nitrogen metabolism and the product of the glutamine synthetase/glutamate synthase (GS/GOGAT) cycle, which is described as the principal ammonium assimilatory pathway in plants. Based on this metabolic connection between GABA and ammonium assimilation through the GS/GOGAT cycle, GABA synthesis has been given a role in ammonium primary assimilation in *Arabidopsis* (Turano and Fang, 1998). During xylogenesis, ammonium is produced by phenylalanine ammonia lyase, a key enzyme in lignin biosynthesis pathway. Re-assimilation of ammonia by the GS/GOGAT cycle is thought to be a quantitatively relevant process during production of secondary cell wall (Gallardo et al., 2003; Castro-Rodríguez et al., 2011). Therefore,

GABA production may also have a contribution in C/N balance during xylogenesis. In addition, GABA may act as signal molecule (Häusler et al., 2014; Michaeli and Fromm, 2015). Thus, GABA production has been related to cell elongation (Baum et al., 1996; Renault et al., 2011), ethylene production (Kathiresan et al., 1997, 1998; Shi et al., 2010), and ROS protection (Shi et al., 2010; Liu et al., 2011; Bao et al., 2015), which are crucial factors regulating vascular development (Love et al., 2009; Andersson-Gunnerås et al., 2003). Altogether, the production of GABA could be a critical factor in lignification because of its apparent metabolic and signaling role during the differentiation of xylem.

CaMBDs in GADs

Calcium regulation of GAD is mediated by its CaMBD, and a correct regulation of GAD activity by this domain has been reported to be essential for normal development in both dicotyledons and monocotyledons (Baum et al., 1996; Akama and Takaiwa, 2007). The presence of functional CaMBDs have been extensively described in GADs of angiosperm species and, more recently, also in a gymnosperm (Molina-Rueda et al., 2010), which highlight an ancient and conserved mechanism of regulation of the GAD activity by calcium/calmodulin ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) in the plant kingdom. To understand how CaMBD evolved in GADs regulation during evolution, GADs of several taxa across the green lineage were localized (Supplementary Table S1) and their C-termini were analyzed (Fig. 4). First, a typical CaMBD of plant GADs was defined by the consensus sequence of 35 CaMBDs of GADs from the principal angiosperm taxa (Magnoliophyta) (Supplementary Table S2). In general, the description reported for CaMBDs correspond to positively charged amphiphilic α -helix sequences of 10-30 amino acids (O'Neil and DeGrado, 1990; Vetter and Leclerc, 2003). Specifically, functional CaMBDs of plant GADs present a hydrophobic central region typically flanked by lysines (K), being a central tryptophan residue and the lysines in the carboxy-flank essential for binding CaM (Arazi et al., 1995; Gut et al., 2009) (blue and red arrows respectively in Fig. 4). Alignment of GADs revealed that carboxy-terminal regions aligned with the CaMBDs of the angiosperm consensus were found in all GADs with the exception of the prokaryotic GAD (Sy) (Fig. 4B). Furthermore, all eukaryotic species included in this study have at least one GAD which carboxy-terminal corresponded to predicted α -helix with positive charges due to a high abundance of lysines, two typical features of CaMBDs. These points suggest that the CaMBDs of

angiosperms and gymnosperms evolved from a pre-existing region in GADs of their ancestor groups early in the evolution of the green lineage. However, the conservation degree of the essential lysines and the tryptophan amino acid differed across taxa (red and blue arrows in Fig. 4B).

Percentage of similarities in amino acid sequence (Supplementary Table S3) revealed that the C-termini of *Pinus pinaster*, *Selaginella moellendorffii* and *Klebsormidium flaccidum* GADs were the most similar among all. An alignment of these three carboxy-terminal sequences revealed that the high conservation degree included a lysine residue at the carboxy-flank and a hydrophobic residue in the central region (Fig. 3C). In the lycophyte *Selaginella* (Sm), the hydrophobic residue is a tryptophan (W) in the well-conserved WKKF motive, which suggest the presence of a functional CaMBD in this GAD. On the other hand, in the C-terminus of the charophyte alga *Klebsormidium* (Kf) the hydrophobic residue in this position correspond to tyrosine (Y). Specific substitution of the essential tryptophan to tyrosine in the CaMBD of petunia GAD was shown to abolished the “in vitro” binding of bovine CaM (Arazi et al., 1995), which could suggest that the CaMBD of the charophyte GAD does not bind bovine CaM. However, several genes coding for CaM and GAD holoenzyme can be differentially modulated by different CaMs (Lee et al., 2000). This suggests that potential regulation of charophyte GAD by native CaMs cannot be completely ruled out. In fact, substitution of the central tryptophan to phenylalanine has been shown to allow partial binding of petunia GAD to bovine CaM (Arazi et al., 1995). Although specific binding experiments with different CaMs are needed to assess whether these GADs can be regulated by Ca^{2+} /CaM, the presented analysis indicates that the carboxy-terminal of a charophyte GAD is homologue to plant CaMBD, placing the origin of the primitive plant CaMBD of GAD early in plant evolution (470 mya).

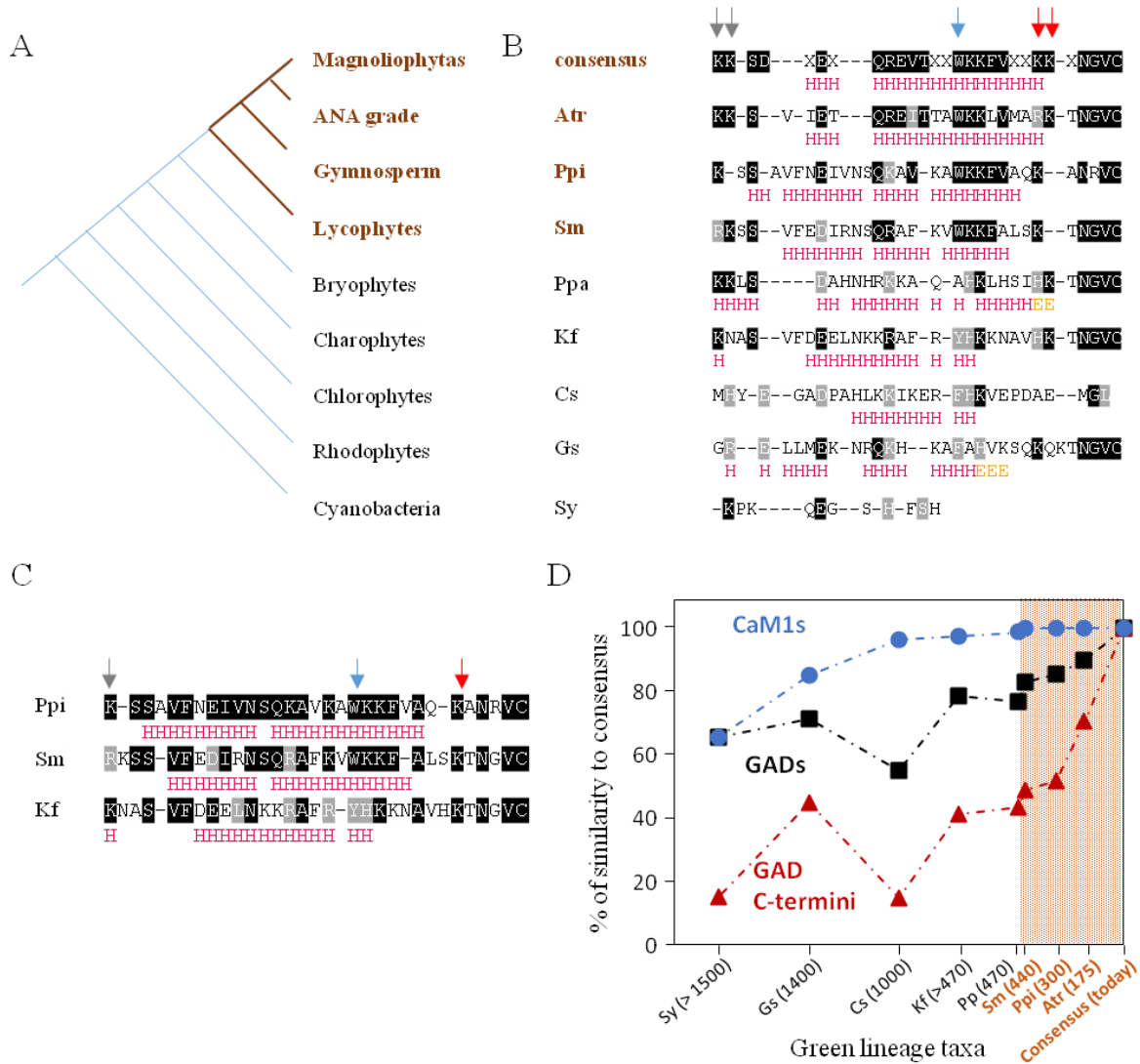


Figure 4. Potential CaMBD at C-termini in GADs across green lineage taxa. **A.** Phylogenetic relationships of green plant taxa. Branches in brown represent vascular plant lineage. **B.** Alignment of C-terminal end among GADs from the taxa in A (Atr, Amborella trichopoda; Ppi, Pinus pinaster; Sm, Selaginella moellendorffii; Ppa, Physcomitrella patens; Kf, Klebsormidium flaccidum; Cs, Coccomyxa subellipsoidea; Gs, Galdieria sulphuraria; Sy, Synechocystis). Accession numbers and additional information for the sequences are shown in Supplementary Table S1. The sequence on the top correspond to a consensus of 35 GADs across the principal taxa in the Magnoliophyta taxon (Supplementary Table S2). **C.** Alignment of the three most similar C-termini among the C-termini shown in B (similarity percentages among all the C-termini are shown in Supplementary Table S3). Grey and red arrows show left and right flanking lysines (K) respectively, and the blue arrow the central tryptophan (W) present in functional CaMBDs. Black and grey boxes in alignments represent identical and similar residues respectively when compared to the sequence on top of each alignment. “H” in red and “E” in yellow represent predicted α -helix and β -strand respectively. **D.** Percentages of similarity in soybean CaM1 and its orthologues, GADs and GAD C-termini versus the corresponding angiosperm consensus across green plant taxa (consensus sequences are shown in Supplementary table S4, Figure 4B, and Supplementary table S2 respectively). Green lineage taxa have been sorted in X-axe based on the putative diversification time (million years ago) of the taxon according to Pires and Dolan (2012). Taxa names and area in brown represent vascular plants.

Conservation degrees of both the GAD carboxy-terminus and CaM across green lineage taxa were analyzed and compared to that of GADs (Fig. 4D). Consensus sequence for CaM1 of soybean and its angiosperm orthologues (Supplementary Table S4) was compared with the orthologues in the different green lineage taxa (Fig. 4D). CaM1 and its orthologues were selected in the study as soybean CaM1 showed to highly activate petunia GAD when compared with other CaMs (Lee et al., 2000). Results showed that CaM1s have been highly conserved during evolution across green lineage taxa, presenting percentages of similarities higher than 96% for taxa with diversification times of 1000 million years ago (Cs in Fig. 4D), which match to the high conservation degree described for plant CaMs (Ranty et al., 2006). On the contrary, when GAD carboxy-termini of the green lineage taxa were compared with the angiosperm CaMBD consensus much lower similarity percentages were observed (Fig. 4D), and they were also lower than the corresponding similarity values for the entire GAD sequences, revealing a relatively low conservation degree of the carboxy end in GAD sequences. These results suggest a lack of coevolution at primary protein sequences between CaM1s and CaMBDs in GADs, and that evolution has rather been acting on certain residues at conserved positions in the GAD carboxy-terminus possibly to improve the enzyme activity regulation by CaM in higher plants.

The fact that the lycophyte *S. moellendorffii* is a member of the ancient vascular plants places the origin of the CaMBD in GADs at least in the carboniferous period (425 mya). Additionally, the charophyte *K. flaccidum* is a filamentous algae with primary factors for plant terrestrial adaptation such as production of plant hormones including ethylene and auxin (Hori et al., 2014), which are hormones with crucial roles in vascular differentiation (Sorce et al., 2013). The development of vascular tissues was critical for plant terrestrial colonization as an efficient water and mineral nutrient acquisition and transport from pre-soils was required to the adaptation to an emerged habitat with lower water availability (Lucas et al., 2013). Interestingly, recent studies have highlighted that plant calcium signaling was also shaped during land colonization (Edel and Kudla, 2014). Therefore, the production of the stress-metabolite GABA, and the regulation of GAD by Ca^{2+} /CaM, might be consider as part of the adaptation process to cope with the stress associated with the evolution of vascular structures during the colonization of Earth's terrestrial environment by plants. Moreover, GAD catalyzes a proton-consuming reaction allowing cells and tissues to balance pH, a critical issue during lignin deposition and cell death and also as a component in the adaptation to the

acidic pre-soils at the time of land colonization due to high atmospheric CO₂ concentrations (Willis and McElwain, 2002; Molina-Rueda et al., 2010).

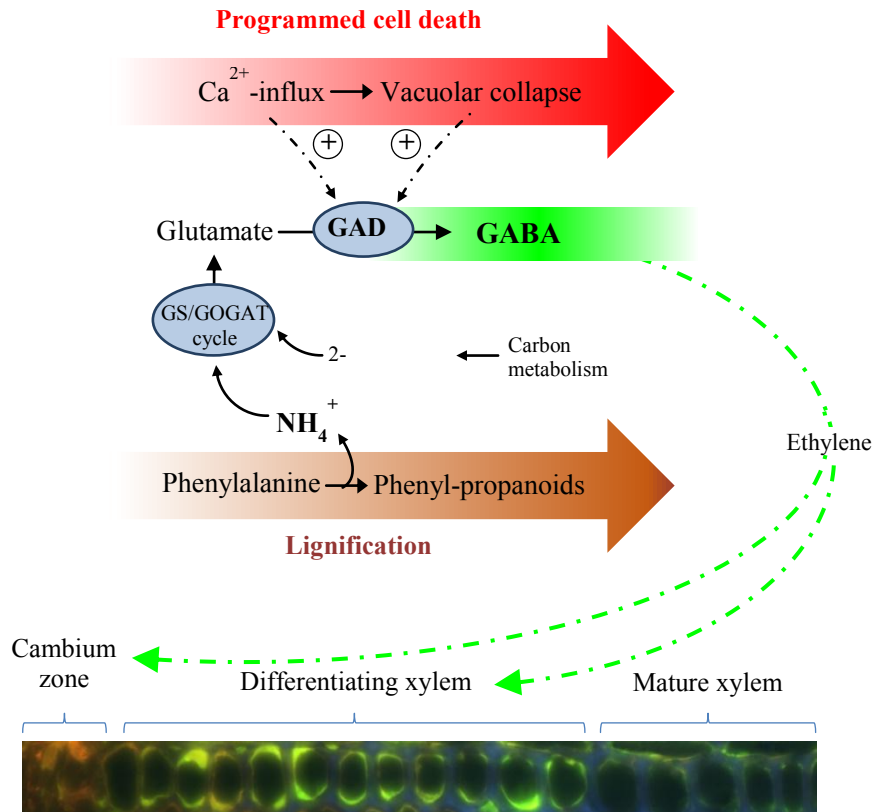


Figure 5. Model for GAD regulation and GABA production during programmed cell death in xylogenesis, and GABA immunolocalization in differentiating xylem cells. In differentiating tracheary cells, programmed cell death (PCD) occurs as part of xylogenesis. In PCD, a calcium flux triggers death, including vacuolar collapse causing cytosolic acidification. Both calcium and acid pH induce GAD activity, increasing GABA synthesis. GABA production through GAD is metabolically connected to ammonium assimilation and carbon metabolism by the GS/GOGAT cycle, which has a relevant role in re-assimilating the nitrogen released during lignification (Castro-Rodríguez et al., 2011). GABA has been referred to induced ethylene production in sunflower (Kathiresan et al., 1997) and to regulate the expression of genes (Lancien and Roberts, 2006; Shi et al., 2010) including cell wall related genes (Renault et al., 2011). Ethylene promotes cambium activity and xylem differentiation in poplar (Love et al., 2009). Regulation of GABA production by calcium and pH during programmed cell death in differentiating xylem cells and a dual role for GABA in nitrogen metabolism and signaling during xylogenesis in vascular plants is proposed.

Conclusions

Based on this work and on previous ones in a gymnosperm (Molina-Rueda et al., 2010, 2015b), GAD expression is shifted during xylem differentiation associated with the production of reaction wood. GABA is localized in the xylem region of pine seedlings (Molina-Rueda et al., 2015b) and poplar saplings (this work), and specifically in radial parenchyma cells and axial differentiating cells. The production of GABA may have a dual role as it may represent a N-reservoir to recover ammonia produced during lignin synthesis, and a signal derived from Ca^{2+} influx and acidification produced by vacuolar collapse during cell death of conducting xylem cells (Figure 5). The pattern of GAD expression in stem of poplar and pine plants (Molina-Rueda et al., 2010) was similar to the expression of *ACO* genes suggesting the existence of a cross-talk between GABA and ethylene in vascular development as already proposed for other tissues in herbaceous plant studies (Kathiresan et al., 1997; Shi et al., 2010). These features seem ancient in the green lineage as they appear in both angiosperms and gymnosperms. Homologous CaMBD in GAD sequences from higher plants are found in lycophytes and charophytes suggesting that regulation of GAD by Ca^{2+} /CaM was also shaped as well as the complex calcium signaling network during the concomitant evolution of xylem and land colonization by plants. In conclusion, GAD seems to have been an agent in the evolution of vascular land plants during the development of an efficient water transport system, possibly to cope with the stress during adaptation to acidic pre-soils and water scarcity in emerged lands.

Capítulo 3

Posibles papeles de los genes glutamato descarboxilasa de *Populus* en condiciones normales de crecimiento

Introducción

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es un aminoácido no proteínogénico presente tanto en organismos procariotas como eucariotas (Shelp y col., 1999). En la última década, diversos estudios han mostrado que el GABA puede participar en numerosos procesos fisiológicos. En animales, el GABA es el neurotransmisor inhibitor más importante del sistema nervioso central, por lo que alteraciones en los niveles normales de este aminoácido se han relacionado con enfermedades neurológicas tales como la epilepsia (Wong y col., 2003). En plantas, son varias las posibles funciones que le han sido asignadas pudiendo actuar como osmolito compatible, tamponador del pH citosólico, reservorio de nitrógeno, regulador del balance C/N (Bouché y Fromm, 2004) y secuestrador de especies reactivas de oxígeno (Liu y col., 2011). Aunque la síntesis del GABA puede ocurrir por varias vías, la actividad glutamato descarboxilasa (GAD, EC 4.1.1.15) está considerada como la principal fuente de GABA. La reacción de síntesis de GABA por la GAD se sitúa en una ruta conocida como GABA shunt. El GABA shunt es un baipás del ciclo de Krebs compuesto por tres reacciones enzimáticas. La primera reacción de la ruta está catalizada por la GAD; la segunda, por la GABA transaminasa (GABA-T), que cataliza la transaminación del GABA generando semialdehído succínico (SSA), y este SSA es sustrato de la tercera reacción, llevada a cabo por la semialdehído succínico deshidrogenasa (SSADH) generando succinato que finalmente entraría al ciclo de Krebs (Bown y Shelp, 1997, Capítulo 1, Fig.4).

La GAD está ampliamente representada en los seres vivos estando presente en animales, hongos, arqueas, bacterias y plantas (Sukhareva y Mamaeva, 2002). La GAD cataliza la reacción irreversible de α -descarboxilación del glutamato produciendo CO_2 y GABA mediante el consumo de protones. Es una enzima dependiente de piridoxal 5'-fostato (PLP), que actúa como cofactor. El dominio de unión de la GAD a su cofactor presenta un alto grado de conservación. La actividad GAD puede estar regulada por pH, presentando su máxima actividad a pH ácido (5.8; revisado por Kinnersley y Turano, 2000). En plantas, la actividad GAD también puede estar modulada por Ca^{+2} mediante su unión a calmodulina (CaM) debido a la presencia de un dominio de unión a calmodulina que se encuentra casi exclusivamente en GADs de plantas. Este dominio está menos conservado que el dominio de unión al cofactor y está localizado en el

extremo C-terminal, actuando como dominio autoinhibitorio en ausencia de interacción con Ca^{+2} /CaM (Baum y col., 1993; Arazi y col., 1995).

En animales, las GADs están codificadas por uno o dos genes, en cambio en plantas el número de genes *GAD* suele ser mayor y variable entre especies (Sukhareva y Mamaeva, 2002; Capítulo 2). La existencia de un número mayor de genes *GAD* en plantas y la diversidad de funciones que se le atribuyen al GABA en plantas sugieren fenómenos de especialización génica. En los últimos años se han realizado estudios de expresión con el fin de conocer y asignar posibles papeles a las GADs, siendo mayoritarios los estudios realizados en plantas herbáceas, como *Petunia* (Baum y col., 1993), *Arabidopsis* (Turano y Fang, 1998; Miyashita y Good, 2008), tomate (Gallego y col., 1995), arroz (Akama y col., 2001), tabaco (Yevtushenko y col., 2003), judía (Johnson y col., 1997), y escasos en leñosas, habiendo datos disponibles en manzano (Trobacher y col., 2013), naranjo (Liu y col., 2014) y pino marítimo (Molina-Rueda y col., 2010). La familia génica *GAD* mejor caracterizada hasta ahora es la de *Arabidopsis* (*AtGAD*), la cual consta de cinco genes, que presentan patrones de expresión diferentes (Miyashita y Good, 2008). Aunque hasta la fecha se desconocen sus funciones, se ha sugerido que *AtGAD1* puede participar en la asimilación primaria de nitrógeno en la raíz manteniendo el balance C/N (Bouché y col., 2004), y *AtGAD4* podría participar en respuesta a estreses medioambientales, ya que presenta niveles bajos de mensajeros en plantas en condiciones normales de crecimiento y altos en respuesta a diferentes tipos de estrés como hipoxia (Miyashita y Good, 2008), sal (Renault y col., 2010), sequía (Urano y col., 2009) y frío (Kaplan y col., 2007).

En los últimos años también se ha descrito que la *GAD* y el GABA podrían estar implicados en el desarrollo vascular de las plantas. Molina-Rueda y col. (2010) observaron que la expresión *GAD* se correlaciona con el desarrollo vascular del hipocótilo en plántulas de pino. Además, la localización de GABA revela su presencia en tejidos vasculares en esta gimnosperma, especialmente en xilema en diferenciación (Molina-Rueda y col., 2015). La posible existencia de genes *GAD* implicados en desarrollo vascular hace interesante la caracterización de la familia génica *GAD* en árboles. En la última década, *Populus* ha surgido como especie modelo de leñosas (Taylor, 2002; Jansson y Douglas, 2007) ya que a diferencia de otros árboles se dispone de la secuencia completa de su genoma (Tuskan y col., 2006), posee un crecimiento rápido, es fácil de transformar y de regenerar *in vitro* (Leplé y col., 1992), además de ser una especie de gran interés en la industria maderera y para la generación de

CAPITULO 3

biocombustibles (Jansson y Douglas, 2007). Además, existen pruebas de la existencia de transcritos de *GAD* específicamente asociados al xilema (Sjödin y col., 2009).

En este capítulo se describe la caracterización *in silico* y el análisis de expresión de los genes *GADs* del híbrido *Populus tremula x P. alba* (*PtaGADs*), así como la localización del GABA en diferentes órganos, con el objetivo de determinar las posibles funciones de las *GADs* en *Populus*.

Resultados

Genes que codifican la glutamato descarboxilasa en *Populus trichocarpa*

La caracterización *in silico* de la familia génica *GAD* se realizó utilizando el genoma de *Populus trichocarpa*, debido a que es el único genoma secuenciado de este género (Tuskan y col., 2006). Se identificaron seis genes en el genoma cuya anotación funcional corresponde a *GAD*, y se les denominaron *PtGAD* seguido de un número del 1 al 6. Los genes *PtGAD* presentan una estructura formada por siete exones y seis intrones, excepto *PtGAD1*, el cual posee un intrón menos ya que los exones cuatro y cinco se encuentran fusionados (Fig. 1). El tamaño de los exones está conservado menos el del último exón que contiene el posible dominio de unión a calmodulina (CaMBD). En cambio, el tamaño de los intrones es más variable, cabe destacar por ejemplo la mayor longitud del segundo intrón de *PtGAD2*, *PtGAD3* y *PtGAD4* que en el resto de genes *PtGAD*.

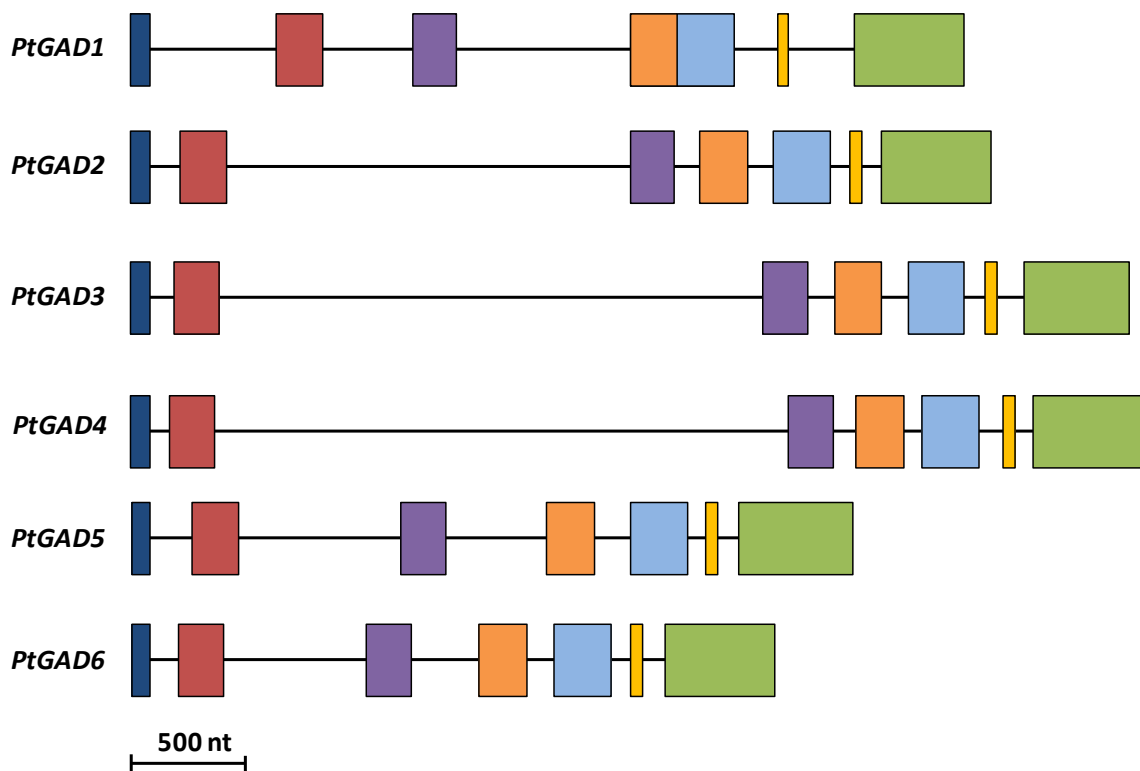


Figura 1. Estructuras génicas de los genes *GAD* de *Populus trichocarpa*. Los exones se simbolizan con un rectángulo y los intrones, con una línea. Las regiones homólogas aparecen con el mismo color.

CAPITULO 3

Los genes *PtGAD* codifican proteínas de un tamaño similar (Tabla 1). PtGAD2 es la que presenta menor masa molecular (56,3 kDa), y PtGAD5 la mayor (57,4 kDa). Los pIs de las PtGADs se sitúan dentro del rango de pH ácido, siendo PtGAD5 la que posee el pI más alto (6,08), y PtGAD4, el más bajo (5,50).

Tabla 1. Predicción de características moleculares de las GADs en *Populus trichocarpa*. Se indica el identificador del transcrito de las secuencias analizadas pertenecientes a la última versión del genoma de *P. trichocarpa* (v3.0) en Phytozome v10.3. El punto isoeléctrico y la masa molecular fueron estimados en ExPASy (<http://web.expasy.org>)

Nombre	Nombre del locus (v 3.0)	Tamaño proteína (nº residuos)	Masa molecular (kDa)	pI
PtGAD 1	<i>Potri.012G039000.2</i>	501	56,6	5,84
PtGAD 2	<i>Potri.004G075200</i>	498	56,3	5,79
PtGAD 3	<i>Potri.T059200</i>	496	56,4	5,61
PtGAD 4	<i>Potri.004G075300</i>	500	56,5	5,50
PtGAD 5	<i>Potri.008G141100</i>	508	57,4	6,08
PtGAD 6	<i>Potri.010G100500</i>	503	57,0	5,96

Para estudiar si las PtGADs poseen los dominios característicos y los residuos claves de las GADs de plantas, se realizó un alineamiento de las seis PtGADs con una secuencia consenso de GADs de angiospermas (Fig. 2). En el alineamiento se observó que la mayor parte de la secuencia estaba muy conservada, correspondiendo esta zona al dominio de unión al PLP, el cual alberga al centro activo de la enzima. Además, el dominio de unión al PLP de las PtGADs mostró todos los residuos necesarios para el posicionamiento del cofactor en el centro activo de la proteína descritos previamente (Sukareva y Mamaeva, 2002). En cambio, la región C-terminal del alineamiento posee un menor grado de conservación entre las secuencias GADs, excepto en un grupo de residuos que se conservan en todas ellas y que se encuentran en el posible dominio de unión a calmodulina (CaMBD). Dentro de este dominio, el triptófano y las lisinas que se han descrito como esenciales en CaMBDs funcionales están presentes en las seis PtGADs.

CAPITULO 3

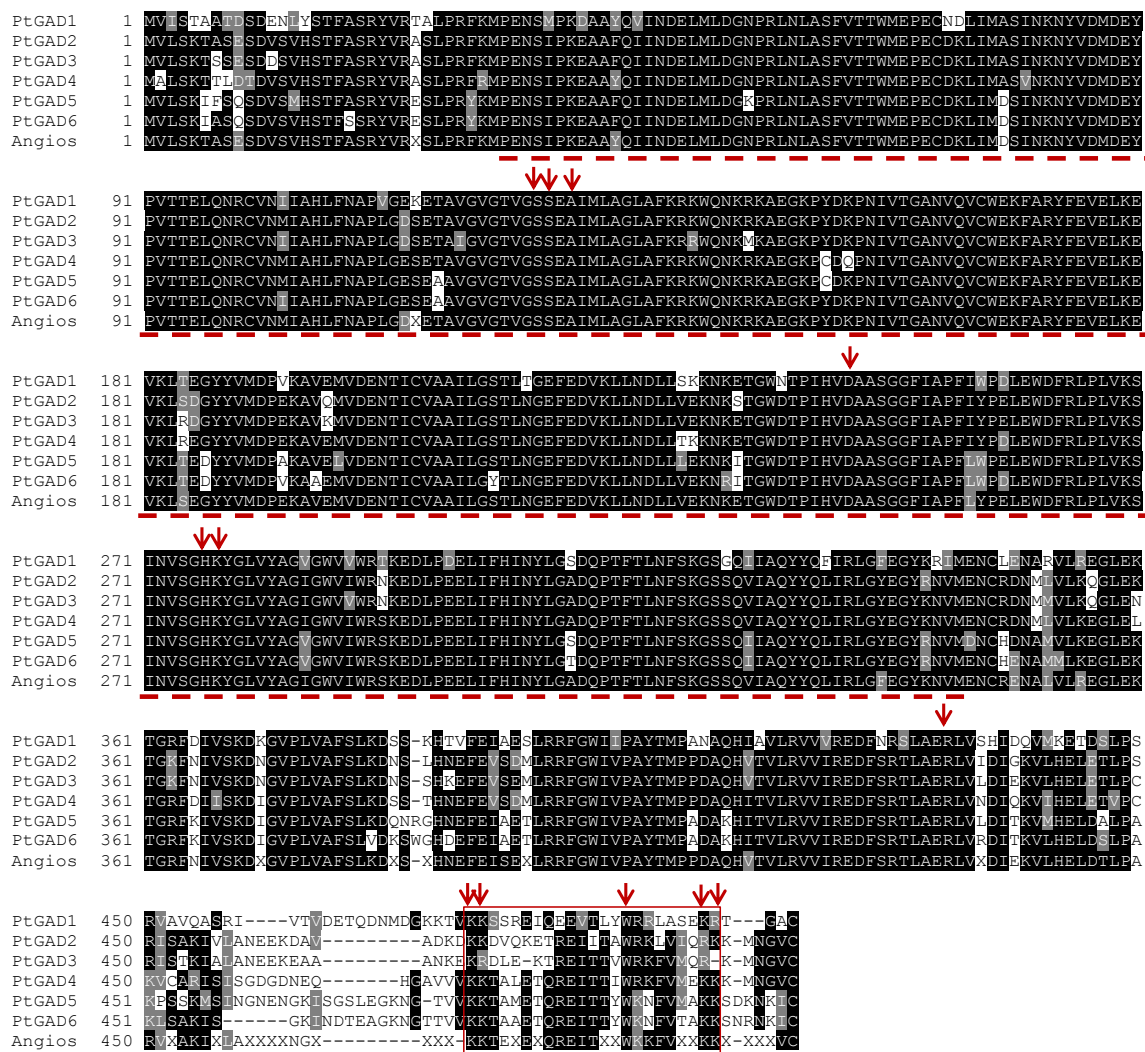


Figura 2. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las seis PtGADs y una secuencia consenso de GADs de angiospermas. La secuencia consenso de angiospermas está basada en el alineamiento de 35 secuencias de GADs pertenecientes a los grupos principales de las angiospermas (Capítulo 2). El alineamiento se realizó con Clustal omega y la asignación de cajas, con Boxshade v3.23. Los residuos marcados con negro simbolizan identidad con el consenso, y las grises similitud. Con línea discontinua se marca el dominio de unión a PLP y con un rectángulo el dominio de unión a CaM (CaMBD). Los residuos que están implicados en la catálisis o en la unión a calmodulina se señalan con una flecha. Los residuos implicados en la catálisis fueron descritos por Sukhareva y Mamaeva (2002) y son los siguientes: la secuencia SSSXA que contactan con el fosfato del PLP; el aspartato (D), la histidina (H) y la lisina (K), que se unen al grupo aldehído del PLP, forman un puente salino con el nitrógeno del anillo de pirimidina del PLP; y el residuo arginina localizado en la secuencia ERL posiblemente involucrado en la unión del sustrato. En el CaMBD están señaladas las lisinas situadas a ambos lados del dominio y el triptófano descritos como esenciales para la unión de CaM (Baum y col., 1993; Arazi y col., 1995).

El estudio filogenético de la familia PtGAD se realizó mediante la generación de un árbol basado en el alineamiento de sus secuencias aminoacídicas (Fig. 3). Las PtGADs se localizaron en tres grupos, situándose en unos de los grupos PtGAD1 a

mayor distancia del resto de PtGADs reflejando un mayor número de cambios acumulados. En otro grupo se situaron PtGAD5 y PtGAD6 pudiendo ser el resultado de una duplicación. Por último, en otro grupo se encontraron PtGAD2, PtGAD3 y PtGAD4, sugiriendo dos eventos de duplicación.

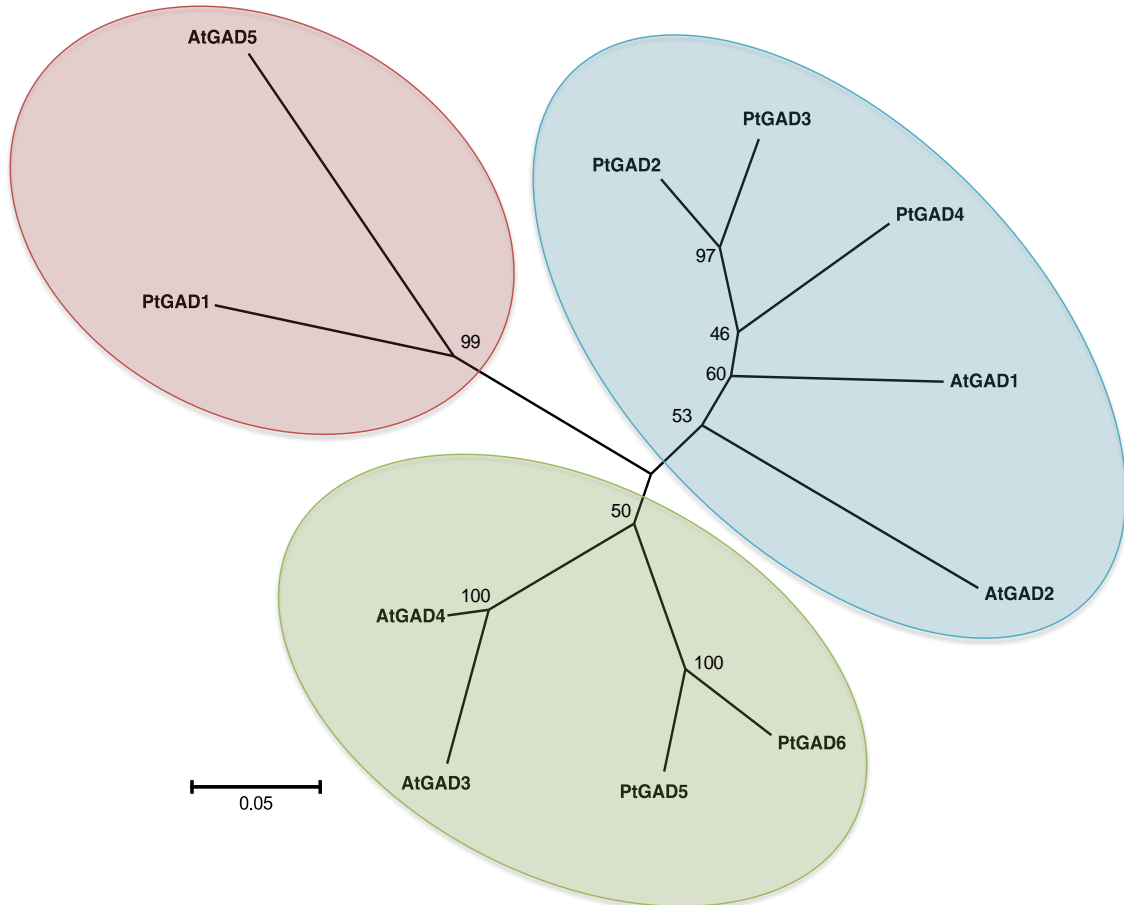


Figura 3. Árbol filogenético basado en el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las PtGADs y AtGADs. Para generar el árbol se utilizó el análisis de reconstrucción de filogenia mediante el método estadístico de Maximum Likelihood (Mega v6.06). Los valores bootstraps se muestran en porcentajes.

Para la búsqueda de posibles ortólogos se han incluido en el estudio las secuencias aminoacídicas de las GADs de *A. thaliana* (AtGADs) (Fig. 3). La relación más robusta entre GADs de estas dos especies corresponde a PtGAD1 y AtGAD5 (99%) sugiriendo que podrían ser ortólogos. PtGAD5 y PtGAD6 se localizaron en el mismo grupo que AtGAD3 y AtGAD4, con un valor bootstrap del 50%. Tanto AtGAD1 como AtGAD2 se sitúan en el mismo grupo que PtGAD2, PtGAD3 y PtGAD4, siendo AtGAD1 la más cercana a estas PtGADs revelando un posible origen común.

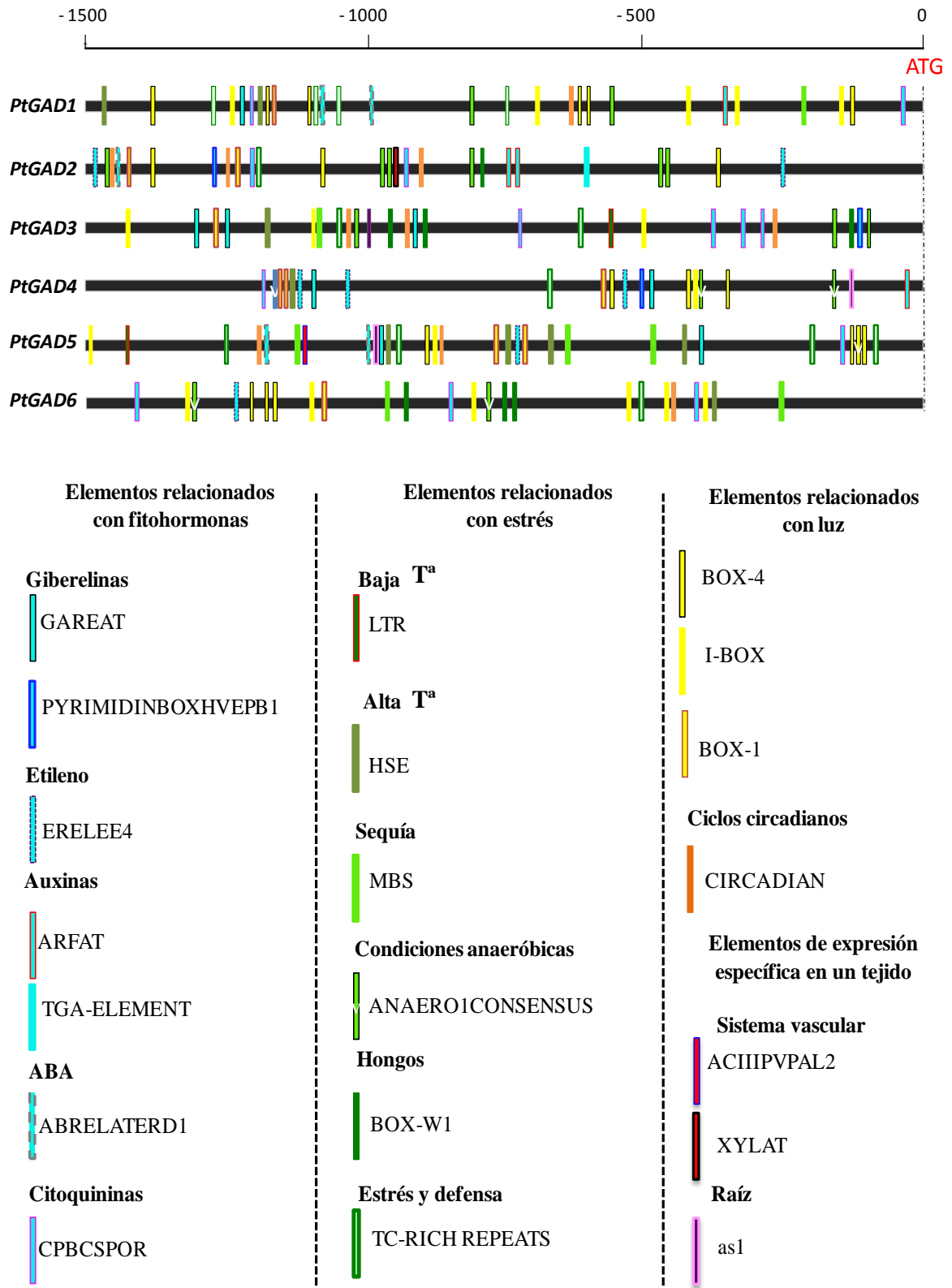


Figura 4. Representación de los posibles elementos *cis* de las secuencias promotoras de los genes *PtGAD*. Las cajas con tonalidad azul representan los elementos relacionados con la respuesta a fitohormonas, en verde los elementos relacionados con estrés abiótico y biótico, en amarillo los elementos de respuesta a luz y en rosa los elementos de expresión en un órgano específico de la planta. Para el análisis se tuvo en cuenta las 1500 pb corriente arriba desde el codón ATG de inicio de la traducción.

CAPITULO 3

En las secuencias promotoras de los genes *PtGAD* se identificaron varios elementos reguladores que responden a fitohormonas como las giberelinas (GAREAT), etileno (ERELEE4), ABA (ABRELATERD1), citoquininas (CPBCSPOR) o auxinas (ARFAT) (Fig. 4 y Tabla 2). En la figura 4 se representó el patrón de distribución de estos elementos en las secuencias promotoras de los genes *PtGADs*. Aunque algunas de las cajas coinciden en posición entre las secuencias, en general, el patrón de disposición y abundancia de elementos *cis* es diferente en cada promotor (Fig. 4).

Tabla 2. Número de elementos *cis*, en base a la predicción realizada previamente, que responden a fitohormonas, diferentes tipos de estrés abiótico y biótico, luz y tejido-específicos en las secuencias promotoras de los genes *PtGADs*. Se muestra una escala de color según la mediana, así los *PtGADs* con un número de elementos *cis* mayor a la mediana para esa categoría se muestran en colores rosa-rojo, siendo rojo el número más alto. La probabilidad de que aparezca una vez cada elemento de regulación en la región promotora (1500 pb) varía entre 0,061 y 0,360, salvo en los elementos indicados con (*), que pueden aparecer por azar 1.46 veces en la región promotora (1500 pb).

		<i>PtGAD1</i>	<i>PtGAD2</i>	<i>PtGAD3</i>	<i>PtGAD4</i>	<i>PtGAD5</i>	<i>PtGAD6</i>
Fitohormonas	Giberelinas (GAREAT)	1	-	3	2	2	-
	Giberelinas (PYRIMIDINEBOXHVEPB1)	-	1	1	1	-	-
	Citoquininas (CPBCSPOR)	2	2	5	1	1	3
	Auxinas (TGA-ELEMENT)	-	1	-	-	-	-
	Etileno (ERE)	-	2	-	3	1	1
	Auxinas (ARFAT)	1	2	-	1	-	-
	Elemento ABRE-ABA (ABRELATERD1) *	3	1	-	-	2	-
	TOTAL	7	9	9	8	6	4
Estrés biótico y abiótico	Frío (LTR)	-	-	1	-	1	-
	Calor (HSE)	2	-	1	1	4	1
	Sequía (MBS)	-	-	1	-	3	2
	Anaerobiosis (ANAERO1CONSENSUS)	2	6	3	3	-	2
	Hongos (BOX-W1)		1	3	-	-	3
	Defensa y estrés (TC-RICH REPEATS)	4	1	2	1	4	1
	TOTAL	8	8	11	5	12	9
Luz	CIRCADIAN	1	3	3	-	2	1
	I-BOX	5	-	3	1	2	6
	BOX 4	6	3	-	3	4	3
	BOX1	1	2	1	3	2	1
	TOTAL	13	8	7	7	10	11
Otros	ACIIPVPAL2	-	-	-	-	1	-
	XYLAT	-	1	-	-	-	-
	as1*	-	-	-	1	1	-

PtGAD2 y *PtGAD3* fueron los genes que presentaron un mayor número de posibles elementos *cis* que responden a fitohormonas (Tabla 2). Además, se identificaron varias cajas relacionadas con la respuesta a diferentes estímulos externos, como frío (LTR), calor (HSE), sequía (MBS) ó elementos que pueden responder a patógenos (BOX-W). *PtGAD5* presentó el mayor número de elementos *cis* relacionados con estrés, aunque fue *PtGAD3* el que en su promotor posee cajas de respuesta a todos los tipos de estrés abióticos y bióticos presentes en este estudio. Por otro lado, se han detectado diversos elementos reguladores relacionados con la respuesta a luz. Uno de estos elementos está involucrado en la regulación por ciclos circadianos (CIRCADIAN), y todas las *PtGADs*, excepto *PtGAD4*, presentaron este elemento en su región promotora. *PtGAD1* fue el que posee más elementos *cis* implicados en la respuesta a luz. Por último, se han detectado algunas secuencias reguladoras que son responsables de la expresión en un tejido específico de la planta. Un ejemplo de estas secuencias son los elementos *cis* tipo AC, que son motivos de ADN ricos en nucleótidos de adenosina y citosina, implicados en la regulación de la expresión de genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de lignina en el xilema (Patzlaff y col., 2003). Tanto en *PtGAD2* como en *PtGAD5* se detectaron posibles elementos tipo AC (XYLAT y ACIIIPAL2 respectivamente) que podrían implicar la expresión de estos genes en el xilema.

Expresión relativa de los genes que codifican para PtGADs y localización de GABA en diferentes tejidos de plantas de *P. tremula* x *P. alba*

La caracterización molecular de la familia GAD se llevó a cabo en el híbrido *P. tremula* x *P. alba* debido a que es un genotipo de rápido crecimiento y muy susceptible a la transformación mediada por *Agrobacterium* (Leplé y col., 1992) que se ha empleado en números estudios previos por su capacidad de regeneración en cultivo “in vitro”.

Para obtener la expresión global de los genes que codifican GAD en *P. tremula* x *P. alba* (*PtaGAD*), se diseñaron unos cebadores en la región central de las secuencias, zona más conservada entre los genes, codificantes de los seis genes GAD. Estos cebadores amplificarían los mensajeros de todos los genes *PtaGAD* obteniéndose así la expresión global GAD en las muestras analizadas (Fig. 5). Los resultados obtenidos mostraron que la expresión global de los *PtaGADs* es diferente en las muestras analizadas. La máxima expresión se observó en peciolos y tallo, obteniéndose en el tallo

mayor expresión en xilema que en corteza. Por el contrario, la menor expresión GAD se encontró en hojas.

La expresión de cada uno de los genes *PtaGAD* en las diferentes muestras se obtuvo mediante qPCR utilizando cebadores específicos para cada gen.

Expresión de los genes *PtaGAD* y localización de GABA en tallo y peciolo.

La expresión relativa de los diferentes genes *PtaGAD* se midió en dos regiones del tallo. El tallo se dividió en apical (región del tallo situada entre los nudos 4 y 10) y basal (región entre los nudos 10 y 14). Además, de una parte más basal del tallo (entre los nudos 14 y 20) se analizaron dos regiones por separado, por un lado la corteza y por otro lado el resto (xilema + médula). Se detectaron mensajeros de los genes *PtaGAD1*, *PtaGAD2* y *PtaGAD3* en tallo, no habiéndose encontrado niveles detectables de transcritos de los genes *PtaGAD4*, *PtaGAD5* y *PtaGAD6* en este órgano. El *PtaGAD2* fue el que presentó mayores niveles de transcritos en tallo (Fig. 6), no habiéndose encontrado diferencias significativas de niveles de mensajeros del gen *PtaGAD2* entre la parte apical y basal. La expresión de *PtaGAD1*, *PtaGAD2* y *PtaGAD3* fue superior en xilema que en corteza.

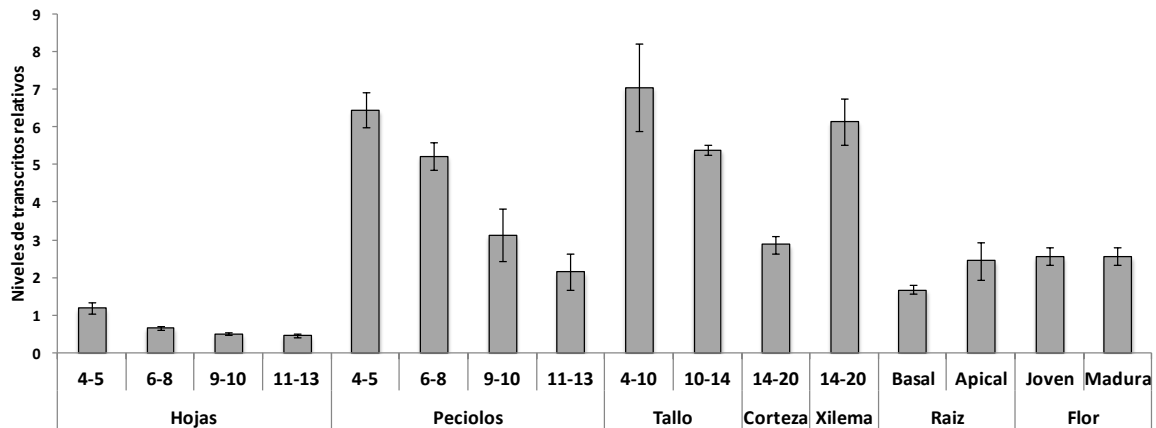


Figura 5. Perfil de la expresión global de los genes *PtaGAD* en las diferentes regiones de *P. tremula* x *P. alba*. Se muestran los niveles globales relativos de transcritos en hojas (posición 4-5, 6-8, 9-10 y 11-13), de peciolo de estas hojas, tallo (del nudo 4 al 10 y del 10 al 14), corteza y xilema (tallo del 14 al 20), raíz basal (región más lignificada de la raíz) y apical (parte más joven de la raíz), y flor femenina no fecundada y fecundada en estadio de fruto. Las barras muestran el error estándar de tres muestras biológicas.

Por otro lado, se midió los niveles de mensajeros de los genes *PtaGAD* en peciolo en diferentes fases de desarrollo (peciolo de las hojas 4 y 5, de la 6 a la 8, 9 y 10, y de la 11 a la 13) (Fig. 7). *PtaGAD2* varió sus niveles de transcritos según el

estadio de desarrollo del peciolo, presentando altos niveles en peciolo jóvenes (peciolo de las hojas 4 y 5) y cada vez menores para peciolo de estadios de desarrollo más avanzados. *PtaGAD1* mostró un patrón de expresión similar al de *PtaGAD2* en peciolo pero menos acentuado. Por el contrario, los niveles *PtaGAD3* no se vieron afectados por el desarrollo del órgano. Del resto de genes *PtaGAD* no se detectaron transcritos en peciolo.

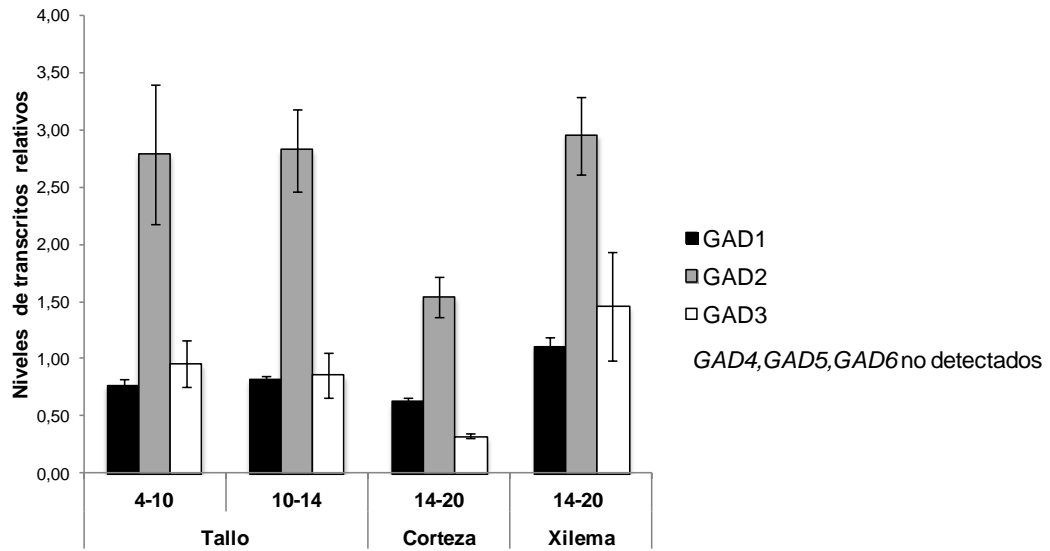


Figura 6. Perfil de expresión de los genes *PtaGADs* en tallo apical y basal, en xilema y corteza de *P. tremula x P. alba*. Se muestra el error estándar de tres muestras biológicas.

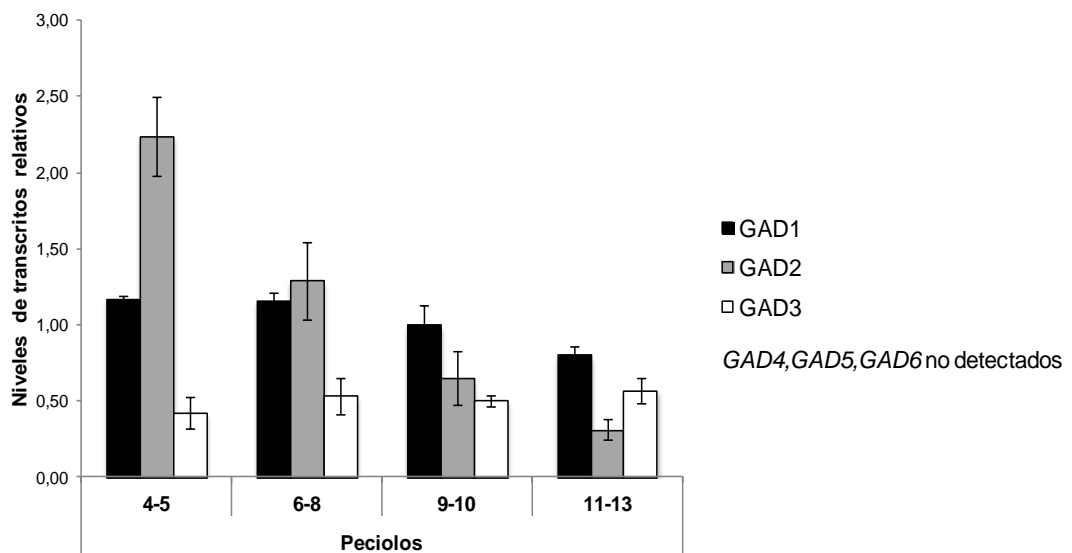


Figura 7. Perfil de expresión de los genes *PtGAD* en peciolo de *P. tremula x P. alba*. Se muestra el error estándar de tres muestras biológicas.

Con el objetivo de conocer en qué tejidos se encuentra el producto de la reacción catalizada por la GAD, se realizaron inmunolocalizaciones de GABA en cortes transversales de la región apical del tallo (entrenudo 7-8) y de peciolos (de la hoja 4 y 6). Mediante la tinción general con azul de toluidina se observó que los cortes presentaban una estructura íntegra. Los cortes de tallo revelaron un cambium vascular secundario continuo, con un xilema de grosor irregular como consecuencia del desarrollo en cordones del crecimiento primario. También se puede observar el floema y abundantes fibras floemáticas dispuestas en islotes (Fig. 8A). Durante el proceso de inmunolocalización se realizaron en paralelo, y en cortes consecutivos, controles (ausencia de anticuerpo primario), en los que se observó únicamente autofluorescencia típica de la pared secundaria de las células muertas procedentes de las fibras floemáticas y de los vasos lignificados del xilema (Fig. 8B). En cortes transversales de tallo la señal de GABA predominó en el cilindro vascular, observándose una mayor intensidad en el parénquima radial y en las células en diferenciación del xilema y floema (Fig. 8C), obteniendo además señal en las células sub-epidérmicas y en las células de la médula.

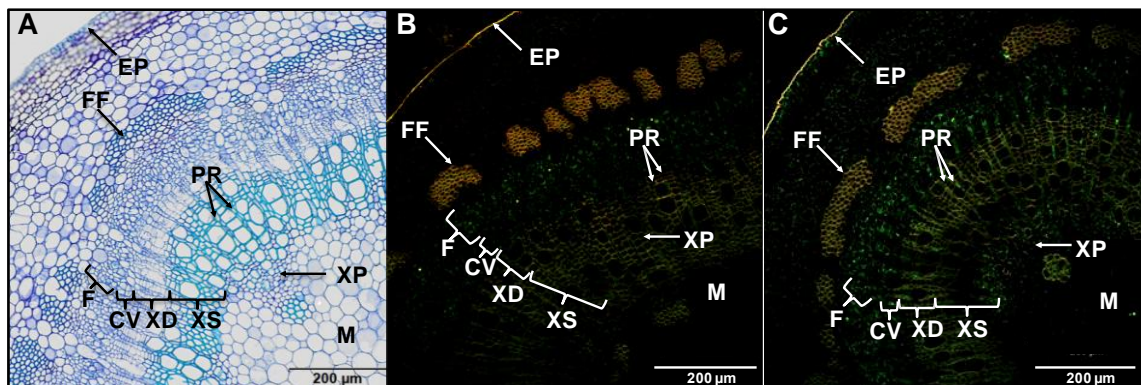


Figura 8. Inmunolocalizaciones de GABA en tallo apical de *P. tremula x P. alba*. A) Tinción con azul de toluidina del corte transversal de tallo. B) Control sin anticuerpo primario. C) Localización de GABA. EP, epidermis; FF, fibras floemáticas; PR, parénquima radial; F, floema; XD, xilema en diferenciación; XP, xilema primario; XS, xilema secundario; CV, cambium vascular; M, médula.

La tinción con azul de toluidina permitió observar un anillo vascular en el centro y dos semi-anillos adaxiales en los peciolos de hojas jóvenes. Los dos semi-anillos empiezan a dividirse para formar nuevos cilindros vasculares a medida que el peciolo se va desarrollando (Fig. 9A y D). El tejido vascular está rodeado por un tejido de sostén denominado colénquima que permite que el peciolo soporte el peso de la hoja. Los controles negativos de las inmunolocalizaciones de GABA en cortes de peciolos

mostraron una autofluorescencia típica de los vasos lignificados del xilema (Fig. 9B y E). La señal de GABA en peciolo jóvenes se localizó principalmente en el sistema vascular, aunque también se detectó en epidermis, sub-epidermis y colénquima (Fig. 9B y C). En cambio, en los peciolo más desarrollados la señal queda restringida al sistema vascular, detectándose en parénquima radial, floema, cambium vascular y xilema en diferenciación (Fig. 9C y F). En general, la señal de GABA fue de mayor intensidad en peciolo jóvenes que en peciolo más maduros.

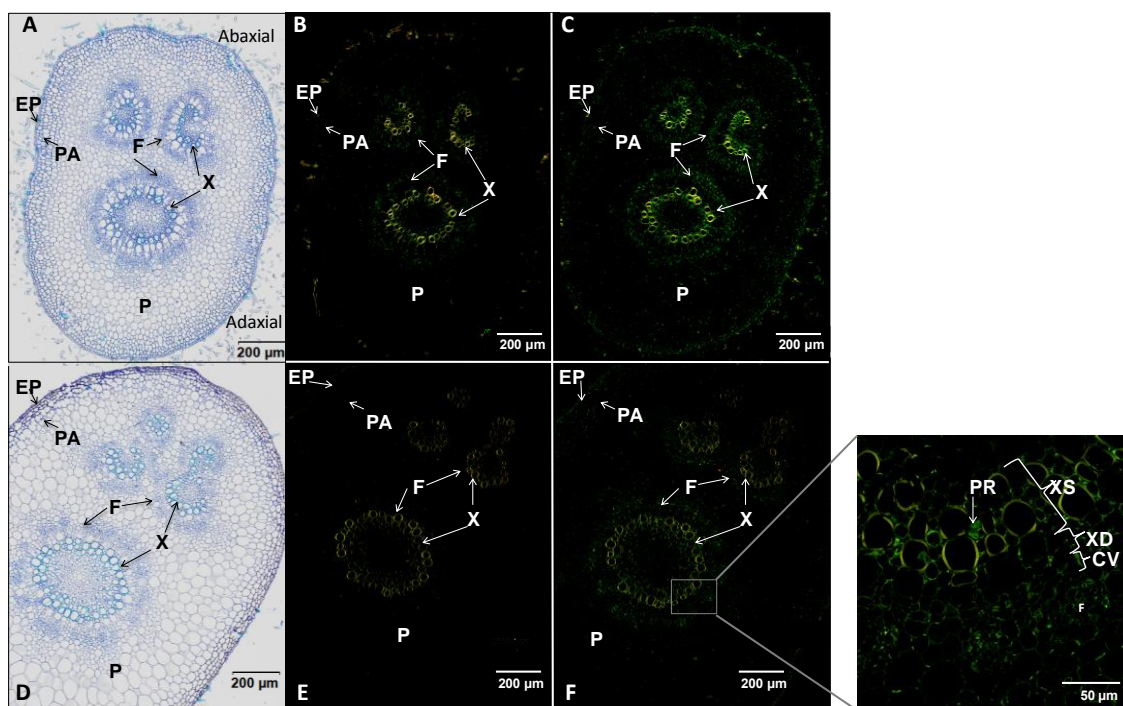


Figura 9. Inmunolocalizaciones de GABA en peciolo de *P. tremula x P. alba*. En la mitad superior se sitúan los cortes de peciolo joven (localizado en el nudo 4) teñidos con azul de toluidina (A), control sin anticuerpo primario (B) e inmunolocalización de GABA (C). En la mitad inferior los cortes corresponden a peciolo más maduro (localizado en el nudo 6) sometidos a los mismos tratamientos que hoja joven (D, azul de toluidina; E, control sin anticuerpo primario; F, señal de GABA, además se muestra un detalle de la señal de GABA en el cilindro vascular de mayor tamaño). PA, parénquima angular; EP, epidermis; F, floema; X, xilema; P, parénquima.

Expresión de los genes *PtaGAD* y localización de GABA en hojas

En hojas se realizaron dos experimentos diferentes para analizar la expresión de los genes *PtaGADs*. Por un lado, se utilizaron plantas crecidas en invernadero bajo luz natural y se tomaron cuatro grupos de hojas en diferentes fases de desarrollo para observar si los niveles de mensajeros de estos genes varían en función del desarrollo de la hoja (Fig. 10A). Por otro lado, se utilizaron plantas crecidas en condiciones

controladas de luz y se recolectaron hojas de posiciones 4-6 y 8-9, separando zonas de la hoja enriquecida en mesófilo y zonas ricas en nervadura para verificar si la expresión de los genes *PtaGADs* se asocia a tejidos específicos de la hoja (Fig. 10B). De los seis genes sólo se detectaron mensajeros de los genes *PtaGAD1*, *PtaGAD2* y *PtaGAD3* en hojas (Fig. 10A). *PtaGAD1* fue el que mostró mayores niveles de transcritos en hojas jóvenes, y *PtaGAD2* los niveles más bajos. *PtaGAD1* y *PtaGAD2* presentaron mayores niveles de mensajeros en hojas jóvenes que en maduras. *PtaGAD3* obtuvo altos niveles de mensajeros en hojas de plantas crecidas en luz natural, en cambio sus niveles disminuyeron en hojas expuestas a luz artificial. *PtaGAD1* y *PtaGAD3* no mostraron diferencias de transcritos relativos entre el mesófilo y la nervadura, por el contrario *PtaGAD2* se detectó mayoritariamente en nervadura (Fig. 10B).

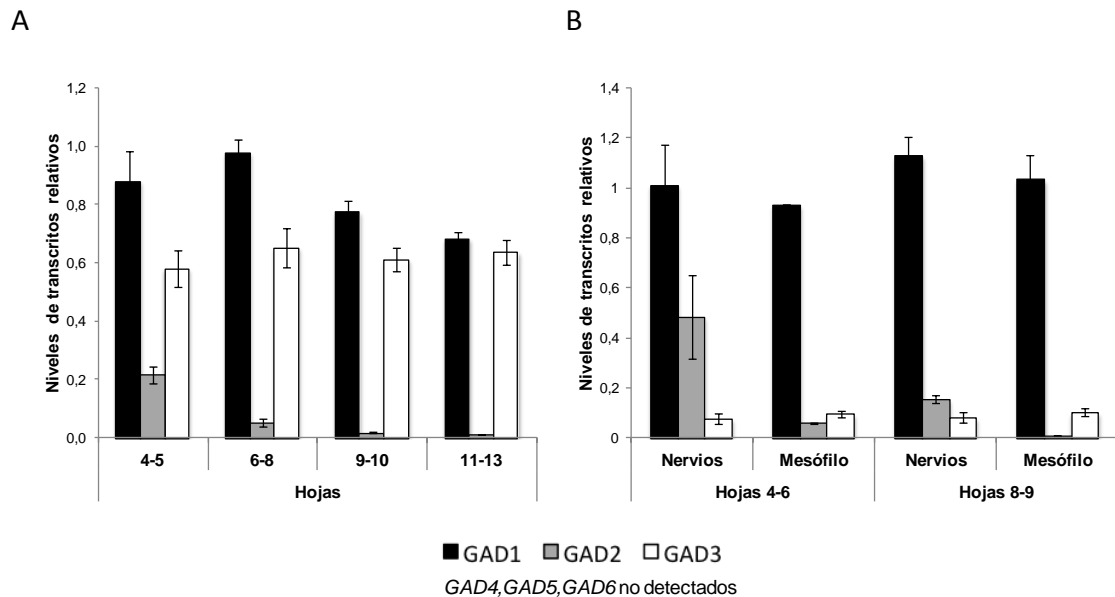


Figura 10. Expresión relativa de los genes *PtaGAD* en hojas de *P. tremula x P. alba*. En las graficas se muestra los niveles de mensajeros relativos en: A) en hojas en diferentes posiciones. B) nervios y mesófilo de hojas en posiciones 4-6 y 8-9. Se muestra el error estándar de tres muestras biológicas.

Los cortes histológicos de hojas muestran la sección transversal del nervio principal formado por un haz vascular rodeado de colénquima (Fig. 11A y D). A su vez, se observa el mesófilo de la hoja compuesto por dos tipos de parénquimas: el parénquima en empalizada o clorofílico en el haz de la hoja, y el parénquima esponjoso en la parte del envés de la hoja. Se realizó la inmunolocalización de GABA en cortes de hoja y se detectó una señal generalizada por todo el corte, aunque de mayor intensidad

alrededor del haz vascular (Fig. 11C y F). El mesófilo mostró una alta fluorescencia asociada a las clorofilas presentes en los numerosos cloroplastos (Fig. 11B y E) siendo difícil observar el marcaje de GABA, aunque se detectó mayor intensidad de señal en las células del parénquima en empalizada y en el parénquima esponjoso respecto a los controles. Tal y como se observó en peciolo, la señal de GABA fue más baja en hojas maduras respecto a hojas jóvenes.

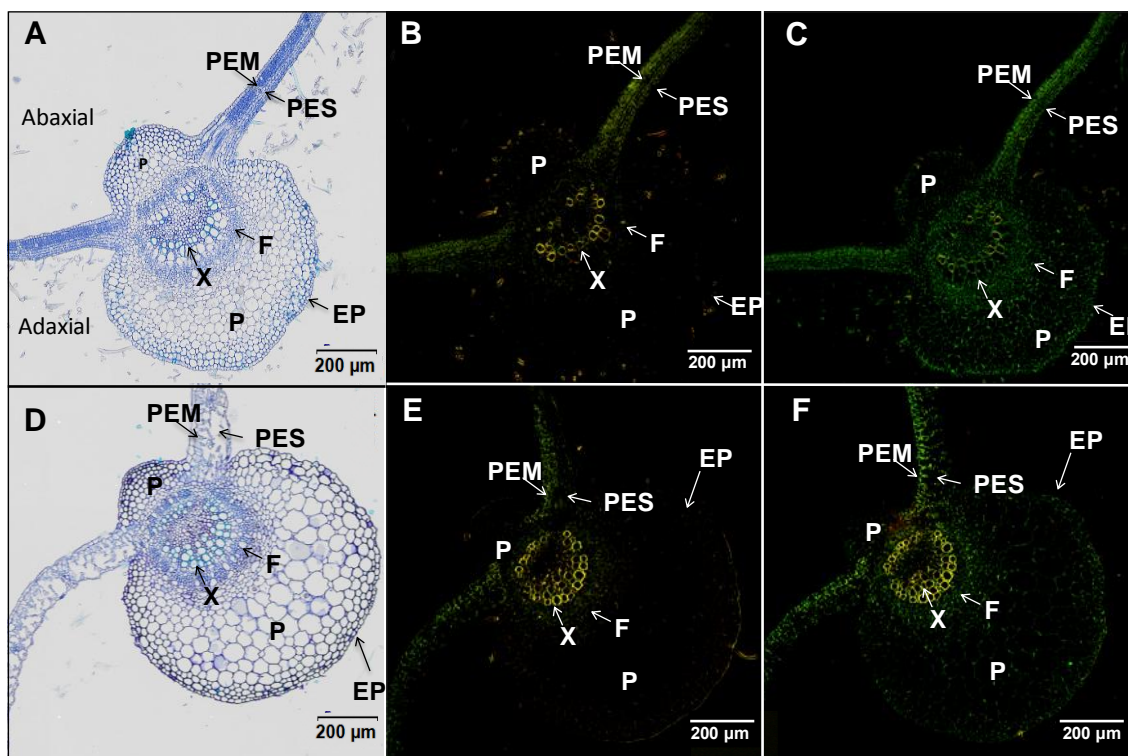


Figura 11. Inmunolocalizaciones de GABA en hojas de *P. tremula* x *P. alba*. En la mitad superior se sitúan los cortes de hoja joven (posición 4) teñidos con azul de toluidina (A), control sin anticuerpo primario (B) e inmunolocalización de GABA (C). En la mitad inferior los cortes corresponden a hojas maduras sometidos a los mismos tratamientos que hoja joven (D, azul de toluidina; E, control sin anticuerpo primario; F, señal de GABA).

Expresión de los genes *PtaGAD* y localización de GABA en raíz

En raíz se tomaron dos regiones: una región apical, enriquecida en raíces poco lignificadas, y otra basal que corresponde a raíces de mayor grosor y lignificadas (Fig. 12). Los resultados de expresión mostraron que el gen *PtaGAD3* fue el que presentó mayores niveles de mensajeros en raíces, mientras *PtaGAD1* y *PtaGAD2* mostraron niveles más bajos. Aunque no se detectaron transcritos del gen *PtaGAD5* en los órganos aéreos, sí que se detectaron en raíces, aunque mostrando una gran variación de una réplica biológica a otra.

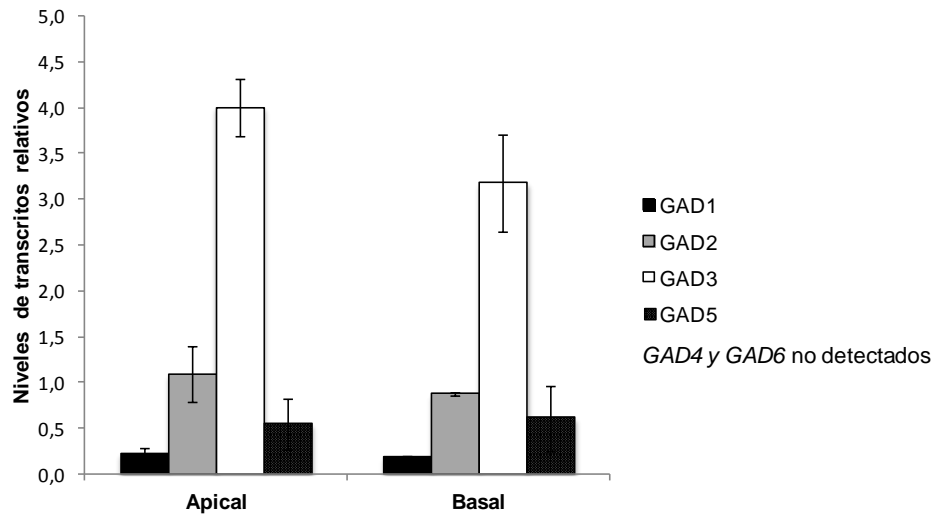


Figura 12. Expresión relativa de los *PtGADs* en la parte basal y apical de raíces de plantas *P. tremula x P. alba*. Se muestra el error estándar de tres muestras biológicas.

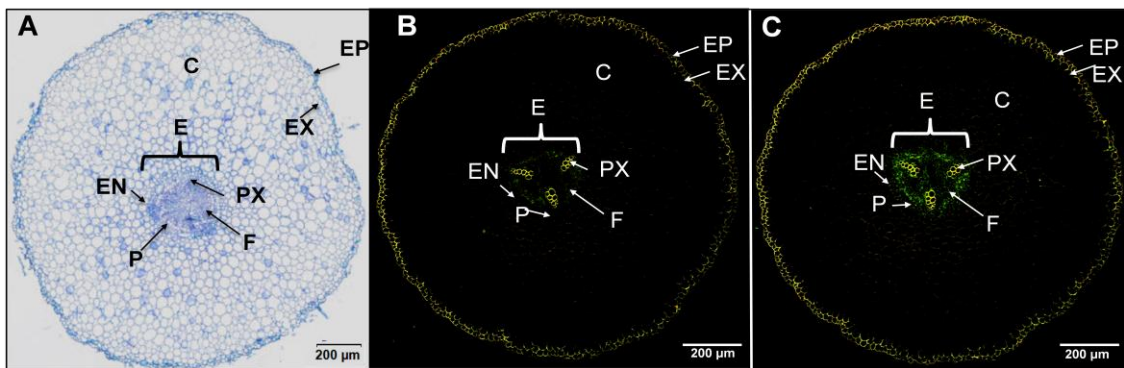


Figura 13. Immunolocalizaciones de GABA en raíz de *P. tremula x P. alba*. A) Tinción con azul de toluidina de un corte transversal B) Control sin anticuerpo primario C) Localización de GABA. EP, epidermis; EX, exodermis; PX, protoxilema; F, floema; EN, endodermis; P, periciclo; C, córtex; E, estela.

La tinción con azul de toluidina de cortes transversales de raíces apicales revela la presencia de la epidermis, la estela que contiene el sistema vascular, y el córtex que se sitúa entre la epidermis y la estela. (Fig. 13A). En el control sin anticuerpo de las inmunolocalizaciones de GABA se observó una señal leve en la estela debido a la autofluorescencia de las paredes celulares de los vasos (Fig. 13B). La señal de GABA se concentró exclusivamente en la estela, y dentro de ésta, alrededor del protoxilema lignificado y en diferenciación, y en el floema (Fig. 13C).

Expresión de los genes *PtaGAD* en flores femeninas

El álamo es una especie dioica con pies masculinos y femeninos. En este trabajo sólo se disponía de pies femeninos de *P. tremula x P. alba*. Las flores femeninas se disponen en inflorescencias laterales colgantes de tipo amento. Se recolectaron flores en un estadio temprano después de la fecundación, y flores fecundadas que han formado el fruto y poseen las semillas con largos pelos algodonosos que pueden ser transportados por el viento. Los datos de expresión mostraron una expresión diferencial de los genes *PtaGADs* entre ambos estadios (Fig. 14). En general, todos los genes analizados aumentaron sus mensajeros en el estadio de flor joven frente al estadio de fruto, a excepción del gen *PtaGAD2* que el patrón de expresión fue inverso. También se detectaron transcritos de *PtaGAD5* en flores en ambos estadios, aunque al igual que ocurría en raíces, se observa una gran variación de una réplica biológica a otra.

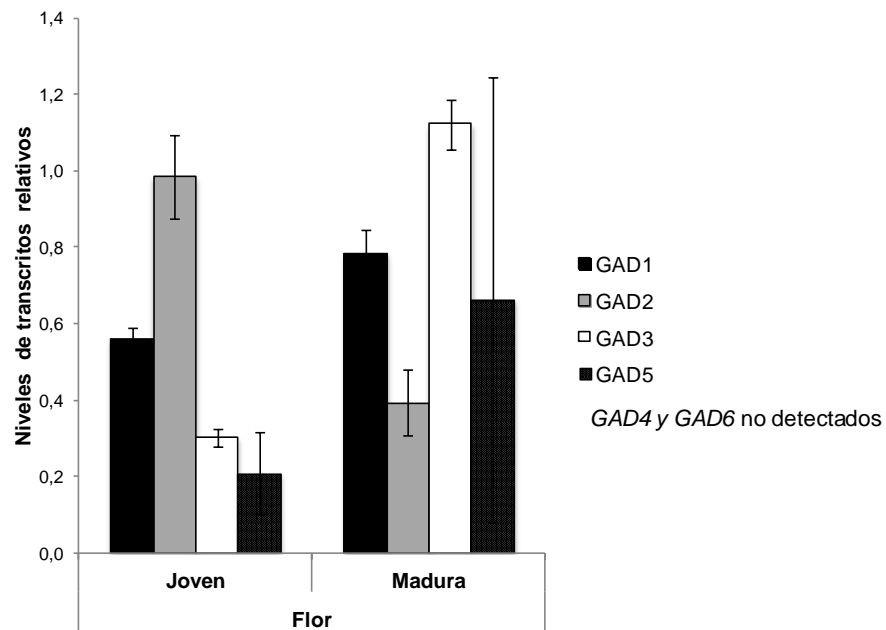


Figura 14. Expresión relativa de los *PtGADs* en diferentes estadios de flores femeninas de plantas *P. tremula x P. alba*. Se muestra el error estándar de tres muestras biológicas.

Relación entre la expresión de los genes *PtaGAD* y otros genes implicados en el metabolismo del GABA en *P. tremula x P. alba*

El estudio del patrón de expresión de genes de la misma o de otras rutas relacionadas con los genes *PtaGAD* puede ayudar a descifrar las posibles funciones que pueden desempeñar las proteínas codificadas por estos genes. Para ello, se midió los valores relativos de mensajeros de varios genes en los diferentes órganos del híbrido y

se representaron en un mapa de calor (Fig. 15). Los genes se agruparon en función de sus patrones de expresión. En un grupo se situaron los genes del GABA shunt junto con el gen *IDHc*, la permeasa de GABA (*GABP*) y *PtaGAD3*. Este grupo se caracterizó por mostrar una alta expresión en órganos en los que el tejido vascular es muy representativo como tallo y peciolo, aunque su máxima expresión se encontró en raíces, siendo mayor en raíz apical que basal, y la expresión más baja se asoció a hojas. Por otro lado, se agruparon los genes *PtaGAD1*, *PtaGAD2* y la expresión global de GAD (*GAD cons*), que también mostraron sus máximos niveles de mensajeros en peciolo y tallo, y mayor expresión en xilema que en corteza. Por último, los genes más alejados del resto fueron los glioxilato reductasas (*GLYRs*) con altos niveles de mensajeros en hojas y flores, siendo mínimos los niveles de mensajeros en órganos donde el tejido vascular es más abundante.

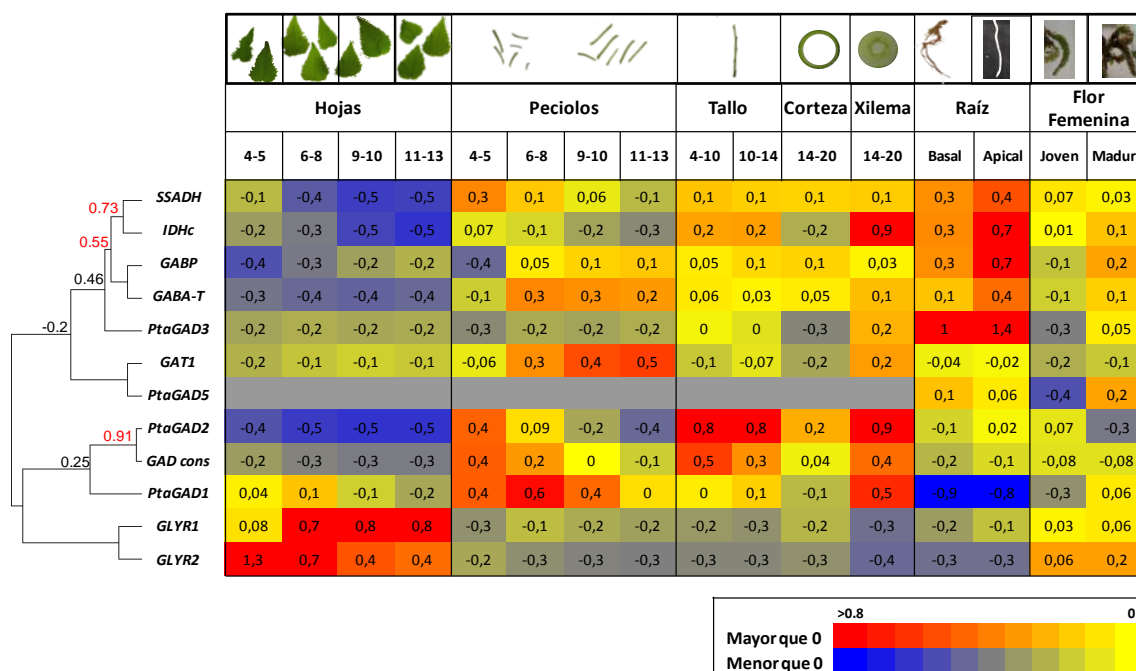


Figura 15. Mapa de calor de los perfiles de expresión de los genes *PtGADs* y los genes implicados en el metabolismo del GABA en las diferentes muestras del híbrido analizadas. En el mapa se representa el logaritmo en base dos del ratio entre el valor medio de expresión de tres replicas biológicas para un gen en ese tejido y el valor de expresión medio del gen en todos los tejidos. Los valores positivos (naranja-rojo) representan valores de mensajero superiores a la expresión media del gen en todas las muestras. Por el contrario, los valores negativos (gris-azul) para un gen representan valores de expresión inferiores a la media del gen en todas las muestras. En la parte superior del mapa de calor se sitúan las imágenes de las diferentes partes analizadas de la planta. El árbol (izquierda) refleja el grado de correlación entre los perfiles de transcritos de los genes en las muestras. El mapa de calor se realizó con el programa Heatmapper (www.bar.utoronto.ca). El árbol se realizó con el programa Cluster v3.0 y se visualizó con el programa Java Treeview.

Discusión

GADs en *Populus*

En plantas, la GAD presenta un alto grado de conservación, aunque el número de genes que codifican las GADs es variable (Capítulo 2; Sukhareva y Mamaeva, 2002). La caracterización de la familia génica GAD en plantas ha revelado la importancia de estos genes en diferentes procesos fisiológicos. Gran parte de los estudios basados en la caracterización de las GADs de plantas se han llevado a cabo en herbáceas, siendo muy escasos en leñosas. Este hecho ha limitado su estudio en procesos propios de plantas leñosas como el desarrollo vascular y la tolerancia a estreses abióticos o bióticos en tiempos prolongados. Trabajos recientes sugieren una posible participación de la GAD en desarrollo vascular (Molina-Rueda y col., 2010; Capítulo 2). Por ello, en este capítulo se realizó la caracterización *in silico* de la familia GAD en un árbol, *Populus*, debido a que se considera una especie modelo en leñosas (Taylor, 2002; Jansson y Douglas, 2007), y posee una gran importancia en el sector maderero y de la bioenergía. La caracterización de la familia génica *GAD* se realizó en *P. trichocarpa* ya que es el único genoma disponible de este género completamente secuenciado, y la caracterización molecular se llevo a cabo en el híbrido *P. tremula x P. alba*, debido a que es un genotipo de rápido crecimiento y muy susceptible a la transformación mediada por *Agrobacterium* (Leplé y col., 1992). Los resultados *in silico* revelaron la presencia de seis genes *GAD* en *P. trichocarpa*. Las proteínas codificadas por los *PtGADs* presentan todos los residuos claves para llevar a cabo la catálisis (Sukhareva y Mamaeva, 2002), y el triptófano y las lisinas flanqueantes en el posible domino de unión a CaM (CaMBD) requeridos para su regulación (Arazi et al., 1995), por lo que las seis *PtGADs* son aparentemente funcionales. Los análisis filogenéticos realizados en este trabajo revelan que la familia génica *PtGAD* es el resultado de varios eventos de duplicación intraespecífica sugiriendo fenómenos de especialización génica. A continuación, se discutirán los posibles papeles de cada uno de los genes *GAD* de *Populus* en base a la caracterización molecular realizada en este trabajo.

Posible papel de la *PtaGAD2* en el desarrollo vascular

Recientemente se han publicado varios indicios que muestran que la GAD puede estar implicada en el desarrollo vascular. Estos indicios son: 1) niveles de mensajeros GAD elevados en tejidos vasculares en *Populus* (Sjödin y col., 2009), 2) presencia de ESTs de GAD de pino en cambium vascular (Cantón y col., 2004) y 3) la expresión y

actividad GAD, así como los niveles de GABA, aumentan a lo largo del desarrollo vascular del hipocótilo en plántulas de pino (Molina-Rueda y col., 2010). En este trabajo se ha observado que la expresión global de la familia génica GAD del híbrido presenta los máximos niveles de transcritos en peciolos y tallo, órganos donde el tejido vascular es muy representativo, siendo en tallo mayor la expresión en xilema que en corteza. Este dato es resultado de que los tres *PtaGAD* se expresan mayoritariamente en xilema que en corteza. El gen *PtaGAD2* es el que muestra mayores niveles de transcritos en el xilema, lo que concuerda con la presencia de elementos reguladores en su promotor que pueden inducir la expresión del gen en tejidos específicos. Es el caso de los elementos tipo AC que están presentes en genes que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis de lignina en xilema (Ko y col., 2006). En el promotor del gen *PtaGAD2* se detectó un elemento AC (XYLAT) que podría ser el responsable de la fuerte expresión de este gen en xilema.

La xilogénesis es un proceso clave en el desarrollo vascular que está regulado por diferentes fitohormonas, entre ellas auxinas, citoquininas, giberelinas, ABA y etileno, que coordinan procesos de división de las células del cambium vascular y la diferenciación de estas células hacia elementos conductores del xilema (Soruce y col., 2013). El papel del etileno en la xilogénesis se ha descrito como estrictamente necesario para la diferenciación de las traqueidas (Pesquet y Tuominen, 2011). En trabajos previos se ha establecido una relación entre el etileno y el GABA, ya que el GABA puede inducir la expresión de genes de biosíntesis de etileno y de esta forma aumentar la producción de la hormona (Kathiresan y col., 1997), además de que el GABA puede afectar la elongación celular en una respuesta mediada por etileno (Kathiresan y col., 1998). La presencia de posibles elementos *cis* de respuesta a estas fitohormonas en las secuencias promotoras de los *PtGADs* apoya la posible participación de las GADs en xilogénesis. En *PtGAD2* se ha detectado un relativo gran número de elementos reguladores de respuesta a fitohormonas, pero además parece ser el único gen *PtGAD* que posee elementos de respuesta a cada una de las fitohormonas más importantes que participan en el proceso de diferenciación del xilema y el mayor número de posibles cajas que responden a etileno. Estos datos, junto con la alta expresión de *PtaGAD2* en muestras donde el tejido vascular es especialmente abundante y específicamente en xilema, sugieren que *PtaGAD2* está implicado en la xilogénesis.

La xilogénesis es un proceso de varias etapas y la mayor expresión del gen *PtaGAD2* en órganos (hoja y peciolos) jóvenes que en maduros, indica que *PtaGAD2*

participa en las fases iniciales del desarrollo vascular y/o en el establecimiento inicial de los haces vasculares.

Durante la xilogénesis se produce la acidificación del citosol como consecuencia de la ruptura vacuolar disparada por la entrada de Ca^{2+} (Groover y Jones, 1999). Ambos factores, la disminución del pH y el incremento de los niveles de Ca^{+2} , provocan el aumento de la actividad GAD (revisado por Kinnersley y Turano, 2000) favoreciendo la síntesis de GABA. El patrón de localización de GABA fue muy similar en órganos muy vascularizados observándose señal de GABA en xilema y parénquima radial, en consonancia con lo previamente publicado en pino (Molina-Rueda y col., 2015). El GABA podría participar durante la xilogénesis modulando la elongación celular en una respuesta mediada por etileno (Kathiresan y col., 1998) y/o mediante la alteración de la expresión de genes implicados en la modificación de la pared celular, las expansinas (Renault y col., 2011). Las expansinas son proteínas implicadas en la extensibilidad de la pared que permiten el desenredo de la matriz de polisacáridos y por lo tanto la elongación celular (Cosgrove, 2000; Lee y col., 2001). El transporte de sustancias en plantas leñosas está afectado por la elongación celular, impulsada por el equilibrio entre la presión de turgencia y la extensibilidad de la pared celular, factores que determinan la morfología y calibre de los vasos xilemáticos; por lo que el papel del GABA puede ser complejo al afectar de forma directa o indirecta estos procesos.

La producción de GABA en el xilema también podría estar vinculada al reciclaje de amonio asociado al proceso de lignificación que se produce en la fase de deposición de pared secundaria durante la xilogénesis. La lignina es uno de los componentes principales de la pared celular y su síntesis se lleva a cabo por la polimeración de monolignoles sintetizados a través de la ruta de los fenilpropanoides. La liberación del amonio ocurre en la síntesis de monolignoles a través de la desaminación de la fenilalanina por la fenilalanina amonio liasa (PAL). Este amonio puede ser reciclado por el ciclo GS/GOGAT (Gallardo y col., 2003; Castro-Rodríguez y col., 2011) produciendo glutamato (Capítulo 2). Una GS (GS1.3) de *Populus* que podría estar implicada en la asimilación de este amonio presenta un patrón de expresión similar al del gen *PtaGAD2*, con altos niveles de mensajeros en peciolos y tallo en plantas del mismo híbrido (Castro-Rodríguez y col., 2011). Así, el glutamato sintetizado por el reciclaje de amonio durante el proceso de xilogénesis podría metabolizarse por la *PtaGAD2* para producir GABA. El GABA producido podría transportarse a otras partes de la planta para ser metabolizado ó podría ser sustrato en la síntesis de nuevos

aminoácidos (por ejemplo, alanina), y de esta manera favorecer la retirada de glutamato para evitar su acumulación y la inhibición del ciclo GS/GOGAT por exceso de producto.

Posible participación de la PtaGAD1 en órganos fotosintéticos

Los estudios filogenéticos de la familia génica *PtGAD* mostraron que PtaGAD1 es la que ha acumulado más cambios durante la evolución, siendo la más diferente al resto de genes de la familia. Estos cambios se traducen en un mayor número de residuos de treonina y serina, aminoácidos susceptibles de ser fosforilados. De hecho se ha observado que GADs de *Arabidopsis*, arroz y *Medicago* pueden estar reguladas por fosforilación (Nakagami y col., 2010). *PtaGAD1* fue el que presentó mayores niveles de mensajeros en la hoja, no observándose diferencias de expresión entre el mesófilo y la nervadura, además de presentar un relativo alto número de elementos *cis* en su promotor que responden a luz. Estos resultados indican que PtaGAD1, además de estar implicada en el desarrollo vascular como se ha sugerido previamente en el capítulo 2, podría estar relacionada con funciones específicas del tejido fotosintético.

La información sobre las posibles funciones de las GADs en hojas es muy escasa. Recientemente se ha descrito que el GABA shunt en hojas es la principal fuente de succinato al ciclo de Krebs durante las horas de luz (Tcherkez y col., 2009; Sweetlove y col., 2010). Además, el GABA puede estar implicado en el metabolismo de las células guardas del estoma (Renault y col., 2011), ya que la acumulación de GABA podría alterar la expresión de genes que codifican acuaporinas causando un impacto en la homeostasis del agua y como consecuencia en la turgencia celular (Renault y col., 2011). Las GADs pueden también influir en el flujo iónico debido a que la mutación de *AtGAD2* de *Arabidopsis* provoca una disminución en los niveles de K^+ y como consecuencia la alteración en el cierre estomático (Worku, 2012).

Recientemente se ha descrito que el GABA puede conjugarse con otras moléculas por la ruta de shikimato y generar aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) que poseen alta fotoestabilidad. Al conjugado MAA-GABA se le ha asignado el papel de fotoprotector en diversos organismos tales como cianobacterias y algas (Nazifi y col., 2014). Aunque de momento no hay estudios que demuestren la presencia de este conjugado en plantas, no se puede descartar la existencia de estos conjugados o similares con un papel fotoprotector en plantas. La presencia de señal de GABA en

subepidermis de tejidos jóvenes y verdes (tallo y peciolo), en mesófilo y en la epidermis del haz de la hoja podría estar relacionada con esta posible función.

Por último, durante los procesos de respiración y fotosíntesis es inevitable la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Se ha descrito que el GABA presenta una mayor capacidad de eliminar ROS que otras moléculas como la prolina (Liu y col., 2011).

En definitiva, el GABA sintetizado en hojas por *PtaGAD1* podría estar implicado en varios procesos incluyendo la respiración celular o regulando canales iónicos y la turgencia celular implicada en la modulación del movimiento estomático. Además, no podría descartarse su posible papel actuando como fotoprotector frente a ROS y radiación ultravioleta.

La *PtaGAD3* puede estar implicada en la asimilación de N en la raíz

La raíz es el principal órgano encargado de la adquisición de agua y nutrientes, de dar soporte, y es el primero en sentir el estrés biótico y abiótico del suelo (Nibau y col., 2008). Al igual que el GABA puede alterar el desarrollo del tallo, también se ha visto que afecta al desarrollo normal de la raíz, ya que su acumulación en mutantes de *GABA-T* provoca la inhibición del crecimiento de la raíz primaria (Renault y col., 2011). Estudios de expresión de las familias *GAD* en arroz (Oh y col., 2005) y *Arabidopsis* (Bouché y col., 2004; Miyashita y Good, 2008) muestran que algunos genes *GADs* se expresan mayoritariamente en la raíz. Nuestros resultados revelaron que el gen *PtaGAD3* se expresa mayoritariamente en raíz, presentando un patrón de expresión similar al de los otros genes implicados en el GABA shunt (*GABA-T* y *SSADH*) y la permeasa *GABP*. Los estudios filogenéticos muestran que *PtaGAD3* podría ser parálogo de *PtaGAD2*, pudiendo las proteínas codificadas por ambos participar en el desarrollo vascular en órganos distintos (raíz y parte aérea respectivamente). A su vez, los genes *PtGAD2* y *PtGAD3* podrían ser ortólogos de la *AtGAD1*. Se ha demostrado que *AtGAD1* es la responsable de la producción de la mayor parte de GABA en raíces. Transgénicos de silenciamiento del gen *AtGAD1* presentaron menores niveles de GABA y la acumulación de glutamina, indicando que *AtGAD1* puede estar implicada en la asimilación de nitrógeno en la raíz y por tanto en el mantenimiento del balance de C: N en raíces (Bouché y col. 2004). Estos datos sugieren que en la raíz el GABA shunt es activo y está asociado a la asimilación de nitrógeno.

La localización de GABA en la estela de la raíz del híbrido, tal y como ocurría también en pino (Molina-Rueda y col., 2015), es compatible con la hipótesis de que la síntesis de GABA podría estar implicada en la asimilación primaria y secundaria de nitrógeno derivado de la lignificación en el órgano, y del transporte de este aminoácido a otras partes de la raíz.

PtaGAD5 y PtaGAD6 pueden tener un papel relacionado con estrés

El GABA se acumula rápidamente en los tejidos de la planta expuestos a diferentes tipos de estrés medioambientales y asociado a un aumento en los niveles de Ca^{+2} y/o una acidificación en el citosol (Kinnersley y Turano, 2000), que provoca un aumento de la actividad GAD (Ramputh and Bown, 1996). Son numerosos los trabajos en los que se han medido los mensajeros o la actividad de las GADs bajo diferentes condiciones de estrés (Miyashita y Good, 2008; Lee y col., 2010; Mae y col., 2011; Akcay y col., 2012; Hyun y col., 2013). En *Arabidopsis*, los genes *GADs* que se expresan en muy bajos niveles en condiciones normales aumentan su expresión en situaciones de estrés (Miyashita y Good, 2008). Un ejemplo es *AtGAD4*, la cual aumenta sus niveles de mensajeros hasta 19 veces más respecto al control frente a diferentes tipos de estreses abióticos (Miyashita y Good, 2008; Kaplan y col., 2007; Urano y col., 2009; Renault y col., 2010). El análisis de las secuencias promotoras de *PtGADs* muestra la presencia de posibles elementos reguladores en respuesta a diferentes tipos de estrés. Así, *a priori* cualquier *PtGAD* podría ser susceptible de ser regulada por estrés, aunque el promotor del gen *PtGAD5* es el que posee un mayor número de cajas que responden a diferentes estreses abióticos como frío, calor o sequía.

Los estudios filogenéticos sugieren un origen común por duplicación de *PtGAD5-PtGAD6* y de *AtGAD4-AtGAD3*. Tanto en *Populus* como en *Arabidopsis*, no se detectaron transcritos de uno de los genes duplicados en cada especie, *PtaGAD6* o *AtGAD3* en condiciones normales de crecimiento (Miyashita y Good, 2008). En cambio, aunque los niveles de mensajeros fueron bajos, sí se detectaron en algunos órganos de la planta mensajeros del gen *PtaGAD5*, de manera similar a lo publicado para el gen *AtGAD4* en *Arabidopsis* (Miyashita y Good, 2008). Estos datos postulan que *PtaGAD5* podría ser ortólogo de *AtGAD4* y aumentar sus niveles de mensajeros en respuesta a estreses abióticos en *Populus*. Con el fin de comprobar dicha hipótesis se analizará y discutirá la expresión de los *PtaGADs* frente a estreses abióticos en el capítulo 5.

Conclusiones

El patrón de expresión diferencial de los seis genes *PtaGADs* en *Populus* y su evolución sugieren que las proteínas codificadas por estos genes presentan funciones diferentes. PtaGAD1, PtaGAD2 y PtaGAD3 podrían participar en el desarrollo vascular, aunque también pueden ejercer otras funciones específicas de cada gen. PtaGAD2 podría ser especialmente relevante en la aparición del tejido vascular. PtaGAD1 podría estar implicada en la modulación del flujo iónico y protección frente a ROS en tejidos fotosintéticos. PtaGAD3 podría participar en la activación del GABA shunt asociado a la asimilación de nitrógeno en la raíz. Por último, PtaGAD5 y PtaGAD6 podrían estar involucradas en la respuesta a diferentes tipos de estrés abióticos y bióticos.

Capítulo 4

Efectos del glutamato y el GABA sobre el desarrollo y crecimiento de la raíz en *Populus* y expresión de los genes GAD

Introducción

La mayoría de las plantas terrestres poseen raíces subterráneas cuyas funciones principales son dar anclaje y soporte mecánico a la planta, actuar como interfaz entre la planta y factores bióticos y abióticos en el suelo, y captar agua y nutrientes (Smith y De Smet, 2012). Las plantas presentan la habilidad de cambiar su estructura radicular para aclimatarse a las condiciones cambiantes del suelo (Aiken and Smucker, 1996); por ejemplo, el desarrollo de la raíz se ve afectado por la disponibilidad de nutrientes en el sustrato (Ericsson, 1995). Uno de los casos más estudiados es el cambio morfológico de la raíz frente a una fuente de nitrógeno inorgánico. El nitrato (NO_3^-) regula el desarrollo de la raíz, habiéndose observado que un aumento localizado de NO_3^- provoca la proliferación de raíces laterales en *Arabidopsis* para colonizar la zona rica en nutrientes; aunque esta respuesta depende de la etapa de desarrollo en la que se encuentren estas raíces (Zhang y Forde, 1998; Zhang y Forde, 2000). No sólo el nitrógeno inorgánico puede alterar la arquitectura radicular, en los últimos años se ha demostrado que el tratamiento exógeno con aminoácidos también puede alterarla (Walch-Liu y col., 2006). La presencia de glutamato en zonas del suelo cercanas al ápice de la raíz provoca la inhibición del crecimiento de la raíz principal y estimula la ramificación en la región apical de la raíz en *Arabidopsis* (Walch-Liu y col., 2006). El ácido gamma-aminobutírico (GABA) también provoca cambios en la arquitectura de la raíz, aunque los cambios dependen de su concentración y de la especie en estudio, pudiendo ejercer un efecto positivo o negativo en el crecimiento radicular (Roberts, 2007; Mirabella y col., 2008). La acumulación de GABA intracelular, por alteraciones de la expresión de genes implicados en la biosíntesis o metabolismo del GABA, induce la inhibición de la elongación celular de órganos de la planta como el tallo y la raíz, considerándose al GABA como un factor involucrado en el control del crecimiento (Baum y col., 1996; Akama y Takaiwa, 2007; Renault y col., 2011). De esta manera, tanto el GABA como el glutamato provocan cambios en la estructura de la raíz siendo importante la modulación de la producción de ambos aminoácidos para el desarrollo correcto de la misma.

Alteraciones en la actividad GAD, enzima responsable de la biosíntesis de GABA por la descarboxilación de glutamato, implican cambios en los niveles de GABA y glutamato, y como consecuencia anomalías fenotípicas en las plantas (Baum y col., 1996; Akama y Takaiwa, 2007). La familia génica GAD en plantas está compuesta por

varios genes (Sukhareva y Mamaeva, 2002). Aunque se ha sugerido algún papel para las GADs en raíces, por ejemplo el de la asimilación de nitrógeno de la GAD1 de *Arabidopsis* (Bouché y col., 2004), la información disponible de los genes GADs que se expresan en raíces es muy escasa. En *Populus*, la familia génica GAD está formada por seis genes, los cuales presentan patrones de expresión diferentes a lo largo de la planta, sugiriendo que cada GAD puede realizar una función diferente (Capítulo 3). En el híbrido *Populus tremula x P. alba* cuatro de los seis genes *PtaGAD* se expresan en raíces (*PtaGAD1*, *PtaGAD2*, *PtaGAD3* y *PtaGAD5*), siendo *PtaGAD3* el que presenta mayores niveles de mensajeros en este órgano y una expresión mayoritaria en raíz de entre las diferentes regiones analizadas (Capítulo 3).

La raíz posee regiones bien diferenciadas tanto por estadio de desarrollo como por función, lo que *a priori* permite estudiar los posibles papeles de genes que presenten expresión diferencial durante el desarrollo y diferenciación del órgano. En la raíz, y desde la región apical, se pueden observar cinco regiones funcionales: 1) región meristemática, que posee el centro quiescente formado por un conjunto de células madre (Nawy y col., 2005), 2) región de elongación, que se caracteriza porque cesa la división celular y aumenta la elongación celular (Ishikawa and Evans, 1995), 3) región de absorción, encargada de la captación de agua y minerales por la presencia de pelos radiculares microscópicos, 4) región de raíces laterales, requerida para dar anclaje y para la captación de agua y nutrientes del suelo, y 5) región de transporte, que corresponde a una zona madura y lignificada de la raíz encargada del transporte de sustancias entre la raíz y la parte aérea de la planta.

Los objetivos de este capítulo son el estudio de la arquitectura radicular *P. tremula x P. alba* en respuesta a diferentes aminoácidos, y esclarecer los posibles papeles de los diferentes genes *PtaGAD* en éste órgano.

Resultados y discusión

El glutamato favorece el crecimiento de la raíz principal, y el GABA fomenta el desarrollo de raíces secundarias en plántulas *P. tremula x P. alba* *in vitro*.

El cultivo “*in vitro*” permite estudiar la alteración de la arquitectura radicular por la adición de sustancias al medio. En este trabajo, se ha estudiado como afecta la presencia de los aminoácidos glutamato, aspartato, GABA y alanina a la morfología de las raíces de plántulas del híbrido *P. tremula x P. alba*. La elección de estos aminoácidos se basó en que el glutamato y el GABA son sustrato y producto de la reacción catalizada por la GAD y se han descrito como aminoácidos que afectan al crecimiento de las raíces en herbáceas (Walch-Liu y col., 2006; Mirabella y col., 2008; Barbosa y col., 2010); y el aspartato y la alanina como controles del efecto del glutamato y el GABA respectivamente.

Los resultados mostraron que la arquitectura radicular de la planta varió dependiendo del aminoácido presente en el medio, observándose cambios tanto en el crecimiento de la raíz primaria como en el número y la longitud de las raíces laterales (Fig. 1A).

Las raíces del híbrido expuestas a 2 mM de glutamato indujeron el crecimiento de la raíz principal (Fig. 1A). En cambio, en otros estudios han observado que el glutamato tienen un efecto contrario en raíces de herbáceas, es decir un efecto inhibitorio (Filleur y col., 2005; Walch-Liu y col., 2006; Forde y Lea, 2007). No obstante, el efecto inhibitorio del glutamato puede verse anulado por la presencia de nitrato en el medio (Roberts, 2007; Walch-Liu y Forde, 2008). Así, la presencia de nitrato en el medio empleado en este trabajo apoya la ausencia de inhibición frente al aminoácido, pero no una inducción en el crecimiento de la raíz. Estos resultados indican que la adición de glutamato en el medio de cultivo ejerce un efecto positivo en el crecimiento de la raíz principal en plántulas del híbrido en presencia de nitrato, pudiendo ser un efecto de inducción propio de la especie.

El aspartato se eligió como control del efecto del glutamato en la raíz debido a que ambos pertenecen al grupo de los aminoácidos ácidos, por lo que poseen carga negativa a pH fisiológico. En el híbrido, el tratamiento exógeno con aspartato provocó la inhibición significativa del crecimiento de la raíz primaria después de 21 días de tratamiento (Fig. 1B). Análisis previos en nuestro laboratorio mostraron que la adición de una concentración superior de aspartato (10 mM) al medio provoca la inhibición total

de la generación de raíces tras 28 días de cultivo (datos no mostrados). En cambio, en *Arabidopsis* se ha descrito que las raíces no muestran cambios aparentes en su morfología radicular en presencia de aspartato a una concentración de 50 μ M (Walch-Liu y col., 2006). No obstante, en radículas de embriones de maíz se ha observado inhibición de la raíz principal tras el tratamiento con aminoácidos que se sintetizan a partir del aspartato, como la lisina y la treonina, a una concentración de 1mM (Green y Donovan, 1980). Así, el tratamiento exógeno en el híbrido con glutamato o aspartato provoca efectos distintos pudiéndose descartar que se deba a la naturaleza ácida del aminoácido. Además, la inhibición en el crecimiento de la raíz principal del híbrido provocada por el aspartato a las concentraciones ensayadas podría deberse al aumento de aminoácidos sintetizados como consecuencia de su metabolismo.

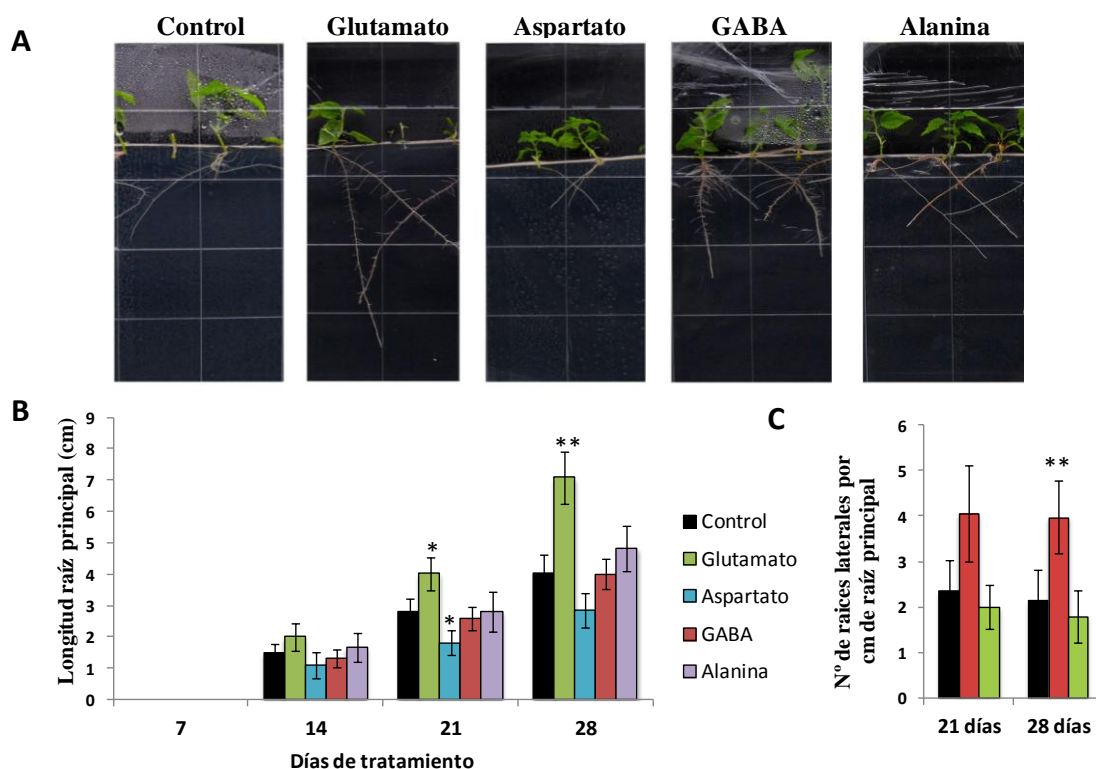


Figura 1. Efecto del tratamiento con aminoácidos en raíces de plántulas *P. tremula x P. alba* “in vitro”. A) Fenotipo de raíces crecidas en glutamato, aspartato, GABA y alanina a 2 mM. Las plántulas controles se crecieron en 1/2 del medio Murashige y Skoog (MS) a pH 5,8 siendo la concentración final de nitrato y amonio de 1 mM y 0,5 mM respectivamente B) En la gráfica se representan las medias y los errores estándar de las longitudes de las raíces principales de un mínimo de 10 plantas (n=10-15) en tratamientos control, glutamato, aspartato, GABA y alanina. C) Densidad de raíces laterales (número de raíces laterales por cm de raíz principal) en plantas en medio control y en medio con GABA y glutamato. Las barras muestran los errores estándar. Uno o dos asteriscos (*) marcan valores significativos (t-student) a niveles 0,1 y 0,05 respectivamente.

En el híbrido, la presencia de GABA (2 mM) en el medio no produjo ningún efecto significativo en la raíz principal respecto al control, pero sí indujo la proliferación de raíces laterales (Fig. 1). La elongación de la raíz principal tampoco se ve afectada en plantas de *Arabidopsis* a concentraciones de 1 mM o 5 mM de GABA, aunque a concentraciones superiores (de 10 a 100 mM) sí que se observa un incremento en la longitud de la raíz principal (Mirabella y col., 2008; Barbosa y col., 2010), pero no un aumento en la ramificación de las raíces en la herbácea (Barbosa y col., 2010). Así, *Arabidopsis* y el híbrido de *Populus* muestran una respuesta diferente al GABA reflejando la existencia de mecanismos reguladores propios de estas especies frente a estos aminoácidos. El aumento en raíces secundarias es un efecto que cabría esperar al añadir un exceso de nutrientes, efecto que se ha descrito en una gran variedad de especies de plantas (Robinson, 1994). Que el etileno sea uno de los principales reguladores del desarrollo de las raíces laterales (Clark y col., 1999; Schiefelbein, 2000) y que la aplicación exógena de GABA provoque la acumulación de etileno en girasoles debido a un aumento en la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de la hormona (Kathiresan y col., 1997), plantean la hipótesis de que el efecto causado en las raíces del híbrido por el tratamiento de GABA podría deberse a una respuesta mediada por etileno.

La alanina se utilizó como control del efecto del GABA debido a que puede ser sintetizada por transaminación de GABA a través de la GABA-T, y *a priori*, permitiría determinar si el efecto observado en la raíz se produce por el GABA de forma directa o bien por su metabolismo inmediato a alanina. El tratamiento con alanina no provocó cambios en el crecimiento en longitud de la raíz primaria, aunque sí en el desarrollo de las raíces secundarias (Fig. 1), como el GABA. No obstante, los efectos producidos por GABA y alanina son diferentes, ya que el GABA causó un aumento en la densidad de raíces laterales (Fig. 1C), y el tratamiento de alanina afectó al crecimiento en longitud de las mismas (Fig. 1A). Que ambos aminoácidos posean efectos diferentes en las raíces laterales sugiere que la respuesta a GABA no se debe a la acumulación de alanina derivada del catabolismo del GABA.

Distribución de la señal de GABA en las diferentes regiones de la raíz

El sistema radicular de las plantas consiste en una raíz principal, formada durante la embriogénesis, y raíces laterales, que se desarrollan con posterioridad. Para

estudiar la localización de GABA en este órgano, la raíz principal se dividió en cinco zonas (de la parte apical a la basal): meristemática (Z1), de elongación (Z2), de absorción (Z3), de ramificación (Z4) y de transporte (Z5) (Fig. 2A). Las imágenes de campo claro mostraron que las zonas previamente definidas presentaban diferente desarrollo vascular. Z1 es la menos desarrollada, con un sistema vascular incipiente típico de zonas meristemáticas. En Z2 empiezan a formarse los primeros núcleos vasculares, que en Z3 continúan desarrollándose, encontrándose fusionados en Z4. Finalmente, en la región más basal (Z5) se observa un desarrollo vascular secundario (Fig. 2A). En paralelo a la inmunolocalización de GABA se realizaron controles sin anticuerpo primario que mostraron una autofluorescencia típica asociada a los vasos lignificados en los diferentes cortes (Fig. 2B). La señal de GABA en los diferentes cortes de la raíz fue más intensa en las zonas jóvenes (Z1, Z2 y Z3) que en zonas maduras (Z4 y Z5) (Fig. 2C) estando presente en la estela y ausente en el resto (córtez y epidermis), como se ha observado previamente en plántulas de pino (Molina-Rueda y col., 2015). Estos resultados sugieren que el GABA puede jugar un papel importante en el establecimiento del sistema vascular en el órgano debido a que se localiza en regiones dónde empiezan a aparecer los primeros vasos vasculares y zonas con una sistema vascular poco desarrollado en forma de haces vasculares.

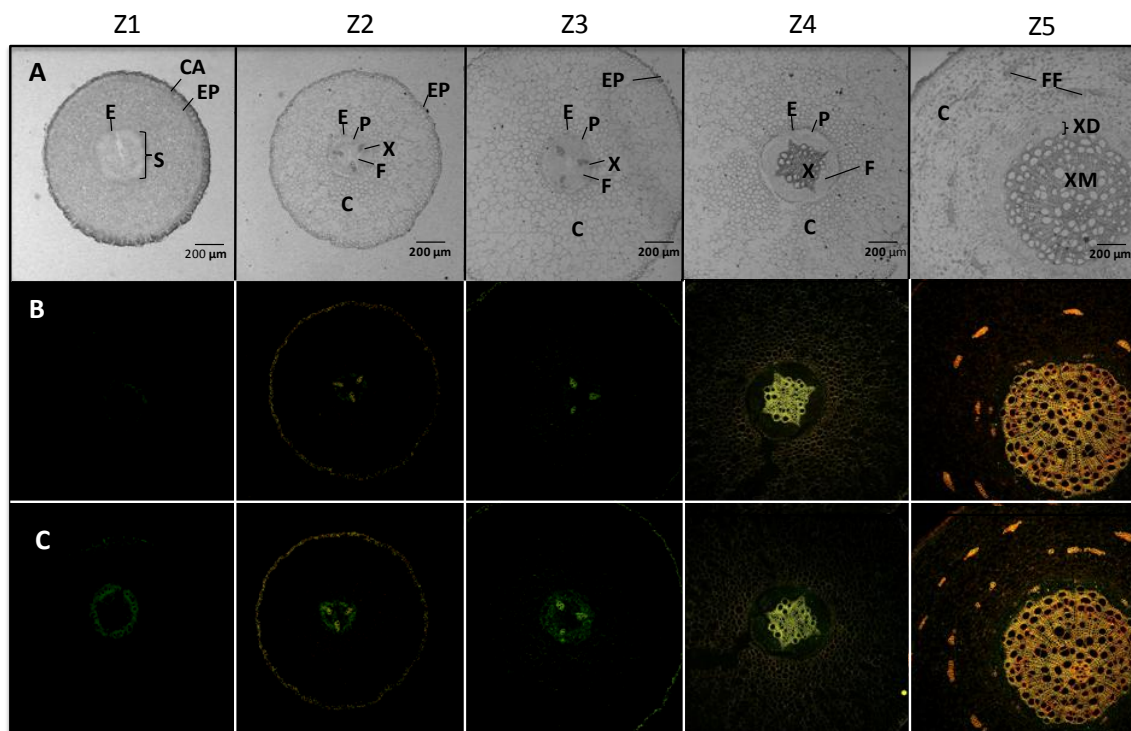


Figura 2. Localización de GABA en las diferentes zonas de la raíz (Z1 a Z5). Se muestran cortes de la región central de cada una de las zonas (Z1, zona meristemática; Z2, zona de elongación; Z3, zona de absorción; Z4, zona de raíces laterales; Z5, zona de transporte). A)

Imágenes en campo claro. B) Control negativo (sin anticuerpo primario). En la imagen se observan en colores amarillentos la autofluorescencia típica de las paredes lignificadas. C) Señal de GABA (en verde) en las diferentes regiones de la raíz. EP, epidermis; CA, caliptra; C, córtex; E, endodermis; P, periciclo; X, xilema; F, floema; FF, fibras floemáticas; S, estela.

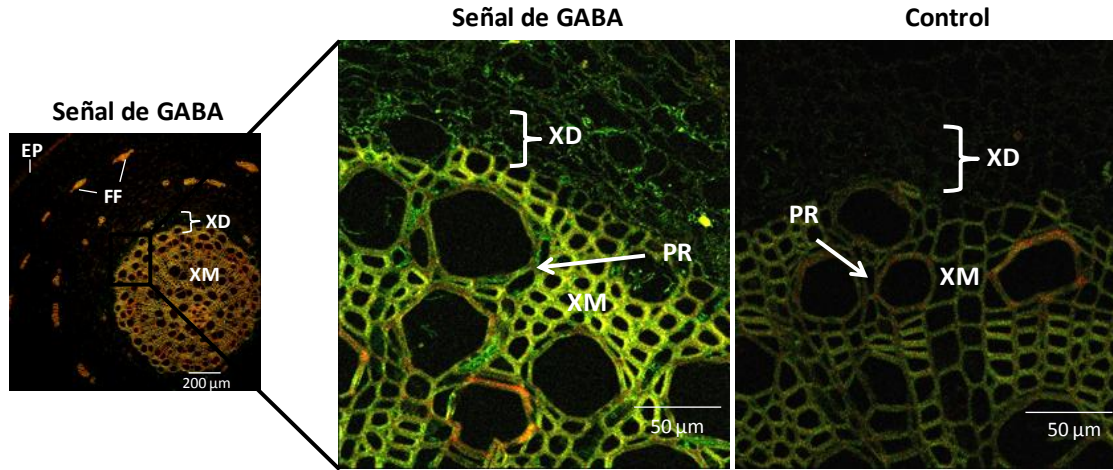


Figura 3. Detalle de la localización de GABA en Z5. XM, xilema maduro; XD, xilema en diferenciación; FF, fibras floemáticas; PR, parénquima radial; EP, epidermis.

En las zonas maduras de la raíz (Z4 y Z5), la señal de GABA se detectó en células del xilema en diferenciación, cambium vascular, floema y parénquima radial (Fig. 3). El parénquima radial pone en contacto el xilema, el cambium y el floema y se encarga de la comunicación radial entre estos tejidos, la epidermis y la médula, pudiéndose deber la presencia de GABA en parénquima radial a su transporte entre tejidos. La distribución de la señal del GABA en raíces maduras es similar a la descrita en tallo de *Populus* (capítulo 3) y pino (Molina-Rueda y col., 2015), estando asociada a la diferenciación de los tejidos vasculares en las zonas maduras de la raíz.

Niveles de mensajeros de los genes *PtaGAD* en las regiones de la raíz

Mediante qPCR y cebadores específicos se midió los niveles de mensajeros relativos de los seis genes *PtaGAD*, aunque sólo se detectaron mensajeros de tres de ellos (*PtaGAD1*, *PtaGAD2* y *PtaGAD3*) (Fig. 4). En el capítulo 3 se detectaron mensajeros de *PtaGAD5* en raíces pero con grandes variaciones de una réplica biológica a otra, lo que sugiere que *PtaGAD5* podría expresarse en tejidos muy específicos o en una etapa de desarrollo en concreto. El patrón de expresión del gen *PtaGAD2* fue similar al de *PtaGAD3*, aunque los niveles de mensajeros del primero (*PtaGAD2*) fueron inferiores al segundo (*PtaGAD3*) y presentaron menos diferencias entre las regiones. Los genes *PtaGAD2* y *PtaGAD3* presentaron su mayor expresión en Z2, región con un sistema vascular incipiente. Como ocurre en otros órganos de la planta

(Capítulo 3), se observa que *PtaGAD2* muestra mayores niveles de mensajeros en órganos pocos desarrollados y su expresión disminuye a medida que se va adquiriendo un mayor desarrollo vascular (Fig. 4 y capítulo 3). *PtaGAD1* mostró diferencias menos acusadas en los niveles de mensajeros entre las regiones de la raíz, con mayor expresión en regiones más maduras cuya función principal se relaciona con la adquisición de agua y nutrientes (Fig. 4), sugiriendo un papel en este proceso.

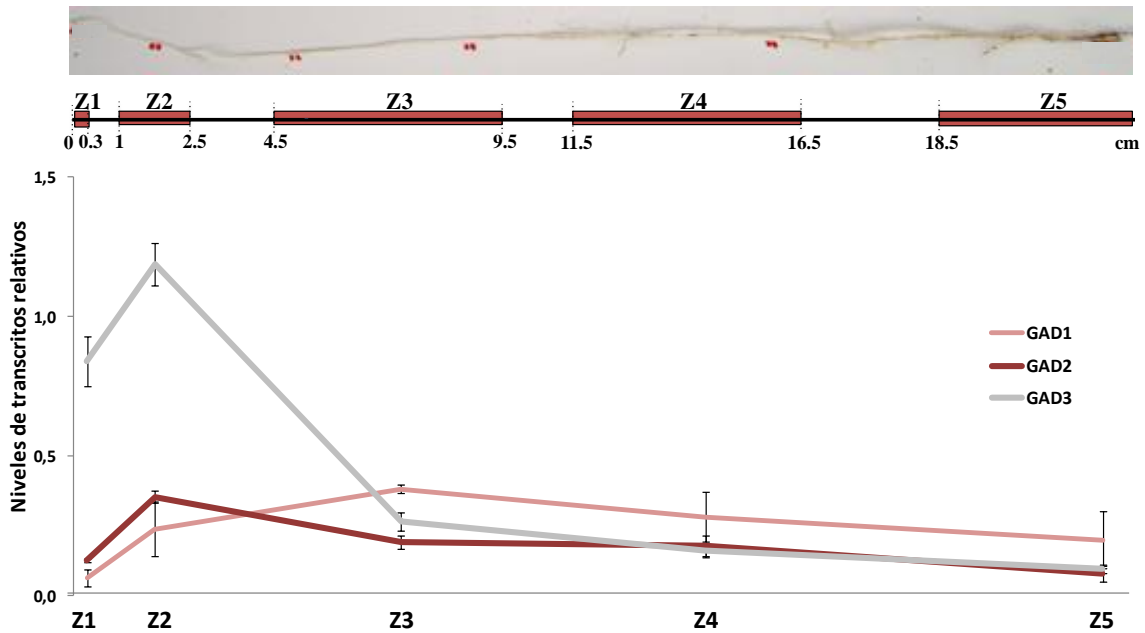


Figura 4. Patrón de expresión de los genes *PtaGAD* del híbrido *P. tremula x P. alba* en diferentes regiones de la raíz (Z1-Z5). La descripción de las regiones se detalla en la figura 2. En la gráfica se muestra la expresión relativa de los genes *PtaGAD1*, *PtaGAD2* y *PtaGAD3*. Los valores representados corresponden a la media de dos réplicas biológicas constituidas cada una por un grupo de 10 a 15 raíces de 3 plantas diferentes. Se representa la desviación estándar de la media. Los valores de expresión se normalizaron con tres genes de referencia.

Posibles papeles de los genes *PtaGAD* en raíces de *P. tremula x P. alba* y expresión de genes relacionados

En raíz se midieron los niveles de mensajeros de genes relacionados con el metabolismo del GABA, genes implicados directamente en el transporte y metabolismo del nitrógeno, genes relacionados con lignificación y genes que codifican proteínas con funciones características de las diferentes regiones de la raíz, para elucidar el posible papel de las *PtaGADs* en raíz.

Los genes se agruparon en base a la correlación entre los patrones de expresión. Aquellos genes que presentaron sus máximos niveles de mensajeros en la región

meristemática (Z1) se situaron en un grupo. En Z1 se observó que existe señal de GABA alrededor del sistema vascular incipiente. *PtaGAD3* fue el gen que mostró mayores niveles de mensajeros en Z1, pudiendo ser el principal responsable de la producción de GABA en esta región. Aunque se desconoce qué papel puede jugar el GABA en el meristemo principal de la raíz, se ha descrito que puede inhibir la expresión de genes pertenecientes a la familia 14-3-3 (Lancien y Roberts, 2006), que corresponde con proteínas reguladoras muy conservadas que participan en diversos procesos fisiológicos, entre ellos en el crecimiento de las raíces o división celular (Dougherty y Morrison, 2004; Darling y col., 2005; Oecking y Jaspert, 2009; Freeman y Morrison, 2011). Entre este grupo de reguladores se encuentran los genes *growth-regulating factor (GRF)* que son muy numerosos, habiéndose encontrado 13 genes funcionales en *Arabidopsis* (Jaspert y col., 2011). Algunos de los genes *GRF* se consideran marcadores de las regiones apicales de la raíz debido a que se ha descrito que la fusión de *AtGRF1-GUS* se localiza justo en el meristemo y en el periciclo de la raíz (Kim y col., 2003). Además, el ortólogo de *AtGRF1* en la planta del algodón también muestra su máxima expresión en raíces jóvenes con pocos días de desarrollo, y a medida que la raíz va desarrollándose disminuye su expresión (Wei y col., 2009). En concordancia con estas evidencias, *PtGRF1* (posible ortólogo de *AtGRF1*) y *PtGRF3* (posible ortólogo de *AtGRF4*) presentan sus máximos niveles de transcritos en la región Z1 (Fig. 5). A su vez se observó que existe una gran correlación entre *GRF1*, *GRF3* y *ACO4*, un gen que codifica para una ACC oxidasa que participa en la biosíntesis de etileno. Aunque no se ha descrito anteriormente una correlación entre estos genes, sí que se ha descrito que a nivel de proteínas las 14-3-3 interaccionan y estabilizan a la ACC sintasa (ACS), también implicada en la biosíntesis de etileno (Yoon y Kieber, 2013). El etileno juega un papel importante en la región Z1 promoviendo la división celular en el centro quiescente. Mutantes de sobreproducción de etileno muestran divisiones celulares aberrantes en el meristemo de la raíz (Ortega-Martinez y col., 2007). Debido a que el GABA puede inducir la expresión de genes implicados en las biosíntesis de etileno (Kathiresan y col., 1998), cabría la posibilidad de que el aminoácido estuviera regulando directamente, o a través de los genes *GRFs*, la síntesis de etileno, interviniendo en procesos de división celular en el meristemo de la raíz.

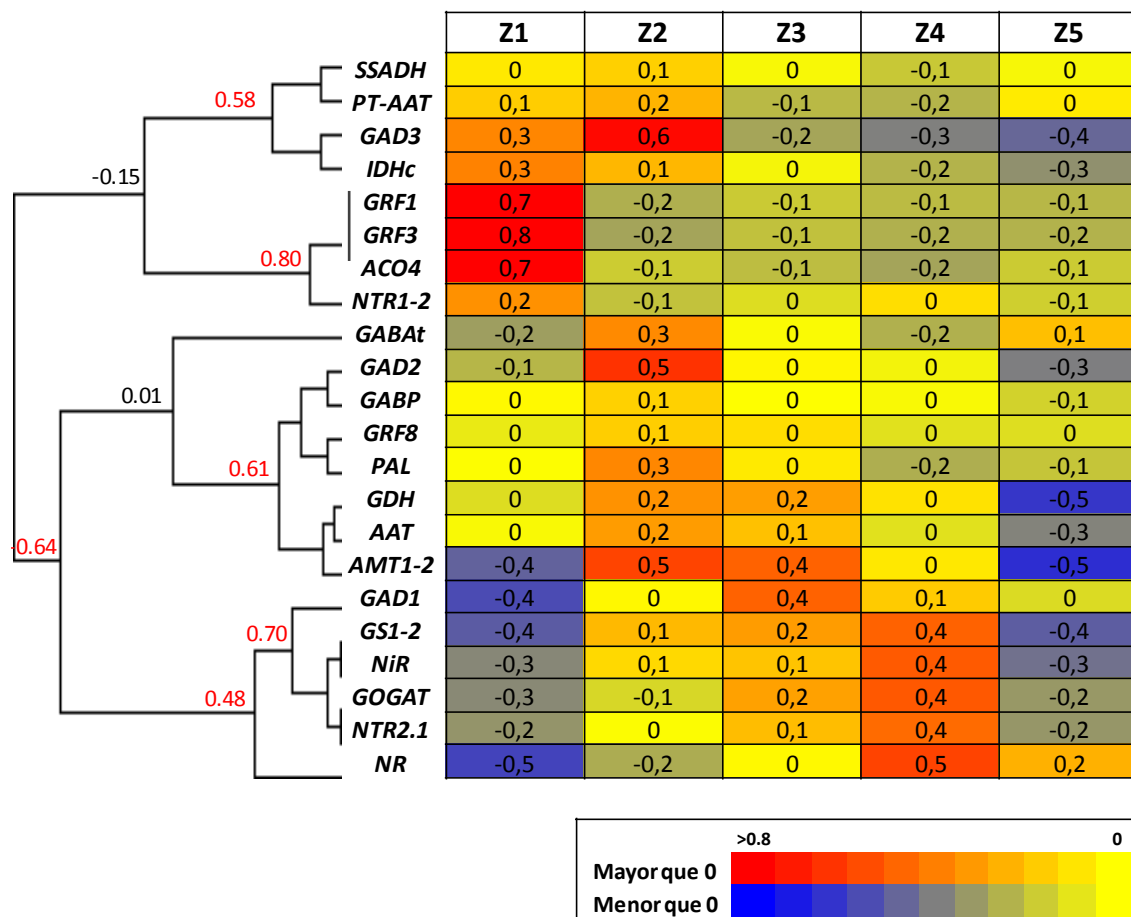


Figura 5. Mapa de calor de los niveles relativos de mensajeros de los genes del GABA shunt, genes implicados en el transporte y metabolismo de nitrógeno y genes con funciones específicas en la raíz, en las diferentes regiones (de Z1 a Z5). El valor de expresión relativa de cada gen corresponde a la media de dos replicas biológicas, estando cada replica formada por regiones de 10 o 15 raíces de tres plantas. Estos valores se normalizaron con los tres genes de referencia que cumplen los requisitos del programa geNorm (Véase materiales y métodos). Los valores de expresión obtenidos para cada gen se han representado en un heatmap (www.bar.utoronto.ca) que muestra en la gama del rojo los valores de expresión ($\log_2[\text{transcritos en una región}/\text{media de los transcritos en todas las regiones para ese gen}]$) por encima de la expresión media del gen en las regiones de raíz analizadas. En la escala de azules los valores por debajo de la media. Además, se representa un árbol basado en la correlación entre los patrones de expresión de los genes generado por Cluster 3.0 y visualizado por Java Treeview. SSADH, semialdehído succínico deshidrogenasa; PT-AAT, aspartato aminotransferasa de origen procariótico; IDHc, isocitrato deshidrogenasa citosólica; GRF1; gen de la familia 14-3-3 posible ortólogo de (*At2g22840*); GRF3; posible ortólogo de *AtGRF3* (*At2g36400*) y *AtGRF4* (*At3g52910*); ACO4; 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa 4; NTR1.2, transportador de nitrato de baja afinidad; GABA-T, GABA transaminasa; GAD, glutamato descarboxilasa; GABP, permeasa de GABA; GRF8, gen de la familia 14-3-3; PAL, fenilalanina amonio liasa; GDH, glutamato deshidrogenasa; AAT, aspartato aminotransferasa, AMT1.2, transportador de alta afinidad de amonio; GS1.2; glutamina sintetasa citosólica; NiR, nitrito reductasa; GOGAT-NADH, glutamato sintasa dependiente de NADH; NTR2.1, transportador de alta afinidad de nitrato; NR, nitrato reductasa.

El transportador de nitrato de baja afinidad *NTR1.2* también mostró altos niveles de mensajeros en la zona meristemática, y por lo tanto una alta correlación con los

genes expresados en esta zona. Resultados similares se han publicado en *Arabidopsis*, detectándose mensajeros de *AtNRT1.1* y *AtNRT1.2* en la región meristemática de la raíz (Guo y col., 2001, Huang y col., 1999). *AtNRT1,1* puede estar implicado en la adquisición rápida de nitrato para su asimilación *in situ* en tejidos en plena división y crecimiento (Guo y col., 2001). Previamente, se ha descrito que algunos de los transportadores de nitrato pueden regularse positivamente en hambre por nitrógeno por GABA (Beuve y col., 2004), de esta manera este aminoácido puede actuar como molécula señal en la zona meristemática de la raíz mediante la activación de estos transportadores.

Un segundo grupo del árbol corresponde a los genes que presentan una expresión similar en todas las regiones de la raíz, aunque muestran los máximos niveles de mensajeros en la zona de elongación (Z2). En diferentes especies (arroz, maíz y cebada) se ha descrito que en la región de elongación aumenta la absorción de NH_4^+ , siendo baja la adquisición de NO_3^- cuando ambas formas inorgánicas están disponibles en el medio (Henriksen y col., 1992; Lazof y col., 1992; Colmer y Bloom, 1998). Estos datos concuerdan con la máxima expresión del gen *AMT1-2* (transportador de amonio) en Z2 (Fig. 5), al igual que se ha descrito para el transportador de amonio de alta afinidad (*AMT1-2*) en regiones similares de la raíz de *Arabidopsis* (Min y col., 2000). El amonio absorbido, además de transportarse a otras regiones, puede asimilarse en esta región (Z2) y esto supondría varias ventajas para la planta: 1) un menor gasto energético en las hojas, y en la raíz ya que la asimilación de NH_4^+ consume menos energía que la de NO_3^- (Bloom y col., 1992); 2) favorece la elongación celular debido a que la absorción de NH_4^+ promueve la liberación de protones por la ATPasa a la rizosfera (Ahmad, 1996), generando un entorno ácido en la región apical que fomenta la extensibilidad de la pared celular y potencia la elongación (Taylor y Bloom, 1998). 3) evitar la acumulación del NH_4^+ que puede resultar tóxico para la célula (Gerendás y col., 1997). El ciclo GS/GOGAT y la glutamato GDH pueden llevar a cabo la asimilación del amonio en plantas. Los genes que codifican para GS y GOGAT se expresaron mayoritariamente en regiones más maduras de la raíz, así teniendo en cuenta que GDH presentó los máximos niveles de mensajeros en Z2 y Z3 (Fig. 5) y se induce a altas concentraciones de amonio (Lancien y col., 2000), se sugiere que en Z2 puede asimilarse el amonio por la GDH generando un ambiente ácido que favorece el desarrollo vascular de estas regiones.

El glutamato sintetizado a partir de la asimilación de amonio puede ser sustrato de varias enzimas, como la aspartato aminotransferasa (AAT) o la GAD. En Z2 los genes *PtaGAD* que mostraron mayores niveles de mensajeros fueron *PtaGAD2* y *PtaGAD3*, aunque este último no se agrupa en el árbol en el mismo grupo con *PtaGAD2* debido a que *PtaGAD3* también presentó altos niveles de mensajeros en Z1. El resto de genes del GABA shunt (*GABA-T* y *SSADH*) también obtuvieron los máximos niveles de mensajeros en Z2. En *Arabidopsis*, el gen *GABA-T* también aumenta sus niveles de mensajeros en la parte apical de la raíz (no en la zona meristemática) sobre todo en la región de elongación de la raíz, sugiriendo que el GABA shunt puede participar en la asimilación primaria de nitrógeno, bien para la síntesis de nuevos aminoácidos para regenerar NADH en el ciclo de Krebs o para sintetizar intermediarios del ciclo de Krebs para abastecer rutas alternativas (Bouché y col., 2004). *PtaGAD2* y *PtaGAD3* se correlacionan con genes implicados en la asimilación primaria de nitrógeno y genes implicados en el desarrollo vascular. En el capítulo 3 de esta memoria, se ha mostrado que PtGAD2 puede estar implicado en el desarrollo vascular incipiente de órganos de la parte aérea de la planta. En la raíz, su máxima expresión se observa en regiones donde se produce el establecimiento del sistema vascular. Además, se correlaciona con genes de la ruta de síntesis de los fenilpropanoides, como la fenilalanina amonio liasa (PAL), que presenta alta actividad en tejidos vasculares (Rubery y Northcote, 1968) durante la diferenciación del xilema (Haddon y Northcote, 1975). Estos datos indican que PtGAD2 también podría estar implicada en el desarrollo vascular de la raíz.

El gen *PtaGAD3* también se correlacionó con genes relacionados previamente con el desarrollo vascular, como es el caso del gen isocitrato deshidrogenasa citosólica (*IDHc*) y la aspartato aminotransferasa de origen procariota (*PT-AAT*). La IDHc está implicada en la síntesis de 2-oxoglutarato (Pascual y col., 2008) y se ha observado que su sobreexpresión en *Populus* afecta al desarrollo vascular (Pascual, 2008). La PT-AAT presenta doble actividad sintetizando aspartato o arogenato. El arogenato es precursor de la fenilalanina, sustrato inicial para la biosíntesis de lignina (revisado en De la Torre y col., 2014). Las correlaciones del gen *PtaGAD3* con *IDHc* y *PT-AAT* junto al origen común de *PtaGAD3* y *PtaGAD2* (capítulo 3) indican que *PtaGAD3* y *PtaGAD2* han divergido pudiendo adquirir nuevos elementos reguladores que resulten en patrones de expresión diferentes, debido a que *PtaGAD2* podría tener un papel más importante en el desarrollo vascular de los órganos de la parte aérea de la planta y *PtaGAD3* en la raíz.

En base a los resultados comentados hasta ahora, la síntesis de GABA puede tener diferentes papeles en región de elongación de la raíz, como: 1) participar en la asimilación primaria de nitrógeno consumiendo el glutamato sintetizado por la GDH para aportar succinato al ciclo de Krebs y mantener el balance C/N (Bouché y col., 2004); 2) participar en el proceso de reciclaje de amonio procedente de la reacción PAL en el proceso de lignificación; y/ó 3) como parte de la señalización actuando sobre la expresión de expansinas (Renault y col., 2011) y genes de biosíntesis de etileno (Kathiresan y col., 1998) que modulan la elongación celular.

Por último, se encuentran aquellos genes que se expresan mayoritariamente en regiones de la raíz especializadas en la adquisición de nutrientes de forma eficiente bien a través de pelos radiculares presentes en Z3 (Jungk, 2001) ó de raíces secundarias que aumentan la superficie de absorción en Z4 (Fig. 5). En las regiones más maduras de la raíz disminuye la absorción de NH_4^+ y aumenta la de NO_3^- (Henriksen y col., 1992). En concordancia con esta tendencia, en este trabajo se observó un descenso de los niveles de mensajeros del transportador de amonio *AMT1-2* y un aumento de los niveles del transportador *NTR2.1* (Fig. 5) (un transportador de alta afinidad de captación de NO_3^- (Wang y col., 2012)) en Z4 con respecto a regiones más jóvenes. *NTR2.1* se localiza en la membrana plasmática de las células epidérmicas o del córtex en regiones más desarrolladas de la raíz (Wirth y col., 2007). La mayor expresión del transportador de alta afinidad *NTR2.1* en Z4 respecto a regiones más jóvenes, apoya que en regiones maduras de raíces es de mayor importancia la adquisición NO_3^- .

El NO_3^- adquirido en estas regiones puede almacenarse en vacuolas (Pate, 1980), trasladarse al xilema para transportarse a otras regiones de la planta (Lewis y col., 1982) o bien incorporarse a aminoácidos. El nitrato debe reducirse a amonio por las reacciones consecutivas de la nitrato reductasa (NR) y la nitrito reductasa (NiR) para incorporarse a aminoácidos. La NR presenta su máxima actividad en regiones maduras de la raíz (Long y Oaks, 1990; Peat y Tobin, 1996). De acuerdo con esto, los genes *NR* y *NiR* presentaron sus mayores niveles de mensajeros en la región Z4 de la raíz (Fig.5), sugiriendo que la reducción de nitrato en *P. tremula x P. alba* podría realizarse en regiones de proliferación de raíces secundarias (Z4). A diferencia de lo que ocurría en la parte apical de la raíz, en Z4 predomina la expresión de los genes del ciclo *GS/GOGAT* sobre la de *GDH* (Fig. 5), así la mayor parte del amonio debería estar incorporándose a glutamato por la acción del ciclo *GS/GOGAT*. En esta región (Z4) ninguno de los genes *PtaGADs* mostraron su máxima expresión, aunque *PtaGAD1* se correlaciona con este

grupo de genes implicados en la asimilación de nitrógeno presentando su máxima expresión en la región Z3 (Fig. 4 y 5). PtaGAD1 podría estar participando en la asimilación primaria de nitrógeno en la raíz para la síntesis de GABA que podría transportarse vía xilema a las partes aérea de la planta, o por el contrario, transportarse de zonas maduras de la raíz a través del floema hacia el ápice de la raíz explicándose de esta forma la localización de GABA en tejidos implicados en el transporte (Fig. 3)

Conclusiones

Los genes *PtaGAD* muestran una expresión diferencial en las regiones de la raíz proponiendo que las proteínas codificadas por estos genes participan en diferentes procesos en este órgano. Las tres PtaGADs del híbrido podrían participar en la asimilación primaria de nitrógeno en la raíz, derivando el glutamato a otros compuestos carbonados y nitrogenados manteniendo el estatus C/N en la planta. Además, PtaGAD2 y PtaGAD3 estarían ejerciendo su función principalmente en las partes jóvenes de las raíces participando en el desarrollo vascular incipiente en estas zonas, reciclando el amonio derivado del proceso de lignificación o en la regulación de otros genes implicados en el proceso de elongación. En cambio, PtaGAD1 podría sintetizar GABA en zonas más maduras de la raíz. El GABA en regiones maduras de la raíz puede inducir la proliferación de raíces secundarias o transportarse vía floema hacia las zonas jóvenes de la raíz o vía xilema hacia la parte aérea de la planta para ejercer su función.

Capítulo 5

Expresión de la familia génica glutamato descarboxilasa de *Populus tremula* x *P. alba* frente a estreses abióticos

Introducción

De acuerdo con el informe del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC), la temperatura media mundial aumentará 0,3°C por década (Jones y col., 1999). Los efectos del calentamiento global no se limitan a aumentar las temperaturas medias anuales en todo el mundo, sino que dará lugar a períodos calientes y fríos más extremos y más frecuentes. A su vez, las predicciones apuntan a que el cambio climático provocará una alteración en el patrón de las precipitaciones, provocando periodos de precipitaciones abundantes que pueden desencadenar anegaciones de zonas cercanas a ríos, o por el contrario, periodo de escasas lluvias, disminuyendo la disponibilidad de agua. Altas temperaturas y la disminución del contenido del agua en el suelo pueden provocar un aumento en la concentración de sales del suelo siendo contraproducentes para los seres vivos. Así, el cambio climático será el responsable del aumento en la frecuencia de exposición de las plantas a estreses medioambientales tales como calor, frío, inundación, sequía y sal. Las plantas son organismos sésiles que ante las fluctuaciones ambientales deben desarrollar mecanismos de tolerancia a diferentes tipos de estrés para sobrevivir. El estudio de las respuestas de las plantas frente a condiciones de estrés puede generar información útil para la selección y/o generación de plantas tolerantes a las mismas.

Un mecanismo de respuesta a estrés muy extendido entre las plantas es el aumento en las concentraciones de GABA en los diferentes órganos (Kinnersley y Turano, 2000). El GABA puede estar involucrado en la regulación de numerosos mecanismos de respuesta a estrés tales como el balance de C/N, el potencial osmótico, la eliminación de radicales libres, la regulación del pH, el crecimiento de la planta y el desarrollo de las raíces (Kinnersley y Turano, 2000; Bouche y Fromm, 2004). Aunque existen diferentes tipos de estreses abióticos, todos presentan como respuesta común el incremento en los niveles de calcio (Sanders y col., 1999) y algunos de ellos la disminución en el pH (Aurisano y col., 1995). Ambos factores, pH ácido y el incremento de Ca^{+2} , aumentan la actividad de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) (Ramputh y Bown, 1996) y como consecuencia los niveles de GABA. Estudios de expresión de los genes GAD en condiciones de estrés se han llevado a cabo en diversas especies herbáceas como *Arabidopsis* (Miyashita y Good, 2008; Renault y col., 2010), *Nicotiana sylvestris* (Ackay y col., 2012), *Panax ginseng* (Lee y col., 2010) y *Solanum lycopersum* (Mae y col., 2012). Aunque se ha descrito que las GADs de

plantas están codificadas por varios genes, no todos responden de la misma manera a las diferentes situaciones ambientales. Un ejemplo de ello es la familia génica GAD de *Arabidopsis*, de los cinco genes GAD que posee, *AtGAD4* se ha descrito como el más susceptible a estrés ya que responde aumentando su expresión frente a hipoxia (Miyashita y Good, 2008), sal (Renault y col., 2010), sequía (Urano y col., 2009) y frío (Kaplan y col., 2007). La mayoría de los estudios de expresión de GADs realizados en condiciones adversas se han llevado a cabo en especies anuales, que viven sólo durante unos meses del año teniendo que hacer frente a cambios climatológicos durante un tiempo limitado. En cambio, los árboles viven durante décadas y tienen que soportar cambios estacionales, y periodos prolongados de condiciones adversas. En este trabajo se ha utilizado como especie modelo un árbol, *Populus tremula x P. alba*, debido a su importancia económica en la industria maderera y en el desarrollo de biocombustibles. El mejoramiento de esta especie para tolerar las condiciones adversas despierta un gran interés con el objetivo de evitar o minimizar en lo posible pérdidas en su producción.

En este capítulo se ha caracterizado mediante análisis de expresión relativa la familia génica GAD de *P. tremula x P. alba* (*PtaGADs*) frente a frío, calor, inundación de raíces, sequía y sal. Los resultados mostraron que los *PtaGADs* presentan diferentes perfiles de expresión poniendo de manifiesto una regulación diferencial de estos genes frente a los distintos tipos de estrés. En este trabajo se proponen diferentes papeles para cada uno de los genes de la familia génica GAD en situaciones de estrés.

Resultados y discusión

Estrés por calor

El estrés por temperatura se define como el aumento ó descenso en la temperatura respecto a un umbral durante un tiempo suficiente para causar daños irreversibles en el crecimiento y el desarrollo de la planta (Wahid y col., 2007). Este umbral va a depender de cada especie, pero en general un aumento de 10-15°C por encima de su temperatura de crecimiento normal se considera estrés por calor (Wahid y col., 2007). Así, teniendo en cuenta que la temperatura de crecimiento normal del híbrido *P. tremula x P. alba* es de 24°C (Leplé y col., 1992), se expusieron las plantas a 39°C durante 72h. En regiones dónde es habitual el cultivo de *Populus* pueden alcanzarse estas temperaturas debido a los ciclos diurnos y estacionales, por lo que el tratamiento de las plantas representó condiciones habituales de estrés por calor.

Las altas temperaturas van a producir cambios en las estructuras de las membranas biológicas, en la naturaleza de las proteínas y en la organización de microtúbulos (Howarth, 2005; Smertenko et al., 1997). Además, el calor provoca cambios en el desarrollo y el crecimiento de la planta (Vollenweider y Gunthardt-Goerg, 2005). La disminución del crecimiento medio en altura se observó en plantas del híbrido expuestas a 39°C frente a las plantas en condiciones control (Fig. 1A). Las altas temperaturas también provocan cambios fenotípicos en las plantas como la pérdida de turgencia en hojas que puede conducir a la senescencia de las mismas (Vollenweider y Gunthardt-Goerg, 2005). Las hojas jóvenes de las plantas del híbrido tratadas presentaron síntomas de pérdida de turgencia tras 24h de tratamiento, mostrando daños más severos tras 72h ya que las hojas se encontraban totalmente plegadas sobre sí mismas (Fig. 1B).

Para comprobar la respuesta de la planta a nivel molecular se midió la expresión de un gen ortólogo a un marcador del estrés por calor descrito previamente (*MBF1C*). *MBF1C* es un co-activador transcripcional de la familia MBF que aumenta su expresión durante este estrés (Suzuki y col., 2005 y 2008). En nuestro estudio, se observó un aumento de la expresión de *MBF1C* en todos los órganos de la planta tras el tratamiento de estrés (Fig. 1C).

Los datos de altura, apariencia de la hoja y la expresión de *MBF1C* muestran que las plantas de *P. tremula x P. alba* presentaron una respuesta fenotípica y molecular al estrés por calor.

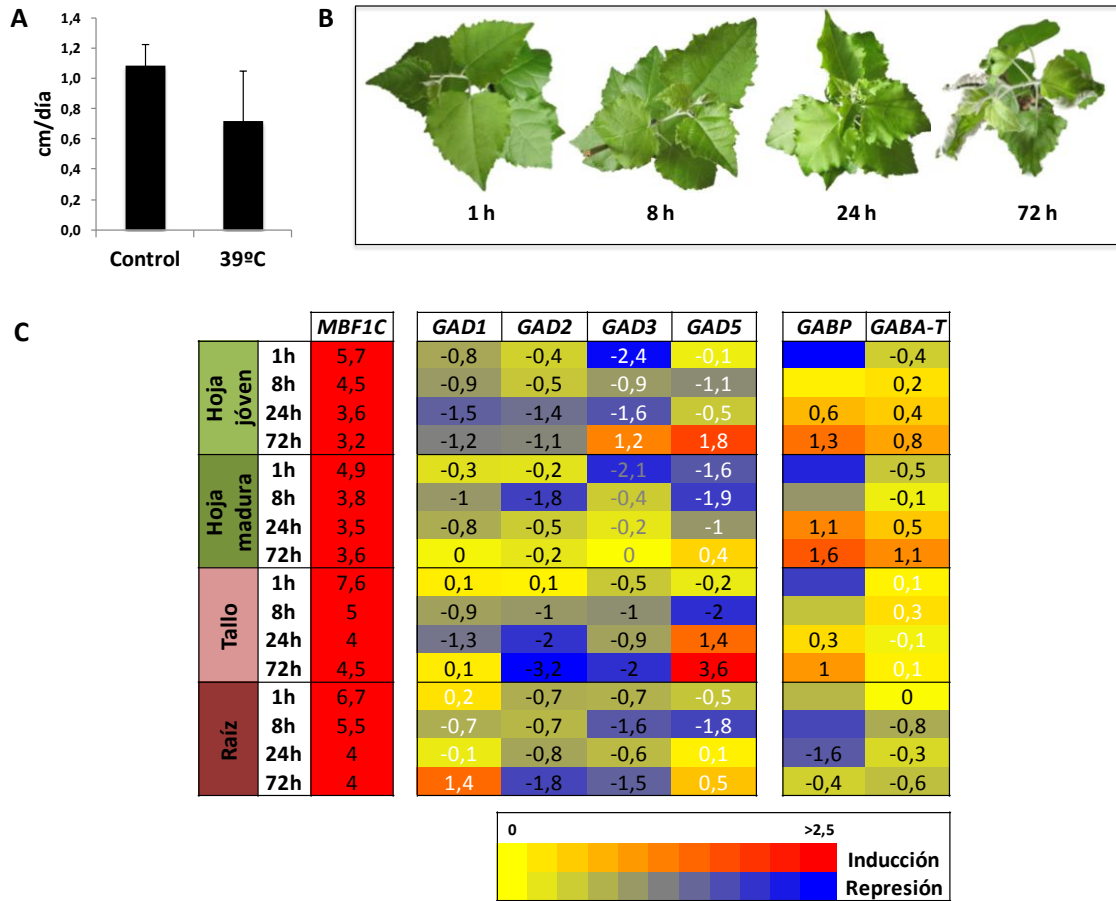


Figura 1. Efecto del tratamiento de calor al crecimiento, el fenotipo y la expresión de los genes del metabolismo del GABA en *P. tremula* x *P. alba*. A) Crecimiento medio en altura de plantas expuestas a calor (39°C) frente a controles (24°C). Los datos de altura se tomaron a las 24h y 72 h del tratamiento. En la figura se muestra la media del crecimiento (cm/día) de al menos tres réplicas biológicas. B) Fenotipo de las plantas durante el tratamiento por calor. C) Mapa de calor de los valores de expresión relativa de los genes *PtaGADs*, *GABP* y *GABA-T* y del gen marcador *MBF1C* en estrés por calor. Los valores representados corresponden al log₂ del ratio de la media de la expresión relativa en dos plantas tratadas entre la media de la expresión relativa en dos plantas controles. Así, si el gen presenta mayor expresión en plantas tratadas frente a las controles su valor será positivo y se representa con un color de la gama del rojo y naranja, por el contrario, si el gen presenta menor expresión en plantas tratadas que en las controles el valor del log será negativo y se representa en la gama del azul y gris. Los valores en amarillo reflejan que la expresión del gen en plantas tratadas y controles es similar. Todos los resultados de expresión están normalizados frente a tres genes de referencia (materiales y métodos). En negro se muestran los valores con un p-valor menor de 0,05 (ANOVA de dos vías), en gris los de un p-valor menor de 0,1 y en blanco aquellos que muestran un p-valor mayor de 0,1. GAD, glutamato descarboxilasa; GABA-T, GABA transaminasa; GABP, permeasa de GABA.

Efecto del calor en los niveles de mensajeros de los genes *PtaGAD* y los genes implicados en el metabolismo de GABA

Tradicionalmente, se ha observado que el GABA aumenta en tejidos de plantas sometidas a diferentes tipos de estreses medioambientales (revisado en Kinnersley y

Turano, 2000) con diferentes patrones de acumulación de GABA en función de la especie (Molina-Rueda y col., 2015). Por ejemplo, en respuesta a calor los niveles de GABA aumentan hasta 5 veces tras 1h de tratamiento y 18 veces tras 24h en cultivos celulares de judías respecto al control (Revisado en Kinnersley y Turano, 2000), y en raíces de *Arabidopsis* estos niveles aumentan 10 veces tras 2h de tratamiento (Bouché y col., 2004). Varios trabajos han puesto de manifiesto que existe una buena correlación entre los niveles de GABA y los niveles de mensajeros de los genes *GAD* durante los tratamientos de estrés (Kaplan y col., 2007; Renault y col., 2010; Molina-Rueda y col., 2010; Ackay y col., 2012), lo que indica que cambios en la expresión génica de la familia *GAD* suele implicar cambios en los niveles de GABA. En este estudio, además de analizar los niveles de mensajeros de los genes *PtaGAD* en el tratamiento de calor, se ha incluido la expresión de otros genes relacionados con el metabolismo del GABA como la permeasa mitocondrial de GABA (*GABP*), que media el transporte del GABA a la mitocondria, y el de GABA transaminasa (*GABA-T*).

Los niveles de mensajeros de los genes *PtaGAD* disminuyeron en general en todas las muestras y tiempos ensayados en plantas del híbrido expuestas a 39°C (Fig. 1C). Estos resultados concuerdan con lo observado en *Arabidopsis*, ya que también se ha observado una respuesta general de represión en raíz y tallo frente a los tratamientos de estrés por calor (revisado en Shelp y col., 2012b) sugiriendo que los genes *GADs* son susceptibles a la regulación por altas temperaturas.

De forma específica, el tratamiento de calor provocó una disminución general en los niveles de mensajeros de *PtaGAD1*, *PtaGAD2* y *PtaGAD3* en todos los tejidos ensayados (Fig. 1C). El gen *PtaGAD1* mostró un patrón de expresión en hojas y tallo similar al de *PtaGAD2* en altas temperaturas (Fig. 1C), pudiendo ambos genes presentar mecanismos similares de regulación frente a estas condiciones. Los estudios filogenéticos sugieren que *PtaGAD3* y *AtGAD1* son ortólogos, siendo ambos los genes *GAD* que se expresan mayoritariamente en raíces en sus respectivas especies (capítulo 3: Miyashita y Good, 2008). Los niveles de transcritos de *AtGAD1* tampoco incrementaron en raíces de *Arabidopsis* en respuesta a calor (Shelp y col., 2012d), aunque la *GAD* codificada por este gen podría ser la responsable del aumento de los niveles de GABA en raíces en altas temperaturas (Bouché y col., 2004).

El gen *PtaGAD5* fue el único que aumentó los niveles de transcritos de forma significativa en tallo mostrando un incremento de hasta 12 veces respecto al control tras 72h de tratamiento (Fig. 1C). Esta inducción puede deberse a que *PtaGAD5* es el gen que

posee mayor número de posibles elementos *cis* de respuesta a calor en su promotor (4 elementos *cis* HSE; capítulo 3). Estos datos apuntan a que *PtaGAD5* puede jugar un papel importante en la respuesta a estrés por calor, especialmente en tallo.

Los niveles de transcritos de *GABP* y *GABA-T* aumentaron en hojas y tallo a las 24h y 72h del inicio del tratamiento (Fig. 1C) indicando un mayor metabolismo del GABA en respuesta a calor en estos órganos. El incremento en los niveles de mensajeros de *PtaGAD5* en tallo, y en hojas de *PtaGAD3* y *PtaGAD5*, podría conducir a un incremento en los niveles de GABA en estos órganos y por lo tanto la activación de la ruta del GABA shunt, que podría ser importante para mitigar los efectos del estrés por varios motivos: 1) para eliminar la acumulación de ROI provocada por los tratamientos de calor (Cao y col., 2013) ya que la activación del GABA shunt disminuye la acumulación de especies reactivas (Bouché y col., 2003); y 2) para el reciclaje del nitrógeno durante el proceso de senescencia en hojas, teniendo en cuenta que tras 72h de tratamiento las hojas presentaban síntomas de una severa pérdida de turgencia, además, se ha publicado que *GABA-T* aumenta su expresión durante la senescencia de hojas de arroz para mantener el balance de C/N (Ansari y col., 2005).

Estrés por frío

Las bajas temperaturas provocan rigidez en las membranas biológicas, despolimerización de microtúbulos y por lo general una desaceleración de los procesos metabólicos que conlleva a desequilibrios en el balance entre la energía lumínica y la energía química, provocando la acumulación de ROS (Ruelland y Zachowski, 2010) y como consecuencia, la inhibición en el crecimiento de la planta. En este trabajo, las plantas del híbrido se expusieron a 10°C durante 72h y mostraron una disminución significativa del crecimiento respecto a las plantas controles (Fig. 2A), sin alteraciones en el fenotipo ya que sólo algunas hojas habían perdido turgencia pero sin signos de marchitez (Fig. 2B). Estos resultados concuerdan con trabajos previos también en *Populus* pero en este caso a una temperatura inferior (4°C) (Renault y col., 2014).

Los genes CBF (factores de unión a repeticiones C) son genes de respuesta a frío que pertenecen a una familia de activadores transcripcionales que se unen a elementos reguladores conocidos como CRT (repeticiones C) y DRE (elemento de respuesta a deshidratación) (Stockinger y Gilmour & Thomashow, 1997). En trabajos previos se ha observado que los CBFs en *Populus* se inducen en frío, y en concreto el *CBF3* aumenta sus niveles de mensajeros en hojas y tallo en las primeras horas de tratamiento

(Benedict y col., 2006). En este trabajo, como marcador de estrés por frío, se midió la expresión del gen *CBF3* y se observó un aumento general de sus niveles de mensajeros tras 1h y 8h del tratamiento (Fig. 2C), reflejando una respuesta molecular a estrés por bajas temperaturas en el híbrido.

Efecto del frío en la expresión relativa de los genes *PtaGAD* y de los genes implicados en el metabolismo de GABA

En general, la expresión de los genes *PtaGAD* aumentó en los diferentes órganos de *P. tremula x P. alba* en respuesta a frío (10°C), siendo más importante este aumento en la parte aérea de la planta (Fig. 2C),

Los genes *PtaGAD* mostraron patrones de expresión diferentes frente a frío (Fig. 2C). El patrón de expresión de *PtaGAD5* fue el más diferente al resto de genes *PtaGAD*, con inducciones significativas sólo en hojas jóvenes. El gen *AtGAD4*, posible ortólogo de *PtGAD5*, también aumenta sus mensajeros en la parte aérea de *Arabidopsis* en respuesta a frío (Kaplan y col., 2007). Los genes *PtaGAD1* y *PtaGAD3* presentaron un patrón de expresión similar, aunque *PtaGAD3* tuvo mayores inducciones de sus mensajeros en todos los tejidos. *PtaGAD3* junto con el gen *PtaGAD2* fueron los genes *PtaGAD* que obtuvieron un mayor incremento de mensajeros en tallo en frío respecto a sus niveles iniciales en condiciones normales de crecimiento, pudiendo ser los principales responsables de la síntesis de GABA en tallo en respuesta a frío. El patrón de expresión de *PtaGAD2* fue muy similar al gen marcador *CBF3*, presentando altas inducciones de sus mensajeros a tiempos cortos (1 y 8h) en frío. El aumento de los niveles de mensajeros de los genes *GAD* a tiempos cortos en frío se ha observado en especies herbáceas, como *Panax ginseng*, en la que se detecta un aumento de la expresión de genes *GAD* a 4°C, alcanzando los máximos niveles tras 8h de tratamiento (Lee y col., 2010); o en *Arabidopsis*, en la que se registra inducción del gen *AtGAD2*, posible ortólogo de *PtaGAD2* (Capítulo 3), en la parte aérea de la planta alcanzando máximos niveles de transcritos tras 12h y 24h de tratamiento (Kaplan y col., 2007). En estas condiciones de estrés, también aumentan los niveles de GABA alcanzando la máxima concentración tras 24h de tratamiento (Kaplan y col., 2007). Los niveles de GABA pueden aumentar hasta 20 veces en frío respecto a los valores iniciales, observándose a su vez un incremento rápido y transitorio de calcio citosólico (Wallace y col., 1984). Durante el estrés por frío se ha demostrado que ocurre un incremento de Ca^{+2} en la célula que es el que provoca la acumulación de GABA debido al aumento en

la actividad de la GAD por la unión de Ca^{+2} – calmodulina (CaM) al dominio de unión a CaM (CaMBD) (Cholewa y col., 1996). El GABA puede proteger las proteínas y membranas de los daños provocados por las bajas temperaturas actuando como osmolito compatible (Uemura y col., 2003; Wanner y Junttila, 1999), pudiéndose explicar de esta manera que las plantas del híbrido responden a estrés por frío aumentando la expresión de GAD para, en última instancia, aumentar los niveles de GABA por sus propiedades crioprotectoras.

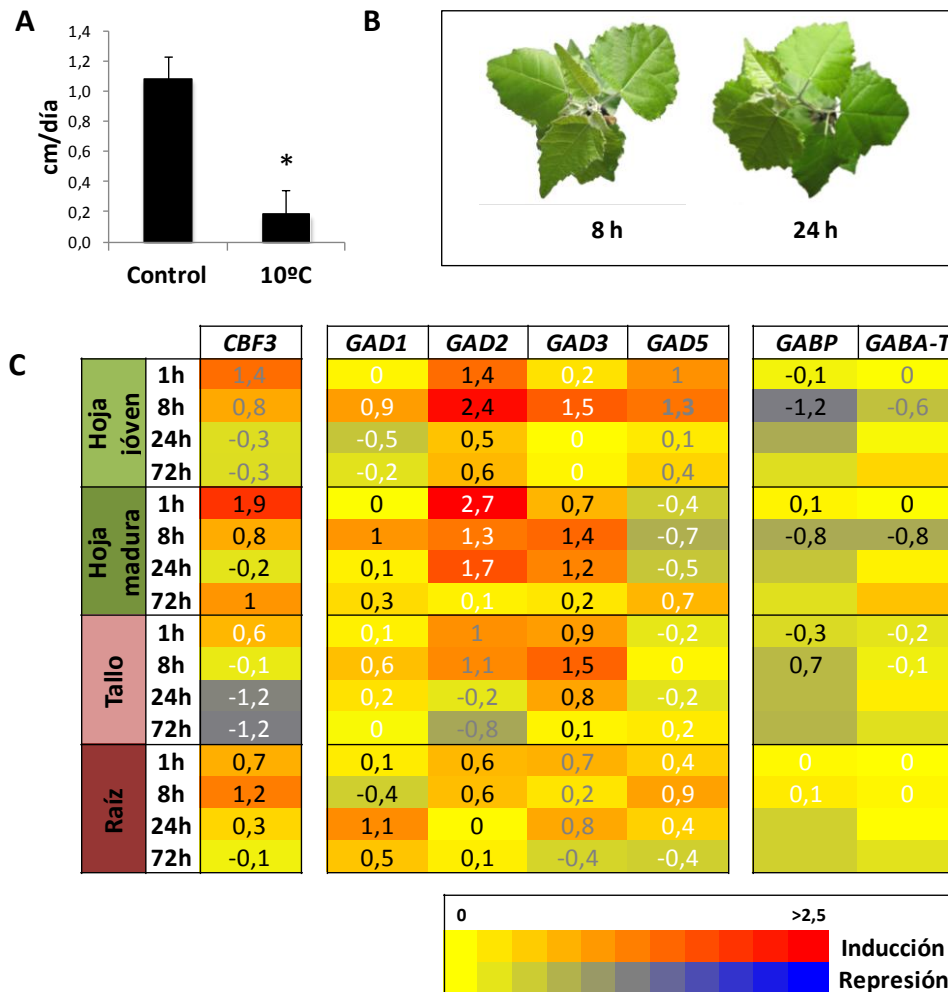


Figura 2. Efecto del tratamiento de frío en el crecimiento, el fenotipo y expresión de los genes del metabolismo del GABA de *P. tremula x P. alba*. A) Crecimiento medio en altura de plantas expuestas a frío (10°C) frente a controles (24°C). Los datos se tomaron a las 24h y 72h y se representó la media del crecimiento (cm/día) de al menos tres réplicas biológicas. El asterisco indica que los resultados de ANOVA muestra un valor $p < 0,05$ respecto al control. B) Fenotipo de plantas representativas durante el tratamiento por frío. C) Mapa de calor de los valores de expresión relativa de los genes en estrés por frío y del gen marcador de frío, *CBF3*. Los valores fueron tratados de la misma forma que los mostrados en la figura 1.

Los genes *GABA-T* y *GABP* no mostraron cambios relevantes de expresión durante el tratamiento de frío, sólo se observó una disminución de sus niveles en

algunos órganos (Fig. 2C). La actividad de la GABA-T va a estar limitada en frío provocando la acumulación de GABA (Simpson y col., 2010), para posteriormente, una vez desaparecido el estrés, se active esta ruta y se genere rápidamente succinato y energía a través del ciclo de Krebs (Shelp y col., 2012c).

En resumen, el estrés por frío provoca un incremento en los niveles de mensajeros de los genes *PtaGAD*, siendo *PtaGAD2* el que se induce principalmente en la parte aérea de la planta y *PtaGAD3* en tallo. Teniendo en cuenta que un incremento en los niveles de mensajeros de genes *GAD* se suelen correlacionar con el aumento de niveles de GABA, en frío podría existir altos niveles de GABA en los órganos del híbrido, que se acumularía por la inhibición de su catabolismo a través del GABA shunt, ayudando esta acumulación a mitigar los efectos del estrés debido a las propiedades crioprotectoras del GABA.

Estrés por inundación

Uno de los principales problemas para las plantas situadas en suelos inundados es la limitación de oxígeno (Subbaiah y Sachs, 2003). Los gases como el oxígeno difunden muy lentamente en agua, y como consecuencia puede disminuir el oxígeno intracelular disponible hasta límites de inhibición en la respiración aeróbica (Gibbs y Greenway, 2003). Un mecanismo de adaptación de las plantas al estrés por inundación es la activación del metabolismo anaeróbico (Kennedy y col., 1992), que va a provocar la inhibición del crecimiento en tallo y raíz (Vartapetian y Jackson, 1997). Las especies del género *Populus* son susceptibles a inundaciones debido a que habitualmente se cultiva en las áreas cercanas a los ríos. En este estudio, el suelo de las plantas de *P. tremula* x *P. alba* se inundó durante 72h. Tras el tratamiento se observó una disminución significativa en el crecimiento en altura de las plantas tratadas frente a las plantas controles (Fig. 3). Inhibiciones en el crecimiento bajo este tipo de estrés también se han registrado en plántulas de otras especies como en maíz (Subbaiah y Sachs, 2003) y melón (Wang y col., 2014).

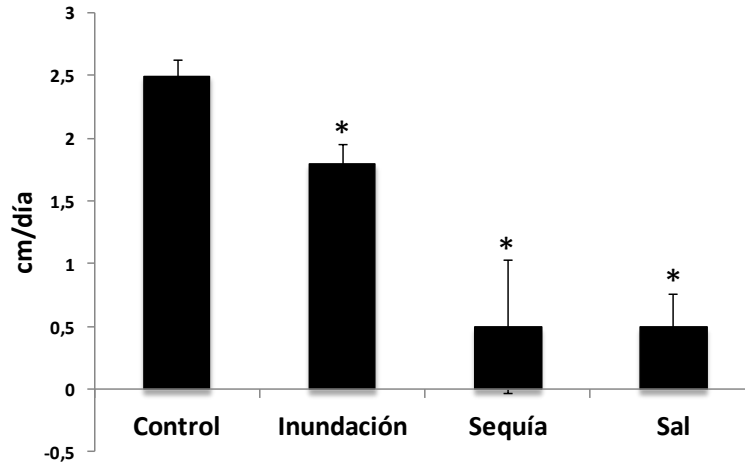


Figura 3. Crecimiento en altura de plantas sometidas a estrés por inundación, por sequía y por sal. Los datos se tomaron a las 24h del inicio de los tratamientos. Los datos representados corresponden a la media del crecimiento (cm/día) de al menos tres réplicas biológicas. Se marca con asterisco los resultados significativos con respecto al control (valor $p < 0,05$; ANOVA).

En la interrupción del metabolismo aeróbico y la activación del metabolismo fermentativo se induce la alcohol deshidrogenasa (ADH), permitiendo la regeneración del NAD^+ mediante el paso de acetaldehído a etanol (Dolferus y col., 1994) para el funcionamiento de la glucólisis. Por ello, en este trabajo se utilizó *ADH* como gen marcador (*Potri.002G072100*). Los resultados mostraron un aumento en la expresión de *ADH* a las 8 y 72h en tallo y raíz, posiblemente como consecuencia de la activación del metabolismo fermentativo, en cambio en hojas no se observó cambios de expresión durante el tratamiento (Fig. 4). Estos resultados cuadran con estudios previos en *Populus* dónde tampoco se han observado cambios en la expresión de *ADH* en hojas durante estrés por hipoxia, aunque sí detectaron cambios metabólicos debido a la activación del metabolismo fermentativo (Kreuzwieser y col., 2009). Los cambios metabólicos se deben a que, a pesar de que la raíz es el principal órgano afectado por la inundación del suelo, se establece comunicación entre este órgano y la parte aérea de la planta afectando a nivel metabólico a la parte aérea (Jackson y col., 1996). Estudios realizados en otras especies han mostrado que en condiciones de hipoxia también aumentan los niveles de mensajeros *ADH* en raíces de *Arabidopsis* tras 8h de tratamiento (Miyashita y Good, 2008) y en raíz y tallo de maíz (Andrews y col., 1993).

Nuestros datos ponen de manifiesto que las plantas del híbrido muestran una respuesta fenotípica y molecular relacionada con el metabolismo fermentativo derivado del estrés por inundación, siendo esta más evidente en raíces y tallo que en hojas.

Expresión relativa de los genes *PtaGAD* y de los genes implicados en el metabolismo de GABA como consecuencia de la inundación de las plantas

En general, la familia *PtaGAD* presentó diferentes patrones de expresión en los tiempos y muestras analizadas bajo este estrés (Fig. 4). *PtaGAD5* fue el gen que mostró mayores cambios significativos en respuesta al tratamiento de inundación. Al igual que se ha descrito para *ADH*, se observó un aumento de los niveles de mensajeros a las 8h y 72h en tallo y raíz. Esta respuesta concuerda con los resultados publicados en *Arabidopsis* sobre el gen *AtGAD4* que también aumenta su expresión en raíces por hipoxia mostrando los máximos niveles de mensajeros tras 8h de tratamiento (Miyashita y Good, 2008). Los genes *PtaGAD3* y *PtaGAD5* mostraron un patrón de expresión muy parecido en tallo y raíz, aunque el aumento de los mensajeros de *PtaGAD3* respecto al control fue de menor intensidad que para *PtaGAD5*. Los niveles de transcritos de los genes *PtaGAD3*, *PtaGAD5* y *ADH* presentaron picos de inducción (8h y 72h) y bajadas (24h) en los tiempos ensayados. La presencia de picos de expresión de los *GAD* y en los niveles de GABA también se han descrito previamente en arroz durante su germinación (Narsai y col., 2009). Estos resultados indican que *PtaGAD3* y *PtaGAD5* pueden ser las principales responsables de la producción de GABA en el híbrido durante el estrés por inundación.

Al contrario que la expresión de los genes anteriores, los niveles de mensajeros de *PtaGAD2* disminuyeron en raíces de plantas anegadas (Fig. 4). En *Arabidopsis*, el gen *AtGAD2* también presenta un comportamiento similar en raíces tratadas con bajas concentraciones de oxígeno (Miyashita y Good, 2008). Los patrones de expresión de *PtaGAD2* y *PtaGAD5* en tallo durante la inundación son opuestos, lo que indica que se encuentran bajo mecanismos de regulación diferentes. Patrones opuestos de expresión también se observaron con sus posibles ortólogos *AtGAD2* y *AtGAD4* en raíces de *Arabidopsis* expuestas a hipoxia, observándose que a medida que aumentan los niveles de mensajeros de *AtGAD4* van disminuyendo los de *AtGAD2* (Miyashita y Good, 2008).

PtaGAD1 mostró un patrón de expresión similar a *PtaGAD2* en tallo y además fue el único gen de la familia génica *GAD* que aumentó sus mensajeros de manera general en hojas frente al estrés por inundación (Fig. 4). En condiciones normales, *PtaGAD1* presenta altos niveles de mensajeros en mesófilo de las hojas comparada con otros genes *GAD*, sugiriendo que participa en procesos específicos de tejidos verdes como la regulación del flujo iónico durante el movimiento estomático (Capítulo 3). En

inundación se produce el cierre estomático debido al aumento de ABA (Zhang y Davies, 1987) ó por la pérdida de la conductividad del agua en raíces que provoca un déficit de agua en hojas (Else y col., 2001). *PtaGAD1* presenta varios elementos de respuesta a ABA en su promotor (Capítulo 3), por lo que el aumento de expresión en hojas provocado por déficit de agua podría ser en respuesta a esta fitohormona.

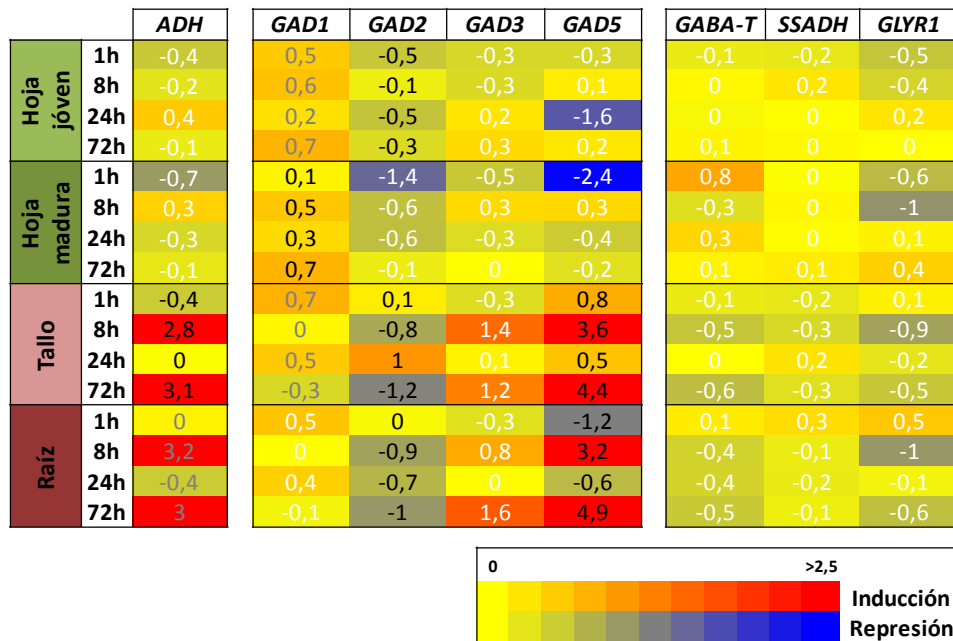


Figura 4. Niveles de mensajeros de los genes *PtaGADs*, de los genes implicados en el metabolismo del GABA y de la alcohol deshidrogenasa (*ADH*) en plantas *P. tremula x P. alba* sometidas a estrés por inundación. Los valores fueron obtenidos con el mismo procedimiento que para la figura 1. Todos los resultados de expresión fueron normalizados previamente con tres genes de referencia. En negro se muestran los valores con un p-valor menor de 0,05 (ANOVA de dos vías), en gris los de un p-valor menor de 0,1 y en blanco aquellos que muestran un p-valor mayor de 0,1. GAD, glutamato decarboxilasa; GABA-T, gaba transaminasa; SSADH, semialdehído succínico deshidrogenasa; GLYR1, glioxilato reductasa 1.

De la misma forma que en otros tipos de estrés, el contenido en GABA aumenta en condiciones de hipoxia o anoxia (Wang y col., 2014; Yang y col., 2013; Shelp y col., 2012d) por lo que puede considerarse como una fuente de nitrógeno y/o carbono para apoyar el crecimiento vegetal bajo deficiencia de oxígeno (Miyashita y Good, 2008; Shelp y col., 2012d). A su vez, su síntesis puede responder a la necesidad de combatir la acidosis citosólica provocada por la inundación de suelos (Roberts y col., 1984; Aurisano y col., 1995) por la implicación de la GAD en el control del pH (revisado en Kinnersley y Turano, 2000).

En este estudio, el análisis de la expresión del gen *GABA-T* en estas condiciones mostró una tendencia general de represión especialmente en tallo y raíz, dónde se produjeron los cambios más importantes por la limitación de oxígeno (Fig. 4). Miyashita y Good (2008) obtuvieron resultados similares para el gen *GABA-T* ya que disminuía su expresión en raíces de *Arabidopsis* en hipoxia. La disminución del pH provocado por el estrés favorece la actividad GAD, aunque no la del resto de enzimas del GABA shunt que presentan su máxima actividad a pH básico. No obstante, la síntesis de alanina en hipoxia aumenta. En *Arabidopsis* se sugiere que ésta alanina procede principalmente de la reacción catalizada por la GABA-T (Miyashita y col., 2007). En cambio, experimentos realizados en *Lotus japonicus* muestran que esta alanina también puede proceder de la alanina aminotransferasa (AlaAT) (Rocha y col., 2010). Por otro lado, se muestra un aumento en los niveles de succinato durante tratamientos de inundación de raíces (Rocha y col., 2010). Este succinato procede de rutas diferentes al GABA shunt debido a que altas concentraciones de NADH en condiciones de anoxia inhiben la actividad SSADH (Busch y Fromm, 1999). No se observaron grandes cambios en los niveles de mensajeros del gen *SSADH* durante el estrés (Fig. 4). El patrón de expresión de *SSADH* en tallo y raíz fue similar al observado durante la germinación de arroz en anoxia, aumentando levemente los mensajeros a las 3h y disminuyendo paulatinamente hasta el final de tratamiento (Shelp y col., 2012d). Como consecuencia de la inhibición de la actividad SSADH durante el estrés se produce la acumulación de semialdehído succínico (SSA), producto de la actividad GABA-T. La acumulación de SSA puede provocar el incremento de ROI (Ludewig y col., 2008), pero también puede reaccionar con el ADN y oxidar lípidos de membrana provocando problemas celulares y de desarrollo (Kotchoni y col., 2006). La acumulación de SSA puede evitarse mediante su reducción a ácido gamma-hidroxi-butírico GHB por la glioxilato reductasa (GLYR) consumiendo NADPH (Breitkreuz y col., 2003). En *Arabidopsis* se han identificado dos GLYRs: GLYR1, de localización citosólica, y GLYR2, plastídica (Allan y col., 2009). En este trabajo se analizó la expresión de *GLYR1* ya que los órganos no fotosintéticos son los más susceptibles a los tratamientos de bajas concentraciones de oxígeno. En general, los niveles de mensajeros de *GLYR1* en *Populus* disminuyeron en todos los tejidos, aunque se observa un leve aumento de sus mensajeros en raíz (Fig. 4). Estos resultados concuerdan con los observados en *Arabidopsis* dónde el gen *GLYR1* presenta una respuesta similar, con un aumento leve de transcritos a las primeras horas de tratamiento y después una disminución (Shelp y

col., 2012d), en cambio en otro trabajo se ha observado que sí que aumentan los transcritos de *GLYR1* y los niveles de GHB en anoxia (Allan y col., 2012).

En resumen, la inundación de las raíces del híbrido induce el aumento de los mensajeros del gen *PtGAD1* en hojas posiblemente en respuesta a ABA. En raíces y tallo aumenta los niveles de los mensajeros de *PtaGAD3* y *PtaGAD5*, sugiriendo que las proteínas codificadas por estos genes son las principales responsables de la producción de GABA en respuesta al estrés por inundación. La síntesis de GABA por estas GADs puede ayudar a disminuir el pH citosólico y de esta manera mitigar los efectos del estrés. El resto de genes del GABA shunt no mostraron cambios significativos en los niveles de sus mensajeros. Las enzimas del GABA shunt se ven afectadas por el estrés, aunque estudios previos sugieren que la GABA-T puede sintetizar SSA y alanina a partir de GABA y piruvato. En condiciones limitantes de oxígeno la actividad SSADH se inhibe. En este caso la GLYR puede ser la responsable de la reducción del SSA a GHB, aunque en este estudio no se observaron aumentos en los niveles de mensajeros del gen *GLYR*.

Estrés por sequía

Una respuesta primaria de plantas sometidas a estrés por sequía es la detención del crecimiento. En nuestro trabajo se observó una reducción drástica en el crecimiento tras 72h de tratamiento (Fig. 3). En otras especies, como en sésamo, se ha descrito que también se produce una parada del crecimiento del tallo y de la raíz (Bor y col. 2009). Esta inhibición del crecimiento en condiciones de sequía se debe a que se reduce las demandas metabólicas de la planta y moviliza metabolitos para la síntesis de compuestos de protección necesarios para el ajuste osmótico (Bharvaga y Sawant, 2013).

Para validar la respuesta molecular específica frente a sequía, se midió la expresión del gen marcador *XERICO* (*Potri.014G170400*). *XERICO* codifica para una proteína pequeña con un dominio transmembrana en el N-terminal y un motivo dedo de zinc (RING H2) situado en el C-terminal, que se induce en tratamientos que conllevan un estrés osmótico (Ko y col., 2006). Los resultados mostraron un fuerte aumento en los niveles de mensajeros de *XERICO* en todas las muestras del híbrido y a todos los tiempos durante el tratamiento de sequía (Fig. 5A). Una respuesta similar se ha observado en *Arabidopsis* (Ko y col., 2006) y *Populus* (Cohen y col., 2010) en sequía.

Niveles de mensajeros relativos de los genes del GABA shunt en sequía: *GAD*, *GABA-T* y *SSADH*

En estrés por sequía se induce la biosíntesis de ABA (Shinozaki y Yamaguchi, 2000) y se produce cambios en la expresión génica regulados por la hormona (Shinozaki y Yamaguchi, 1997). Se han descrito dos rutas que permiten la expresión de genes en respuesta a ABA mediante, 1) la unión de factores de transcripción bZIP que se unen a elementos de respuesta a ABA, denominados elementos ABRE, que poseen un núcleo G-box con una secuencia consenso ACGT (Ueno y col., 2000) y, 2) las proteínas MYC y MYB que interactúan con los elementos MYCR/MYBR y que se han encontrado en promotores de genes de respuesta a deshidratación como RD22 (Abe y col., 1997). En genes *GAD* de naranjo cuya expresión aumenta en respuesta a ABA (Zhuang y col., 2010; Liu y col., 2014) se ha detectado la presencia de varias cajas de respuesta de ABA en sus promotores (Liu y col., 2014). El análisis *in silico* de las secuencias promotoras de los genes *PtGAD* reveló que, *PtGAD1* es el gen que posee más elementos tipo ABRE (3 elementos), aunque los genes *PtGAD5* y *PtGAD2* también presentan este elemento (2 y 1 elemento respectivamente) (Capítulo 3). Además, *PtGAD1* y *PtGAD2* poseen un posible elemento MYCRD22 y *PtGAD5* un elemento MYBRD22. Estos resultados sugieren que *a priori* *PtGAD1*, *PtGAD2* y *PtGAD5* podrían presentar una respuesta a estrés hídrico dependiente de ABA.

PtaGAD1 fue el gen *PtaGAD* que presentó la mayor inducción en los niveles de mensajeros en sequía (Fig. 5A). *PtaGAD1* aumento sus mensajeros paulatinamente durante el tratamiento. El patrón de expresión de *PtaGAD1* durante el tratamiento de sequía fue muy similar al que sigue un gen *GAD* (*ZmGAD1*) de maíz cuando se inyecta ABA a la planta (Zhuang y col., 2010). Además *ZmGAD1*, al igual que *PtaGAD1*, presenta en su secuencia promotora posibles elementos *cis* ABRE (Zhuang y col., 2010), de respuesta a fitohormonas como el ABA. Estos resultados apoyan la existencia de una posible regulación transcripcional de *PtaGAD1* por ABA, y por lo tanto la inducción de sus mensajeros en sequía debido a las altas concentraciones de la fitohormona.

PtaGAD1 se postula como la responsable principal de la producción de GABA en hojas, cuya función puede estar relacionada con la regulación del transporte iónico en las células guardas del estoma en condiciones normales de crecimiento (Capítulo 3). En condiciones de déficit de agua, una de las primeras respuestas que se producen es el cierre de estomas (Schroeder y col., 2001), proceso regulado por ABA (Zhang y col.,

1987; Daszkowska-Golec y Szarejko, 2013). La disminución de GABA en la planta como consecuencia del silenciamiento de genes GADs en *Arabidopsis* también provoca una alteración en el flujo iónico de las plantas y como consecuencia alteraciones tanto en el cierre estomático como en el número de estomas (Worku, 2012). Teniendo en cuenta estos resultados, PtaGAD1, regulada por ABA, podría ser la responsable de la producción de GABA en hojas para la regulación del movimiento estomático durante el estrés hídrico.

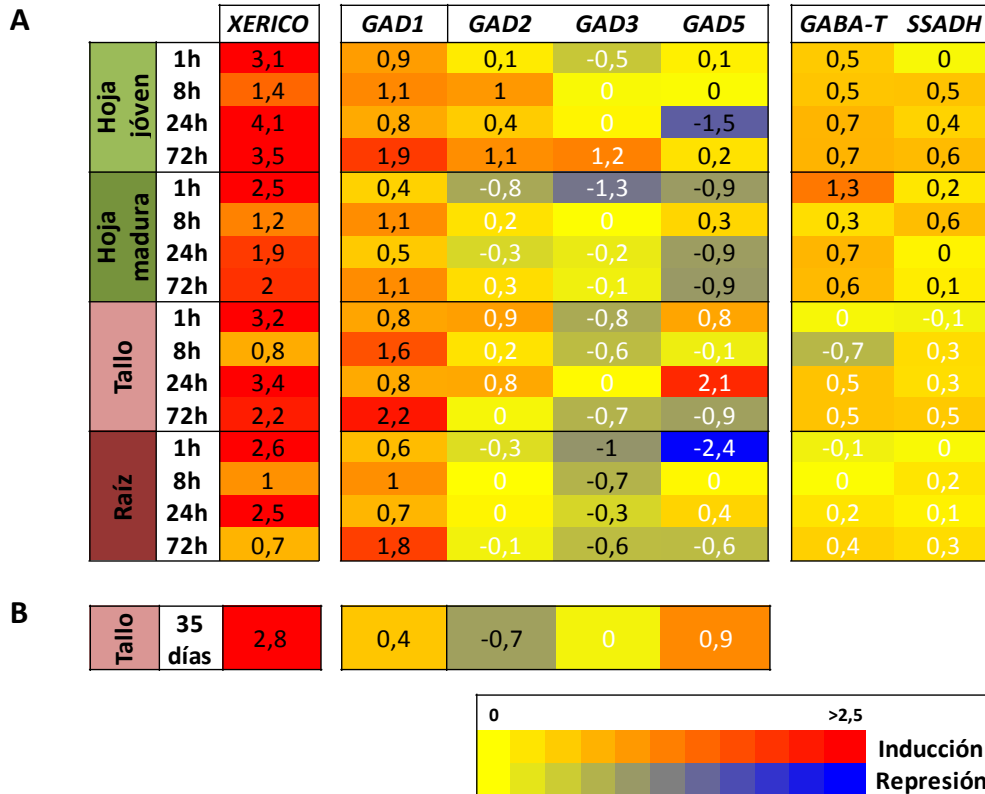


Figura 5. Mapa de calor de los niveles de mensajeros relativos de los genes del GABA shunt en plantas de *P. tremula* x *P. alba* sometidas a estrés por sequía a corto y largo plazo. A) Niveles de mensajeros relativos de *XERICO* y de los genes del GABA shunt a corto plazo (72h) y B) a largo plazo (35 días). Los datos de expresión de largo plazo corresponden a la media de tres réplicas biológicas. Los datos fueron tratados como se explica en la figura 1. En negro se muestran los valores con un p-valor menor de 0,05 (ANOVA de dos vías), en gris los de un p-valor menor de 0,1 y en blanco aquellos que muestran un p-valor mayor de 0,1. GAD, glutamato decarboxilasa; GABA-T, GABA transaminasa; SSADH, semialdehído succínico deshidrogenasa.

Los resultados obtenidos para *PtaGAD2* en hojas jóvenes son muy similares a los de *PtaGAD1*, la tendencia de sus mensajeros fue aumentar frente a sequía (Fig. 5A). Por el contrario, el patrón de expresión de *PtaGAD1* y *PtaGAD2* en el resto de muestras fue diferente. En tallo ambos genes mostraron tanto a corto como a largo plazo patrones de expresión diferentes, observándose una inducción de la expresión de *PtaGAD1*

mientras que se observó una represión en la expresión de *PtaGAD2* (Fig. 5B). Estos resultados indican que ambos genes poseen diferentes mecanismos de regulación transcripcional, al menos en respuestas a largo plazo en condiciones de sequía.

El gen *PtaGAD5* mostró un aumento en los niveles de mensajeros en tallo tanto a corto (72h) (Fig. 5A) como a largo plazo (35 días) (Fig. 5B) en tratamientos de sequía. Estos resultados concuerdan con los mostrados en *Arabidopsis* donde *AtGAD4* aumenta su expresión en tallo y en raíz por sequía (Shelp y col., 2012d). Además, Urano y col. (2009) describen que *AtGAD4* es un gen clave en el GABA shunt en estrés por deshidratación y su expresión fue mayor en transgénicos deficientes de una proteína clave para la biosíntesis de ABA, por lo que se considera que este gen puede ser ABA-independiente (Urano y col., 2009).

Los genes *GABA-T* y *SSADH* aumentaron sus niveles de mensajeros en sequía especialmente en hojas (Fig. 5A). Aunque en otras especies no se han observado cambios de estos genes en tratamientos de sequía (Shelp y col. 2012d) sí se observó un aumento de los niveles de succinato (Urano y col., 2009), siendo por lo tanto coherente el aumento de la expresión de los genes encargados del catabolismo del GABA. El incremento del GABA shunt podría deberse a la acumulación de GABA. Como han mostrado los datos de expresión, los *PtaGADs* aumentan su expresión en sequía, pero además durante estreses abióticos se va a producir un aumento de los niveles de Ca^{+2} que van a estimular la actividad GAD a través de calmodulina provocando la síntesis de GABA (Bouche y Fromm, 2004).

Estrés por sal

Sobre el 20% de los cultivos de regadío sufren estrés por salinidad (Flowers y Yeo, 1995). Al igual que en sequía, los tratamientos salinos en plantas van a disparar diversas respuestas como la inhibición del crecimiento del tallo (Zhu y col., 2001; Chaves y col., 2003; Zhang y col., 2011). En este trabajo las plantas del híbrido regadas con 300 mM de cloruro sódico inhibieron su crecimiento significativamente tras 72h de tratamiento (Fig. 3). Este efecto también se ha observado en experimentos similares en sésamo (Bor y col., 2009), soja (Yin y col., 2014), y tabaco (Zhang y col., 2011).

Para verificar la respuesta molecular al estrés por sal se midió la expresión del ortólogo *ATAF1* de *Arabidopsis* en *Populus* (*Potri.002G081000*), un factor de transcripción de la familia NAC que se ha relacionado con la tolerancia a estrés salino en plantas (Wu y col., 2009). En este trabajo se observó aumento en la expresión de

ATAF1 en todos los órganos de plantas tratadas, siendo superior en tallo (Fig. 6). Estos resultados muestran que las plantas de *P. tremula* x *P. alba* presentaron una respuesta fenotípica y molecular típica al estrés salino.

Niveles de mensajeros relativos de los genes del GABA shunt en estrés por sal

.Las plantas poseen una respuesta similar en sal y sequía debido a que el tratamiento de sal además de provocar un estrés iónico al competir directamente por la captación del ión potasio, también genera un ambiente hipertónico en el que se provoca deshidratación celular. Ambos tratamientos generan un déficit de agua en la planta induciéndose respuestas similares para tolerar dichos estreses (Zhu y col., 2001).

PtaGAD1 fue el único gen de la familia que mostró un aumento significativo de sus mensajeros en todas las muestras analizadas durante estrés salino (Fig. 6A), sugiriendo que éste puede ser el gen responsable de la mayor parte de la producción de GABA durante el estrés. El aumento de los niveles de mensajeros de *PtaGAD1* también en tratamientos de sal apoya la hipótesis que puede estar regulado por ABA, ya que como se ha mencionado anteriormente la cascada de señalización que siguen para tolerar o revertir el estrés son muy similares.

El resto de genes *PtaGAD* no mostraron inducciones de sus mensajeros tan claras. *PtaGAD2* aumentó su expresión en hojas jóvenes y tallo durante tratamientos salinos (Fig. 6A). Este resultado es similar a la expresión de *AtGAD2* en *Arabidopsis*, aunque los autores proponen que este aumento en el nivel de transcritos no es una respuesta específica a sal ya que no responde a diferentes concentraciones de NaCl, sino que podría tener un papel en el ajuste del metabolismo del nitrógeno durante los tratamientos salinos (Renault y col., 2010).

PtaGAD5 disminuyó sus mensajeros respecto a los controles en la mayoría de los órganos excepto en el tallo, en el que mostró una inducción a las 8 y 24h del tratamiento de sal (Fig. 6A). Su posible ortólogo *AtGAD4* también aumentó sus mensajeros por la presencia de NaCl (Renault y col., 2010).

PtaGAD3 disminuye sus mensajeros en todos los órganos al igual que ocurría en tratamientos de sequía (Fig. 6A). El gen cuya expresión es mayoritaria en raíz de *Arabidopsis* (*AtGAD1*), también disminuyó su expresión en estrés salino (Renault y col., 2010). Estos resultados sugieren que la expresión de *PtaGAD3* se ve afectada en los estreses que conllevan una deshidratación celular.

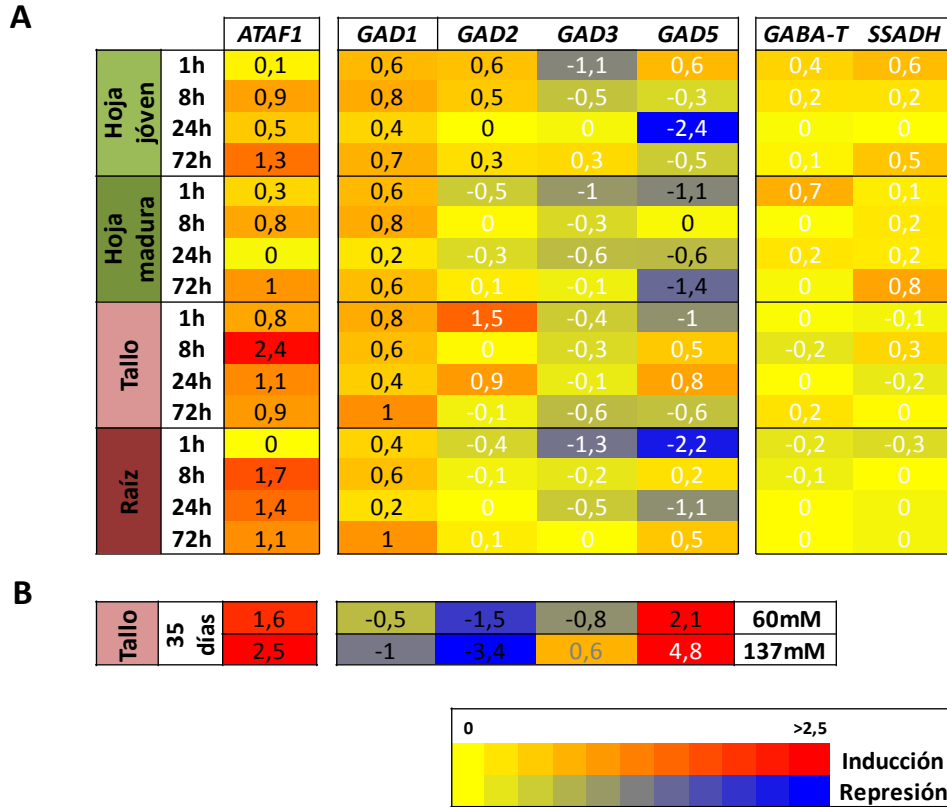


Figura 6. Mapa de calor de los niveles de mensajeros relativos de los genes del GABA shunt en las diferentes muestras de las plantas de *P. tremula x P. alba* sometidas a estrés por sal a corto y largo plazo. A) Niveles de mensajeros relativos del marcador de sal, ATAF1 y de los genes del GABA shunt en estrés por sal (300 mM de NaCl) a corto plazo (72h) y B) a largo plazo (35 días) a las concentraciones de 60 mM y 137 mM de NaCl de los genes GAD. Los datos fueron tratados como se explica en la figura 1. En negro se muestran los valores con un p-valor menor de 0,05 (ANOVA de dos vías), en gris los de un p-valor menor de 0,1 y en blanco aquellos que muestran un p-valor mayor de 0,1. GAD, glutamato decarboxilasa; GABA-T, GABA transaminasa; SSADH, semialdehído succínico deshidrogenasa;

Mutantes en GABA-T son muy sensibles al estrés por sal lo que da una idea de la relevancia del metabolismo del GABA en estas condiciones (Renault y col., 2010). En este estudio se observó leves inducciones en los niveles de los mensajeros del gen *GABA-T* en tratamiento con sal (Fig. 6A) al igual que se ha descrito por Zhang y col. (2011). En *Arabidopsis* se ha registrado inducciones sutiles en los mensajeros de *GABA-T* y *SSADH* en tallo y raíz (Shelp y col., 2012d; Renault y col., 2010). Los resultados sugieren la importancia de la coordinación del funcionamiento de *GABA-T* y *SSADH* para evitar que se produzca la acumulación de SSA debido a su alta toxicidad. El buen funcionamiento del GABA shunt durante condiciones estresantes va a ser primordial para evitar que se produzca la acumulación de aminoácidos, de moléculas tóxicas o que

se altere el balance redox, además siendo necesario el catabolismo de GABA para el balance C/N para tolerar el estrés (Renault y col., 2010).

Expresión relativa de los genes del GABA shunt en tallo de *P. tremula* x *P. alba* en estrés por sal a diferentes concentraciones a largo plazo

Para observar si el tiempo del tratamiento y la concentración de sal influyen en la expresión de los genes del GABA shunt, se realizó un experimento a diferentes concentraciones de sal y diferentes tiempos. Al igual que en los tratamientos de sequía a largo plazo, sólo se tuvo en cuenta el tallo de las plantas debido al interés económico de la madera de *Populus*. Akcay y col. (2012) observaron que tanto a corto (24h) como a largo plazo (21 días) se produce la acumulación de GABA en plantas de tabaco frente a estrés salino. En nuestros experimentos se utilizaron soluciones con concentraciones de NaCl menores (60 y 137 mM) que la ensayada a corto plazo (300 mM), para que las plantas no se vieran demasiado afectadas al final del tratamiento.

Los resultados mostraron que *PtaGAD1*, cuya expresión aumentó en tallo frente a estrés por sal a corto plazo, presenta una disminución de expresión a largo plazo respecto al control a 60 y 137 mM de NaCl (Fig. 6B). Igual ocurre con *PtaGAD2*, que experimenta una mayor inhibición de expresión que *PtaGAD1*. En cambio, *PtaGAD3*, que no mostró un aumento de sus mensajeros frente a estrés por sal en el tratamiento de 72h, sí muestra un aumento de expresión después de 5 semanas a la concentración de 137mM NaCl respecto al tratamiento control. Estos datos indican que *PtaGAD1* y *PtaGAD2* sólo responden a estrés a corto plazo, en cambio *PtaGAD3* responde dependiendo de la intensidad del estrés.

PtaGAD5 es el único que aumenta su expresión en tallo en tratamientos de sal tanto a corto como a largo plazo, siendo su expresión superior después de 5 semanas de tratamiento y mostrando una expresión dependiente de la dosis (Fig. 6B). En *Arabidopsis*, la expresión de *AtGAD4* también se ha descrito como dependiente de la dosis en estrés salino (Renault y col., 2010).

Conclusiones

Los estreses abióticos alteran los patrones de expresión de los genes GADs de *P. tremula* x *P. alba*. La respuesta de estos genes va a depender del tipo y la duración del estrés. Se ha observado que *PtaGAD1* se induce principalmente en los estreses abióticos que provocan deshidratación celular (frío, inundación, sal y sequía). *PtaGAD1* es

también el que presenta más elementos de respuesta a ABA en su promotor. Teniendo en cuenta que los estreses abióticos que provocan deshidratación disparan la producción de ABA, los cambios en expresión del gen *PtaGAD1* pueden estar mediados por ABA en las situaciones estudiadas en este trabajo. *PtaGAD2* se postula como uno de los genes más susceptibles a estrés por temperatura, aunque su respuesta es diferente en estrés por calor, donde disminuye su expresión, y en estrés por frío donde aumentan sus niveles de mensajeros. En nuestro estudio, sólo se muestra inducciones de la expresión de *PtaGAD2* en algunos estreses y órganos a corto plazo, inhibiéndose a largo plazo, lo que sugiere que *PtaGAD2* podría activarse como consecuencia de los cambios metabólicos producidos en respuesta al estrés abiótico y, por tanto no estaría implicado en la producción directa de GABA con el fin de mitigar los efectos del estrés. El gen *PtaGAD3* inhibe su expresión en diferentes tipos de estrés como calor, sequía y sal. En cambio, en frío y en inundaciones aumenta su expresión en los tejidos más afectados por el estrés. Su patrón de expresión fue diferente al resto de los genes *PtaGAD* ante los diferentes tipos de estrés abióticos sugiriendo que presenta un mecanismo de regulación distinto. *PtaGAD5* presenta una respuesta muy similar en la mayoría de los tratamientos ensayados, aumentando su expresión casi exclusivamente en tallo. La proteína codificada por este gen se propuso en el capítulo 3 que podría cumplir una función similar a *AtGAD4* que se ha descrito en varios trabajos como el gen GAD de respuesta a la mayoría de los estreses medioambientales. Así en base a estos resultados se sugiere que *PtaGAD5* es ortólogo de *AtGAD4*, aunque durante la evolución ha podido adquirir nuevos elementos en su promotor que le han proporcionado una respuesta más específica en tallo frente a condiciones adversas.

Capítulo 6

General conclusions

1. Poplar *GAD* gene family comprises six genes, and they are apparently functional since the key residues to perform catalysis are conserved in all of them. The six *GADs* are potentially regulated by calcium because they possess the key residues and features described for functional CaMBDs.
2. Phylogenetic studies show that poplar *GAD* gene family has suffered duplication and specialization events during evolution. These results, together with the different transcript patterns observed for each *GAD* gene in poplar, indicate that these genes can perform different functions in poplar.
3. Essential residues described in functional CaMBDs of plant *GADs* are conserved in a *GAD* of the ancient member of vascular plant *Selaginella moellendorffii*, and absent in *GADs* of non-vascular plants suggesting that regulation of *GAD* by Ca^{2+} /CaM was also shaped as well as the complex calcium signalling network during the concomitant evolution of vascular tissue and land plant colonization.
4. *GAD* expression is shifted during the differentiation of vascular tissues associated with the production of reaction wood, and it shows similar expression pattern to tension *ACO* gene suggesting the existence of a cross-talk between GABA and ethylene in vascular development in poplar. Possible functions of *GAD* in vascular development could be related to the recovery of ammonia produced during lignin synthesis and to generate a signal derived from Ca^{2+} influx and acidification produced by vacuolar collapse during cell death of xylem cells.
5. GABA signal is located on differentiating vascular tissue and radial parenchyma, as recently published in pine, supporting the hypothesis that GABA is involved in xylogenesis and transport communicating different tissues and organs.
6. The high *PtaGAD1* expression in xylem suggests that this gene might participate in the development of vascular tissue. In addition, *PtaGAD1* has a relatively high number of light-responsive elements in its promoter and high expression in mesophyll and leaf ribs suggesting an additional role to vascular development in photosynthetic tissues. The presence of several putative ABA response *cis*-elements in the *PtaGAD1* promoter and its induction in response to salt and drought suggest that *PtaGAD1* might be involved in responses mediated by ABA to abiotic stresses that cause cell dehydration.

7. In roots, *PtaGAD1* expression is correlated with the expression of genes involved in primary nitrogen assimilation supporting its participation in root nitrogen metabolism.
8. *PtaGAD2* expression is high in xylem, in petioles and leaf ribs. Additionally, *cis* elements that induce expression in xylem are found in its promoter. Thus, *PtaGAD2* might be involved in vascular differentiation in poplar.
9. Glutamate and GABA treatments cause changes in root architecture in poplar. GABA treatments increase the density of secondary roots, and glutamate has a positive effect on the growth in length in the main root. Related treatments do not have relevant effects in the development of the root in other species (e.g. *Arabidopsis*), suggesting that poplar roots are more susceptible to signals mediated by GABA and glutamate.
10. *PtaGAD3* is preferentially expressed in poplar roots, particularly in the elongation region, where the establishment of the vascular system is crucial. The high correlation between the expression of *PtaGAD3* and that of *PtaGAD2* and other genes involved in vascular development (*IDHc* and *PT-AAT*) suggest the involvement of *PtaGAD3* in root vascular development.
11. *PtaGAD5* is expressed at very low levels under normal growth conditions, but it is up-regulated in certain organs (especially in stem and root) under abiotic stresses such as heat, flooding, salt and drought, including long-term responses to salt and drought stresses, and to salt stresses in a doses dependent manner. Additionally, phylogenetic studies suggest that *PtaGAD5* is an orthologue of *AtGAD4*, which is involved in response to abiotic stresses. Altogether, these facts suggest that *PtaGAD5* is involved in abiotic stress response in poplar.

Capítulo 7

Summaries of the chapters

(Este capítulo fue realizado en inglés en base a la normativa para obtener el título de doctor con mención internacional)

Chapter 1 (General introduction)

Glutamate decarboxylase (GAD) is a cytosolic enzyme catalyzing the decarboxylation of glutamate to produce GABA and CO₂ by consumption of protons. The activity of plant GAD is induced by pH and/or by Ca²⁺-calmodulin (CaM) binding (Crawford et al., 1994; Arazi et al., 1995; Bouche and Fromm, 2004.). A high GAD activity is registered at acidic pH (5.8) without Ca²⁺/CaM, but its activity may increase at acid pH in the presence of Ca²⁺/CaM. Ca²⁺/CaM is essential for the increase in GAD activity at neutral pH (Snedden et al., 1996).

Although two GAD isoforms (65 and 67 kDa) have been described in animals (Ueno et al., 2012), just an isoform (42-63 kDa) has been identified in plants (Shelp et al., 2012a). All GAD sequences share a central domain involved in catalysis and interaction with the cofactor, pyridoxal 5-phosphate (PLP). Thus, PLP-domain is very well conserved and has several residues involved in substrate or cofactor binding (Sukhareva and Mamaeva, 2002). In addition, most plant GAD sequences also contain a less conserved CaM-binding domain (CaMBD) at the carboxyl terminal that mediates calcium regulation of the activity and is absent in animal GAD sequences (Molina-Rueda et al., 2010). CaMBD works as an auto-inhibitory domain of about 28 residues, with conserved residues including flanking lysines at each edge of the domain and a tryptophan in a central region. The tryptophan and the lysines closest to the C-terminus are required for the Ca²⁺/CaM binding (Baum et al., 1996; Arazi et al., 1995; Molina-Rueda et al., 2010).

Unlike animal GADs, plant GADs are encoded by a variable number of genes (Shukareva and Mamaeva, 2002) varying from just one gene found in the *Aquilegia coerulea* genome to ten in the *Glycine max* genome. The presence of several GAD genes in each family suggests that gene specializations have occurred during plant evolution. Despite the specializations and duplications within each GAD family, phylogenetic studies show potential orthologs between angiosperm GADs. The acquisition of CaMBD in GAD plants and the consequent regulation by Ca²⁺ was an early event in the evolution of plants since it is present in *Selaginella moellendorffii*, which belongs to phylum *Lycopodiophyta*, an ancient group of vascular plants whose origins can be traced back as far as 400 million years ago.

GADs expression in plants varies between different organs. In general, within each family certain GAD genes show high transcripts levels in the whole plant, while

others have tissue-specific expression or show nearly undetectable transcript levels being their expressions associated with flowers or fruits. GAD gene family of *Arabidopsis* is a good example since five GAD genes have been identified in its genome, being GAD1 the majority in root, while GAD2 show a constitutive expression. The others three GADs are expressed at very low levels in normal growth conditions and their highest expression level are detected in flowers and siliques (Miyashita and Good, 2008). Furthermore, expression of some GAD genes has been linked to specific physiological processes as seed germination (Hyun et al., 2013) or fruit ripening (Akihiro et al., 2008). For example, tomato has three GAD genes, two of them show a similar expression patterns and it is in good accordance with the respective changes of GABA contents in fruits. To date, most studies of GADs expression have been developed in herbaceous plants, but recently some studies have been completed in trees. For example, three GADs genes have been reported in the apple tree genome, and they showed different expression patterns, with special interest in the expression of these genes in fruit (Shelp et al., 2013). Furthermore, our research group found that expression of a pine GAD gene rise during hypocotyl lignification, and that its expression change in response to the production of reaction wood (Molina- Rueda *et al.*, 2010).

Numerous reports over many years have shown that GABA rapidly accumulates in plant tissues exposed to a variety of different stresses (Kinnersley and Turano, 2000), and these increases correlate with alterations in *GAD* expression. The response of *GAD* genes differ across species depending on the type of stress and exposure time (Kinnersley and Turano, 2000). Usually, certain *GAD* genes poorly expressed in normal growth conditions can increase its expression under stress conditions (Miyashita and Good, 2008).

Altering *GAD* expression can cause severe variations in plant development. Thus, transgenic plants overexpressing a truncated GAD form lacking of the autoinhibitory CaMBD show an increase in the GABA/glutamate ratio and an abnormal development of the plant such as short stems in which cortex parenchyma cells fail to elongate.

Furthermore, changes in *GAD* expression have been used for biotechnological purposes. Glutamate can change the organoleptic properties of fruits (Kisaka et al., 2006) and transgenic silencing of *GAD* genes in tomato fruit leads to accumulation of glutamate that induces changes in fruit maturation. Also, transgenic over-expressing

GAD and silencing genes involved in GABA catabolism accumulates GABA in rice grain and the consumption of this product may prevent moderate hypertension in humans due to its role as inhibitory neurotransmitter (Tsuchida et al., 2003).

The reaction catalyzed by GAD is situated in the GABA shunt pathway together with GABA transaminase (GABA-T) and succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH). GABA acts as a bypass connecting the Krebs cycle (carbon metabolism) and nitrogen metabolism, being glutamate the starting substrate and succinate the final product of this shunt. The pathway starts with the decarboxylation of glutamate to produce GABA and CO₂ in the cytosol (Baum et al., 1993; Fait et al., 2008). GABA is then presumably transported to the mitochondria by a GABA permease (GABP), where it is converted to succinic semialdehyde (SSA) by the second enzyme of GABA shunt (GABA-T). Subsequently, SSA is converted either to succinate by SSADH (the last step of GABA shunt). SSADH activity is inhibited under excess NADH being favored the reaction SSA to 4-hydroxybutyrate GHB by glyoxylate reductases (GLYR) (Fait et al., 2007). Reduction of SSA by GLYR is a way to decrease the level of SSA, which present toxic effect due to its reactive aldehyde group, and consume reducing power, which is at high level often under stress conditions.

Additionally, GABA synthesis can also occur via polyamine degradation, putrescine and spermidine (Fait et al, 2008; Shelp et al, 2012b) and possibly by a non-enzymatic reaction from proline under oxidative stress (Signorelli et al., 2015).

GABA is a four carbon non-proteinogenic amino acid. Due to its physico-chemical properties it can participate in various processes in plants (reviewed in Shelp et al., 1999). As zwitterion, GABA may play a role as compatible osmolyte support as it reaches high concentrations (mM) in the cell without apparent toxic effects. GABA can protect and stabilize membranes from freeze damage, exceeding the cryoprotective properties of proline and glycine betaine at the same concentrations (Heber et al., 1971). Furthermore, the ability of GABA as a scavenger of superoxide anion, hydrogen peroxide and singlet oxygen is significantly higher than proline, suggesting a possible role in reducing ROS production in water deficit conditions (Liu et al., 2011). Finally, GABA might participate in the defense response of the plant against attack by phytophagous insects (Ramputh and Bown, 1996).

The presence of GABA transporters, both low affinity (AAP3, PROT1 and PROT2) and high affinity (GAT1), located in the plasma membrane suggests that

GABA can be transported to exert their role in different parts of the plant. Although there are no conclusive studies about existence of GABA receptors, it is believed that GABA can join glutamate receptors and participate in signaling (reviewed in Kinnersley and Turano, 2000; Michaeli y Fromm, 2015). A signaling role for GABA in plants is continuously suggested and discussed (Bouché and Fromm, 2004; Häusler et al., 2014). For example, GABA as signal molecule could regulate the expression of several genes such as *ACC synthase and oxidase* (Kathiresan et al., 1997), *arginine decarboxylase* (Turano et al., 1997), genes encoding nitrate transporters (Beuve et al., 2004), 14-3-3 gene family (Lancien and Roberts, 2006) and genes encoding cell wall-related proteins (Renault et al., 2011). Furthermore, GABA might modulate the ion flux in plants since exogenous GABA treatment causes mineral ion concentration in *Lemna* cells (Kinnersley and Lin, 2000). Recently, it has been reported that GABA modulates Ca^{2+} channels to regulate process such as the proper pollen tube growth in plants (Yu et al., 2014) or stomatal movement (Schroeder and Hagiwara, 1989). Additionally, the presence of GABA in differentiating xylem may be related to its potential role in the regulation of Ca^{2+} , which has an important function during xylogenesis, or acting on the regulation of the expression of cell wall related genes (Molina-Rueda et al., 2015).

The characterization of *GAD* families in woody plants are scarce and, considering the roles described for GAD and GABA in herbaceous and their putative roles in vascular development in pine, the study of the *GAD* gene family in the model tree poplar will presumably reveal helpful information about relevant functions of the gene family in woody species. *Populus tremula x P. alba* has been used as a model-plant in this thesis. *Populus* is a suitable model for study tree species because it has a small genome respect to other trees, the genome sequence is available, it is a fast growing species, easy to propagate vegetatively and susceptible to transform.

Aims of the study

This thesis has focused on the *in silico* characterization and analysis of the relative expression of *GAD* gene family in poplar under different growth conditions. Furthermore, immunolocalization of GABA has been performed in different plant organs. Finally, changes in poplar root architecture in response to various amino acids have been studied.

Consequently, the specific objectives of this study were:

- 1) To study the acquisition of CaMBD in plant GADs.

CAPITULO 7

2) To assign possible functions of *Populus* GADs (*PtaGADs*) under normal growth conditions and under environmental stresses.

3) To analyze the effect of glutamate and GABA in the root architecture of *P. tremula* x *P. alba*.

Chapter 2

γ -aminobutyric acid (GABA) is a non-proteinogenic amino acid widely distributed among living organisms from all kingdoms. Its metabolism has been related to biotic and abiotic stress tolerance in bacteria, fungi and plant species. More recently, several roles including the regulation of gene expression and signal molecule has also been attributed to GABA in plants. GABA is mainly synthesized by glutamate decarboxylase (GAD). We have previously reported a novel role for GABA production in vascular development in pine seedlings. Here, we investigate an angiosperm species (poplar) to test whether the proposed role in the gymnosperm might be applicable to other vascular plants. Results showed that a poplar GAD was differentially expressed in response to reaction wood generation triggered by gravitational stimulation, and that its transcript profile was similar to that of an ACC oxidase which expression is induced in reaction wood-forming tissues. Additionally, GABA was immunolocalized mainly in differentiating xylem and ray parenchyma cells in xylematic areas in poplar stem sections. Clear similarities are observed between the results in the angiosperm and previous results in the gymnosperm, suggesting a common role of GABA production in vascular development in plants. Angiosperm GAD is regulated by pH and calcium/calmodulin, two critical factors for programmed cell dead during xylogenesis. We have previously reported that calcium/calmodulin regulation of GAD is not only present in angiosperm, but also in pine. To investigate the appearance of calcium regulation in plant GAD during evolution, calmodulin binding domains (CaMBDs) in GADs from species across the green lineage have been studied. Essential residues described in functional CaMBDs of plant GADs are conserved in a GAD of the ancient member of vascular plant *Selaginella moellendorffii*, and absent in GADs of non-vascular plants. CaMBDs have probably evolved from a homologue region to the carboxy termini found in a GAD of *Klebsormidium flaccidum*, the ancestor of current terrestrial plants. A dual role for GABA production in nitrogen recycling and signaling during xylogenesis in vascular plants is proposed.

Chapter 3

GADs are encoded by one or two genes in animals, whereas the number of GAD genes is more variable and usually higher (up to ten) among plant species (Sukhareva and Mamaeva, 2002). The existence of several *GAD* genes in plants indicates that gene duplication and specialization events occurred during plant evolution. To date, *GAD* gene families have been characterized mainly in herbaceous plants, and just a few studies have been carried out in trees as plant model. In this chapter, as a first attempt in the characterization of the GAD family in a tree species, *in silico* studies and expression analysis of this gene family has been accomplished in *P. tremula x P. alba*. Additionally, immunolocalization of GABA have been performed in order to shed some light on GABA location at tissular level in this tree species.

Six GADs genes were identified on the sequenced poplar genome (*P. trichocarpa*). All of them had a similar gene structure with the same numbers of exons and introns, except for *PtGAD1*, which showed an intron less due to fusion of two exons. The GAD proteins encoded by these genes have molecular masses and isoelectric points similar to those described in other plant species. They are apparently functional since the key residues to perform catalysis are conserved in all of them (Sukhareva and Mamaeva, 2002). Moreover, essential residues required for binding CaM (Arazi et al., 1995) were detected in CaM binding domain of the six GAD poplar proteins, which it suggests a relevant role of calcium regulation in driving GAD activity in this tree species.

To characterize at transcriptional level the *GAD* gene family in *P. tremula x P. alba*, were used each specific gene primers and also primers for global expression of all *GAD* genes. The overall expression of *PtaGADs* was associated to petioles and stem, being *GAD* transcript levels higher in xylem when compared to bark, this fact match with a role of GAD in vascular development, role previously suggested for GAD in a gymnosperm tree species (Molina-Rueda y col., 2010). The expression of the six GAD genes was measured individually to provide hints in deciphering putative specialization event in this gene family. *PtGAD1* not only has a different gene structure, but also it presents more substitutions in the amino acid sequence when compared to the other poplar GAD proteins. This substitutions lead to higher number of serine and threonine residues in *PtGAD1*, suggesting that the protein activity might be differentially modulated by phosphorilation. Regulation of GAD activity by phosphorilation has been

previously proposed in *Arabidopsis*, rice and *Medicago* (Nakagami et al., 2010). In agreement with a putative role in vascular development, results of this chapter showed that petioles and xylem presented the highest *PtaGAD1* transcript levels among all the analyzed organs and tissues. However, in leaves, in which *PtaGAD1* showed the highest transcript level among all the *PtaGADs*, no differences in expression were detected between mesophyll and leaf ribs, and furthermore, “in silico” promoter studies revealed a relatively high number of *cis*-elements involved in response to light in its promoter. These facts suggest that GABA production from *PtaGAD1* might also be involved in a role in photosynthetic tissues. Although no specific role for GABA in leaves has been published so far, certain roles already described for GABA production might be specially relevant in photosynthetic tissues. GABA can affect ion flux (Kinnersley and Lin, 2000) by joining Ca^{+2} channels (Yu et al., 2014) and modulate the concentration of potassium ions (Schroeder and Hagiwara, 1989). Additionally, GABA can regulate the expression of aquaporin (Renault et al., 2011), which may affect cell turgor. These two factors, modulation of ion flux and cell turgor, are essential for stomata movement, which point out a putative role for GABA production associated to these specialized cells in leaves.

PtaGAD2 was expressed mainly in organs in which the vascular tissue is especially abundant such as petioles and stems since transport function is one of the main roles in these organs. Unlike *PtaGAD1*, *PtaGAD2* transcript levels were higher in leaf ribs than in mesophyll in leaf samples. *PtaGAD2* was preferentially expressed in xylem and *cis* elements that induce expression in xylem were found in its promoter. Altogether, these results suggest that *PtaGAD2* might be involved in vascular development in poplar. During xylogenesis, induction of GAD activity is expected since elevated Ca^{+2} concentration and a decrease in pH are common and necessary events during the program cell death in the maturation of tracheary elements. GABA may participate in various processes in the vascular system. It has been reported that GABA can modulate the expression of genes involved in extensibility and cell elongation during vascular development (Renault et al, 2011;. Kathiresan et al. 1997; Kathiresan et al, 1998) and genes involved in ethylene biosynthesis, a hormone with roles in vascular development in poplar (Love et al., 2009).

PtaGAD3 expression was predominantly found in roots of *Populus*. Its high expression in roots was positively correlated with that of other genes of the GABA shunt pathway and mitochondrial GABA permease gene (GABP). Phylogenetic studies

showed that *PtaGAD3* and *PtaGAD2* derive from duplication so these two genes could be paralogs suggesting that *PtaGAD3* might also participate in vascular development. Furthermore, according to the results of phylogenetic studies, *PtaGAD2*, *PtaGAD3* and *PtaGAD4* may be orthologues of *AtGAD1*. It has been proposed that *AtGAD1* might be involved in GABA synthesis from glutamate derived from primary nitrogen assimilation (Bouche et al., 2004). In this context, GABA production might be involved in nitrogen assimilation metabolizing the glutamate from the GS/GOGAT cycle and providing succinate to the Krebs cycle, maintaining the balance of nitrogen and carbon metabolism in root. Next chapter will focus in depth on the putative role of *PtaGAD3* and GABA shunt in roots.

PtaGAD5 messengers were detected only in roots and flowers but with large variations between replicates. However, *PtaGAD6* expression was not detected in any of the analyzed samples. The common phylogenetic origin of *PtaGAD5* and *PtaGAD6* with their Arabidopsis orthologues *AtGAD4* and *AtGAD3* suggests that they might have retained similar functions in the two species. Miyashita and Good (2008) did not detect *AtGAD3* messengers under normal growth conditions and *AtGAD4* is found at low levels in certain organs. However, the expression levels of *AtGAD4* increase under stress conditions (Miyashita and Good, 2008; Kaplan et al., 2007; Urano et al., 2009; Renault et al., 2010) suggesting that *AtGAD4* is involved in response to those environmental stresses. In chapter 3, the expression of *PtaGADs* in different abiotic stresses is analyzed in order to see if *PtaGAD5* and *PtaGAD6* respond to stress.

GABA immunolocalization in different organs of *Populus* support the importance of GABA synthesis in the vascular system in stem and root. GABA signal is primarily located in differentiating xylem supporting the hypothesis that GABA is involved in xylogenesis. This signal is usually higher in young regions of the organs (apical stem and roots). Furthermore, the localization of GABA in the radial parenchyma and phloem suggest that GABA transport exist between tissues and organs. Additionally, GABA signal was observed in leaf mesophyll which may support the hypothesis of GABA synthesis associated to other cell processes such as ion flux regulation or as protective role in photosynthetic tissues.

Chapter 4

Root is the main organ responsible for water and nutrient absorption. For increasing the efficiency of water and nutrient uptake a suitable control of plant root architecture is essential to cope with plant growth needs, and water and nutrient availability. Accordingly, the presence of inorganic (Robinson, Linehan & Gordon 1994; Hodge, 2004) and organic compounds (Walch-Liu et al., 2006) in the soil induces changes in root morphology. For example, L-glutamate is specifically perceived at the primary root tip and inhibits mitotic activity of the root apical meristem (Walch-Liu et al., 2006). The architecture of this organ can also be changed by GABA treatments, and the nature and magnitude of the changes can be modulated by its concentration (Roberts, 2007; Mirabella et al., 2008). Glutamate and GABA levels can be controlled by GAD activity since these amino acids are substrate and product respectively of the enzymatic reaction catalyzed by GAD. In the previous chapter, *PtaGAD3* was reported to be expressed mainly in roots and its expression pattern in this organ was correlated with genes involved in the catabolism of GABA, suggesting that GABA shunt may play a role in roots. In this chapter, root architecture in response to different amino acids, including glutamate and GABA, was studied in *P. tremula x P. alba*. Additionally, the expression of GAD genes is measured and compared to that of genes with known function to discuss possible roles of PtaGADs in poplar root.

Previous studies in *Arabidopsis* have shown that the growth of the main root is not affected by the presence of glutamate in a nitrate culture media (Roberts, 2007; Walch-Liu and Forde, 2008). On the contrary, results of this work showed a significant increase of the root growth in poplar plants under similar conditions when compared to that in control media (no glutamate). Treatments with another acidic amino acid (aspartate) caused the opposite effect (inhibition) in the main root. This fact revealed that the induction caused by glutamate was not due to just its acidic nature, but its own chemical structure. Treatments with exogenous GABA at concentrations lower than 10 mM do not cause growth inhibition of the main root or changes in branching in *Arabidopsis* (Barbosa et al., 2010). However, treatments with 2 mM GABA, although it did not change root length, caused an increase in density of secondary roots in poplar. As alanine is directly derived from GABA catabolism, alanine treatments were also performed and compared to plants under GABA treatment. Results of alanine treatments were similar to control (no amino acids media), suggesting that the effect of

GABA in inducing branching is due to GABA and not to alanine production derived from GABA transamination nor its down-stream metabolism. Thus, poplar and *Arabidopsis* show different responses to organic compounds suggesting that regulation of root architecture by amino acids is different between the tree and the herbaceous. Exogenously applied GABA causes accumulation of ethylene in sunflowers due to increased expression of genes involved in ethylene biosynthesis (Kathiresan et al., 1997), and ethylene is one of the key regulators of root hairs and development of lateral roots (Clark et al., 1999; Schiefelbein, 2000). These two facts suggest that the effect of GABA on promoting lateral roots might be mediated by ethylene.

Root shows regions with different stages of development and functions. In this chapter, main roots were divided in five zones: meristem (Z1), elongation (Z2), absorption (Z3), branching (Z4) and basal zone (Z5). Immunolocalization of GABA in pine roots showed higher intensity signal in apical regions than basal, and this signal was restricted to the stele, indicating a potential role for this amino acid in root growth and nutrient transport (Molina-Rueda et al., 2015). The localization of GABA signal in poplar roots was very similar to that in pine, i.e. GABA located in stele and higher signal in young regions (Z1, Z2 and Z3) than mature (Z4 and Z5) suggesting similar functions in roots of both species.

The expression of GABA shunt genes and genes involved in root typical processes was measured in the five root regions. Results showed that genes encoding 14-3-3 proteins and the ACO were mainly expressed in the meristem zone (Z1) as a reflect of the importance that 14-3-3 and ethylene have in many processes related to cell division (Ortega-Martinez y col., 2007; Oecking y Jaspert, 2009; Freeman y Morrison, 2011). GABA have the ability to down-regulate the expression of a large subset of 14-3-3 gene family members, and this effect depends on ethylene and ABA signalling pathways (Lancien and Roberts, 2006), and high concentrations of GABA in *Arabidopsis* inhibit the growth of the main root (Mirabella et al., 2008). These results suggest that the inhibition in root growth caused by GABA may be mediated by the 14-3-3 gene family.

Elongation zone (Z2) is a region in which cells stop dividing and start elongating, it is also a region where the first vessels of the vascular system appear. Genes related to ammonium uptake and assimilation were expressed mainly in this region. NH_4^+ is considered the main inorganic nitrogen source uptaked in apical root zones (Henriksen et al., 1992; Lazof et al., 1992; Colmer and Bloom, 1998). Results

showed a strong expression of a high affinity transporter (*AMT1-2*) responsible for NH_4^+ uptake (Min et al., 2000) in Z2. The incorporation of this NH_4^+ into amino acids releases protons generating an acid environment in the apical region, which promotes the extensibility of the cell wall and the cellular elongation (Taylor and Bloom, 2002). Although the assimilation of NH_4^+ may take place through the GS/GOGAT cycle, transcript profile corresponding to these two enzymes was higher in older regions (mainly in Z4) than here (Z2). However, transcript profile of *GDH* matched well to that of the ammonium transporter (*AMT1-2*) suggesting that assimilation of ammonia by *GDH* might be relevant in Z2 region. Glutamate could be metabolized through the GABA shunt to feed the Krebs cycle in roots. *PtaGAD2*, *PtaGAD3* and genes of the GABA shunt (*GABA-T* and *SSADH*) were expressed mainly in this region (Z2). *PtaGAD2* and *PtaGAD3* expressions were also correlated with that of genes involved in vascular development such as *phenylalanine ammonia lyase (PAL)* (Haddon and Northcote, 1975), *cytosolic isocitrate dehydrogenase (IDHc)* (Pascual et al., 2008) or prokaryotic type *aspartate aminotransferase (PT-AAT)* (reviewed De la Torre et al., 2014) suggesting that both GADs might participate in vascular development processes in the root. Phylogenetic studies suggest that *PtaGAD2* and *PtaGAD3* came from a duplication and could be paralogs. *PtaGAD2* promoter could have acquired regulatory elements that increase the expression during vascular development of aerial organs, while *PtaGAD3* gene plays this role more specifically in the root. GABA production in young root region (Z2) may participate in various processes such as primary nitrogen assimilation, ammonia re-assimilation from lignification or as a signal molecule regulating the expression of genes such as expansins or ethylene biosynthesis genes.

The genes with high expression levels in regions specialized in nutrient acquisition (Z3 and Z4) were grouped in a cluster. The NH_4^+ net flow decreases in more mature zones of root when compared to younger regions and NO_3^- flow shows the opposite trend (higher in mature regions) (Henriksen et al., 1992). In agreement with this, results showed a decrease in the transcript levels of the ammonium transporter (*AMT1-2*), and the opposite trend for the high affinity nitrate transporter (*NTR2.1*). Moreover, the expression of genes involved in both NO_3^- reduction (*NR* and *NIR*) and NH_4^+ assimilation (*GS1.2* and *NADH-GOGAT*) increased in Z3 and mainly in Z4. *PtaGAD1* showed its higher expression in Z3, which may suggest that *PtaGAD1* might be metabolizing the glutamate produced in flanking regions (Z2 by *GDH*, and Z4 by GS/GOGAT cycle). In zones with high proliferation of lateral roots, GABA could act as

CAPITULO 7

a signal driving ethylene mediated processes (Clark et al., 1999; Schiefelbein, 2000) or could be transported to other regions. Moreover, Z3 and Z4 are the regions where much of the nitrogen uptake takes place, and where GABA might be transported to the apical region and increase the expression of genes encoding transporters high affinity for nitrogen (NRT2) to increase the efficiency of uptake nitrogens compounds in starvation of nitrogen (Beuve et al., 2004). GABA might act as sensor of nitrogen status in the root.

Chapter 5

The global average temperature will rise 0.3°C per decade due to climate change (Jones et al., 1999). This change will entail periods of extreme temperatures and stronger and lower rainfall seasons. Plants have evolved adaptive mechanisms that allow them to survive in an ever-changing environment. Since plants are sessile, they must be able to sense their natural environment and undergo changes in their physiology and development in response to those environmental changes. A typical response mechanism of plants to environmental stresses is the accumulation of GABA in their tissues (Kinnersley and Turano, 2000). Although there are different types of environmental stresses, most have a common response in plants, increase the levels of intracellular Ca^{+2} (Sanders et al., 1999) and/or decrease the cytosolic pH (Aurisano et al., 1995). These two factors, acid pH and high concentrations of Ca^{+2} , increase GAD activity (Ramputh and Bown, 1996), which may explain well the increase in GABA levels in response to external stimuli. Although the specific role of GABA under stress is still mainly unknown, it is suggested that this amino acid can act as compatible osmolyte (Heber et al., 1971) and scavenger of reactive oxygen species (Liu et al., 2011) due to its chemical nature. Moreover, the production of GABA through GAD activity consumes protons, what promotes the recovery from cytosolic acidification caused by the stress. Increases in GAD activity during stress correlate well with increases in levels of GABA and GAD messengers (Kaplan et al., 2007; Renault et al., 2010; Ackay et al., 2012). This fact suggests that responses at transcriptional level in GAD genes lead to changes in GABA levels. To date, there are few characterizations of GAD gene families in plants under stress conditions. GAD gene family of *Arabidopsis* has been the most studied GAD gene family among plants under stress conditions. Under stress, *Arabidopsis* GAD genes altered their expression, but among the six genes in this family, *AtGAD4* is the most susceptible because it shows low expression levels in normal growth and sharply increases during hypoxia (Miyashita and Good, 2008), salt (Renault et al., 2010), drought (Urano et al., 2009) and cold (Kaplan et al., 2007). In chapter 1, the results showed that *AtGAD4-AtGAD3* and *PtaGAD5-PtaGAD6* could be orthologues. In this chapter, the expression of *PtaGADs* was analyzed under common abiotic stresses such as heat, cold, floods, drought and salt to obtain information to help discussion about the different roles of each *GAD* gene in the *Populus*. Each stress condition and putative roles for *PtaGAD* genes are discussed below.

High temperatures cause changes in the structure of biological membranes and proteins, in microtubules organization (Howarth, 2005; Smertenko et al., 1997), etc. altering plant development and growth (Vollenweider and Gunthardt-Goerg, 2005). In this study, *P. tremula* x *P. alba* plants showed changes at phenotypic (decrease of growth in height and loss of turgor in young leaves) and molecular level (increased expression of the heat marker gene *MBF1C*) as consequences of high temperatures (39°C) after 72 hours. Several studies have revealed that the expression pattern of GAD genes is affected by heat stress in other plant species (Shelp et al., 2012; Bouché et al., 2004). Expression studies of *PtaGADs* genes during the heat stress showed an overall decrease of their transcript levels, suggesting that high temperatures have a negative effect on the expression of *GADs*. The exception was *PtaGAD5*, which showed a sharp increase in its expression in stem after 24 hours. Although GABA production under this circumstances might be regulated at GAD activity level, these results suggest that if GABA is being produced, it might be derived from either the degradation route of polyamines (Fait et al., 2008; Shelp et al., 2012b) or the non-enzymatic reaction proline from oxidative stress (Signorelli et al., 2015). An increase in transcripts for *GABP* and *GABA-T* was observed in leaves indicating a possible increased in GABA catabolism through GABA shunt in this organ. GABA shunt pathway plays a crucial role in protecting yeast cells from heat damage by restricting ROI production involving the flux of carbon from 2-ketoglutarate to succinate during heat stress (Cao et al., 2013). Thus, GABA-T has been related to senescence processes, and in this study it presented its highest expression in leaves after 72 hours of treatment, when the leaves presented an incipient wilting. So, the GABA shunt activation might be important for recycling nitrogen during senescence in leaves caused by loss of turgor (Ansari et al., 2005) during heat stress.

Cold stress also causes a decrease in plant growth (Renault et al., 2014). Hybrid plants were exposed to 10°C and significantly reduced their growth in height but they didn't show phenotypic changes after 72h of treatment. The response of most *PtaGAD* genes was similar to the marker for this stress (*CBF3*), with an increase of messengers widespread in the early hours of treatment (1 and 8 hours). *PtaGAD2* and *PtaGAD3* expression increased mainly on leaves and stem. In contrast, genes expression involved in transport and catabolism of GABA (*GABP* and *GABA-T*) decreased under cold stress. These results suggest that GABA might be accumulating, especially in leaves, and act as compatible osmolyte to protect biological membranes from damage by low

temperatures in poplar leaves, which has been described previously in thylakoid membranes of tobacco (Heber et al., 1971),.

Poplar usually grows near river banks, so adaptive mechanism to flooding stress is supposed to be evolved in this species. Limiting oxygen by soil flooding of plant roots (Subbaiah and Sachs, 2003) induces fermentative metabolism (Kennedy et al., 1992) and causes a decreased of growth in plants. Decrease in height growth and increasing in the expression of *alcohol dehydrogenase (ADH)* gene were observed in poplar plants after 72 hours of flooding treatment, indicating that fermentative metabolism is enhanced in poplar plants under this treatment. Besides an increased expression of *ADH*, previous studies also observed an induction of *GAD* gene expression in hypoxic environment in *Arabidopsis* (Miyashita and Good, 2008). It has been proposed that induction of *GAD* expression may be a mechanism to mitigate the cytosolic acidosis (Roberts et al., 1984; Aurisano et al., 1995) caused by flood stress since protons are consumed in the reaction catalyzed by *GAD* (reviewed in Kinnersley y Turano, 2000). Hybrid poplar plants subjected to flood stress also showed induction of some *PtaGAD* genes. *PtaGAD5* and *PtaGAD3* showed similar expression patterns than *ADH*, an increase of their transcript levels in roots and stems, indicating, as expected, that these are the organs most affected by the stress. So, *PtaGAD5* and *PtaGAD3* genes showed a clear response to stress by flooding, being *PtaGAD5* more sensitive to stress as showed greater induction respect to control than *PtaGAD3*. On the contrary, *PtaGAD2* gene showed an opposite expression pattern to *PtaGAD3* and *PtaGAD5* genes during treatment. *PtaGAD2* and *PtaGAD5* genes show opposite expression patterns in stem both under normal and stress conditions, suggesting that there may be a negative effect *PtaGAD2* on *PtaGAD5* as *PtaGAD2* is the majority in stem in normal growth and *PtaGAD5* is not expressed, and when *PtaGAD2* expression decreases during stress *PtaGAD5* expression increases. It has been reported that, at metabolic level, the catabolism of GABA is occurring during hypoxia, but without changes at transcriptional level of GABA-T (Miyashita and Good, 2008). The results also showed a decrease in gene expression of GABA shunt in *Populus*.

The drought and salt treatments cause very similar responses in plants because both of them trigger cellular dehydration. The decrease of height growth of plants is a response caused by these conditions (Bharvaga y Sawant, 2013). Drought and salt stress in poplar caused similar phenotypic responses decreasing growth in height, and molecular responses in the stress marker genes used (*ATAF1* in salt treatments and

XERICO in drought). Another plant mechanism in response to dehydration stress is to increase ABA levels (Thomashow, 1999). ABA is a plant hormone capable of regulating gene expression. Certain *GAD* genes of orange tree presented several regulatory sequences of ABA response in their promoters (Liu et al., 2014), whose expression increases in response to ABA (Zhuang et al., 2010; Liu et al., 2014). In agreement with this, the *in silico* analysis of the promoters of the poplar *GADs* genes showed that *PtGAD1*, *PtGAD2* and *PtGAD5* have several possible ABA response *cis*-elements, so these genes might be potential targets of stresses that cause an increase in ABA levels. *PtaGAD1* gene expression increased in all organs and times analyzed being the most susceptible *PtaGAD* gene to dehydration stress. The increased of *PtaGAD1* gene expression in stresses which cause an increase of ABA may be due to *PtaGAD1* is a *PtaGAD* with the greatest number of ABA response elements in its promoter, suggesting that its expression is ABA-dependent. The rest of *PtaGADs* did not show significant changes in their expression except *PtaGAD5* and *PtaGAD2*, which increased their expression in stem under salt and drought treatments in short-term, but only *PtaGAD5* showed high expression in long-term treatments. In addition, *PtaGAD5* gene expression varies depending on the intensity of stress, so a higher salt concentration in the medium increased expression of *PtaGAD5*. *PtaGAD5* showed a dose-dependent response as was proposed previously considering its possible orthologue of *Arabidopsis* (*AtGAD4*) (Renault et al., 2010). These results suggest that *PtaGAD5* might increase its expression in response to stress to help mitigate damages and not as a result of metabolic disturbance caused by the treatment. Dehydration stress can not only cause changes at the transcriptional level, but it also induce an increase of intracellular calcium (Kinnersley and Turano, 2000), that could lead to an increase in *GAD* activity. *GABA* produced by this activation might accumulate to act as compatible osmolyte or it might be catabolized through the *GABA* shunt. Our results showed an increased in transcript levels for the *GABA* shunt genes under salt and drought stress. Renault et al., (2010) postulated that *GABA* accumulation does not appear responsible for salt stress tolerance, if not the proper functioning of the *GABA* shunt may provide stress tolerance. So, to tolerate dehydration stress is important *GABA* production by *GAD* due to its physicochemical properties, as the proper functioning of the *GABA* shunt.

Capítulo 8

Materiales y métodos

Estudios bioinformáticos: búsqueda de secuencias GADs y realización de los árboles filogenéticos

La única especie del género *Populus* de la que se dispone la secuencia completa de su genoma es la de *Populus trichocarpa*, por ello todos los estudios bioinformáticos se realizaron con la versión 3.0 de este genoma disponible en la base de datos Phytozome v10.3 (www.phytozome.net). Los análisis de búsqueda de los genes *PtGADs* se realizaron mediante BLASTs (Altschul y col., 1997) utilizando una secuencia consenso de GAD de angiospermas obtenida del alineamiento de las secuencias de aminoácidos de treinta y cinco GADs pertenecientes a los principales grupos taxonómicos de angiospermas (GAD angiospermas). Adicionalmente, se utilizaron secuencias proteicas de GADs conocidas y caracterizadas previamente (*Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*). El gen *PtGAD1* posee varios productos génicos pero sólo la secuencia de uno de ellos (*Potri.012G039000.2*) corresponde a los ESTs encontrados en la base de datos del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

El punto isoeléctrico y la masa molecular de cada una de las proteínas codificadas por los *PtGADs* se estimaron en Expasy (Expert Protein Analysis System) disponible en www.expasy.es. Mediante el programa MEGA (v6.06) (Tamura y col., 2013) y seleccionando el algoritmo Muscle se realizaron los alineamientos entre las secuencias aminoacídicas GADs. Las cajas de identidad añadidas en los alineamientos se realizaron con el programa Boxshade (v3.2), las cajas negras reflejan identidad y las cajas grises, similitud. Los árboles filogenéticos se generaron a partir del análisis de reconstrucción de filogenia mediante el método estadístico de Maximum Likelihood en MEGA. Los valores bootstrap se obtuvieron a partir de 1000 combinaciones posibles.

Análisis de las secuencias promotoras

La presencia de elementos reguladores en los promotores de los genes *PtaGADs* fueron analizados en secuencias de 1500 nucleótidos corriente arriba desde el ATG que marca el inicio de la transcripción. Los posibles elementos *cis* de las secuencias promotoras fueron identificados con los programas de bases de datos de elementos reguladores en plantas denominados PLACE (Higo y col., 1999) y PlantCARE (Lescot y col., 2002). Se tuvieron en cuenta, en su mayoría, cajas promotoras de un tamaño mayor de 6 nucleótidos, ya que la probabilidad de encontrarlas al azar una vez en la secuencia promotora escogida (1500 pb) era (0,37) menor a 1.

Análisis de las secuencias CaMBD

Las secuencias GAD de los diferentes taxones pertenecientes al linaje verde fueron localizadas por BLASTP (de proteínas) (Altschul et al., 1997) en el sitio web del NCBI. Todas las secuencias consideradas GAD fueron validadas por la presencia de motivos y residuos claves de las GADs de plantas (Molina-Rueda et al., 2010 y referencias allí). Las predicciones de estructura secundaria se realizaron por Jpred3 (Cole et al., 2008). El porcentaje de similitud entre las proteínas se calculó por alineamientos por parejas de secuencias utilizando el algoritmo “Needle” en EMBOSS (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/).

Material biológico

Para este estudio se han empleado plantas del híbrido *Populus tremula x P. alba* (clon INRA 717-1B4). Se tomaron esquejes de plantas adultas y se transfirieron a vermiculita (sustrato inerte de silicatos). Las plantas se regaron con solución de Hocking (Hocking, 1971) suplementada con 1mM de NH_4NO_3 , ya que en estudios previos se ha considerado como una concentración de nitrógeno adecuada para el crecimiento normal de *Populus* (Cooke y col., 2005; Pitre y col., 2007). La mayoría de las plantas se mantuvieron en invernadero con luz natural (horario de primavera en hemisferio norte) con temperatura controlada (16-30°C) hasta que alcanzaron una altura media de 80 cm. Las muestras se recolectaron en el mes de julio del 2013. Varias plantas se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (24°C) y de luz (ciclo de 16h de luz a 150 $\mu\text{moles de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y 8 h de oscuridad) en el laboratorio. Estas plantas se utilizaron para recolectar nervadura y mesófilo de las hojas (Capítulo 3).

Recolección de muestras de *Populus* en condiciones normales

Para recolectar las diferentes muestras se ha considerado que la hoja 1 es la primera hoja (desde el ápice) que mide al menos 0,5 cm en su parte más ancha, siendo el entrenudo 1 la región del tallo entre los nudos 1 y 2 que vienen definidos por las hojas 1 y 2 respectivamente. Teniendo en cuenta este criterio, para analizar la expresión de las GADs y otros genes se recolectaron las siguientes muestras: 1) cuatro grupos de hojas, hojas jóvenes de los nudos 4 y 5, del 6 al 8, 9 y 10 y por último las hojas más maduras situadas en los nudos que van de la posición 11 a la 13; 2) cuatro grupos de peciolo correspondientes a las hojas recolectadas descritas en el punto 1; 3) región del

tallo de los nudos 4 al 10 y de los nudos 10 al 14; 4) de la región del tallo situada entre los nudos 14 y 20, se separó la corteza del xilema (xilema más médula); 5) raíces apicales, que corresponden a aquellas más blanquecinas y por lo tanto menos lignificadas, y raíces basales, más lignificadas; y 6) flores femeninas de árboles adultos dispuestas en amentos con las cápsulas cerradas (flor joven) y flores femeninas en la que las cápsulas de los amentos están abiertas y se observan las semillas (flor madura). Todos estos tejidos fueron recolectados, congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta su procesamiento.

Adicionalmente, de plantas crecidas en el laboratorio, se tomaron hojas 4 y 6, y hojas 8 y 9 para separar el nervio principal y nervios secundarios de mayor grosor de las zonas del mesófilo (región que aún contenía algunos nervios de menor rango)

Tratamientos de estreses abióticos

En los experimentos de estrés se recolectaron las siguientes muestras: 1) dos tipos de hojas, hojas 4 y 5, correspondiendo a hojas en desarrollo y expansión, denominadas hojas jóvenes, y hojas 9 y 10, que son hojas maduras totalmente expandidas; 2) región del tallo entre los nudos 4 y 10; y 3) raíz enriquecida en regiones jóvenes poco lignificadas. Los experimentos se realizaron a corto plazo siendo los puntos de muestreo 1, 8, 24 y 72h. Por cada punto de muestreo se recolectaron las muestras arriba indicadas de dos plantas tratadas y dos plantas controles. Los tejidos recolectados se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C hasta que fueron procesados.

El estrés por temperatura se realizó en cámaras de crecimiento (Ibercex). Plantas de 80 cm se aclimataron durante 1 semana a las nuevas condiciones de luz (ciclo de 16h de luz a $150\ \mu\text{moles de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y 8 h de oscuridad) a 24°C .

Las plantas se expusieron a 39°C para generar el estrés por calor. Estas se regaron con solución de Hocking $1\text{mM NH}_4\text{NO}_3$ para evitar que se produjera otros tipos de estrés como estrés salino, debido a la concentración de sales en el sustrato, y/o sequía provocada por la evaporación de agua en altas temperaturas. Para el estrés por frío las plantas se mantuvieron a 10°C durante las 72h del experimento. En paralelo, por cada punto de muestreo del estrés por calor y frío, se recolectaron los mismos tejidos de dos plantas controles (24°C). Así, en total se recolectaron muestras de 8 plantas sometidas a 39°C , 8 plantas a 10°C y 8 plantas a 24°C .

El resto de tratamientos de estrés se realizaron en el invernadero con luz natural y a una temperatura media de aproximadamente 24 °C. Para simular el estrés por inundación, los maceteros de las plantas fueron sumergidos en agua hasta rebasar en 2 ó 3 cm el nivel superior del sustrato. El estrés por sal se generó regando las plantas con solución de Hocking (1mM de NH_4NO_3) más 300 mM de NaCl. En el estrés por sequía, las plantas fueron transferidas a maceteros con vermiculita seca.

Crecimiento de raíces en cultivo *in vitro*

A partir de plántulas de *P. tremula* x *P. alba* de aproximadamente 10 cm de altura crecidas en cultivo *in vitro*, se tomaron fragmentos del tallo, que contenían 2 nudos, y se colocaron en placas controles, con medio ½ Murashige y Skoog (MS; Murashige y Skoog, 1962) con una concentración final 1mM de nitrato, 0,5 mM de amonio, 3% de sacarosa y pH 5.8, y en placas con el mismo medio que las controles suplementadas con glutamato, GABA, alanina o aspartato a una concentración final 2 mM y pH 5.8. Las placas se colocaron en vertical y se mantuvieron durante 28 días en ciclo de 16h de luz a 150 $\mu\text{moles de fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 8 h de oscuridad a 24°C. Las raíces se midieron a los 7, 14, 21 y 28 días.

Extracción de ARN y análisis de los mensajeros mediante qPCR

Las extracciones de ARN se realizaron a partir del tejido pulverizado en nitrógeno líquido y siguiendo el protocolo de Chang et al. (1993). La integridad del ARN se observó en geles de agarosa, además de tener en cuenta los ratios de 260/280 obtenidos por el Nanodrop 2000. Para asegurarse que las muestras de ARN no contiene ADN genómico, se trataron con DNasa (RQ1 RNase-Free DNase, Promega corporation) siguiendo el protocolo del fabricante. La síntesis de cDNA se llevo a cabo con el kit High-Capacity cDNA reverse transcription (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del kit. La reacción de cDNA incluye pequeños cebadores (random primers), pero además se añadió oligo dT anclado (Eurogentec) a una concentración final de 2,5 μM , de esta manera se asegura que las regiones 3' de los mensajeros se retrotranscriben a cDNA, ya que los cebadores para el análisis de los genes de estudio se encuentran diseñados en esta región. Los análisis de expresión mediante PCR en tiempo real (qPCR) se llevaron a cabo con el termociclador LightCycler 480 (Roche Applied Science, Indianapolis IN) usando SYBR Green I Master mix (Roche). Las reacciones se realizaron acorde a las instrucciones del fabricante, en las que se añadió 10 ng de cDNA

CAPITULO 8

en un volumen final de 20 µl. De cada muestra se realizaron tres réplicas técnicas, y por cada pareja de cebadores se introdujo un control negativo (sin cDNA), para comparar las curvas de melting entre las muestras y el control negativo y observar que el producto obtenido es resultado de la amplificación del mensajero. Los tamaños de los amplicones de cada gen y los controles negativos se comprobaron en geles de agarosa. El programa de qPCR consiste en 45 ciclos de: desnaturalización a 95°C durante 10 segundos, hibridación de los cebadores a 60°C durante 15 seg y extensión a 72°C durante 12 seg, en cada ciclo.

Los cebadores de los genes fueron diseñados teniendo en cuenta la secuencias de *P. trichocarpa* y los ESTs disponibles de cada uno de los genes en diferentes genotipos de *Populus*, entre ellos y preferentemente el del híbrido utilizado, *P. tremula x P. alba*. El cebador sentido se diseñó en la región codificante del gen y el antisentido en la región 3'UTR. Para el diseño de cebadores se utilizó el programa Primer3plus (www.primer3plus.com) (Tabla 1). El tamaño de los amplicones oscila entre 70 y 200 pb.

Tabla 1. Información de los cebadores empleados en los estudios de expresión.

Gen	Cebador sentido (5'→3')	Cebador antisentido (5'→3')
GAD consenso	TGGTGGATGAGAACACAATCTG	CCCCTGACATTGATACTCTTCAC
PtaGAD1 (<i>Glutamato descarboxilasa 1</i>)	CTGTACTGGAGGCGGCTTGC	AGCAGGATGAGATTGATGCTCAGA
PtaGAD2 (<i>Glutamato descarboxilasa 2</i>)	AACAAGAGAGATTATTACAGCTTGG AGGA	GATTGATTAGCAACACTAGCTCAACA TCA
PtaGAD3 (<i>Glutamato descarboxilasa 3</i>)	AGAAGGAAGCTGCGGCAATA	CCAGCTCAATCCATCATGATCTTTCC
PtaGAD4 (<i>Glutamato descarboxilasa 4</i>)	GAAAAGTGTCTAGAGACCCAGAG G	AATATAATCACAACCACACCGGCATT T
PtaGAD5 (<i>Glutamato descarboxilasa 5</i>)	TCTCTAGAAGGAAAGAATGGCACT GT	ACGCAGTAGCTAGGCAGATCTAACA
PtaGAD6 (<i>Glutamato descarboxilasa 6</i>)	GCCGCTGAAACGCAAAGGGA	TTTGAGCAGGGTTCTCTTTCAATCG
GABA-T (<i>GABA transaminasa</i>)	TGGCACCTTTCCTGCTGGC	GTGCACCAAAGACCAGCAAGAG
GABP (<i>Permeasa mitocondrial de GABA</i>)	GCTTGCTGGTCTTAATTGGGCA	ACACTGGTTGTAACAGCCCCTG

CAPITULO 8

SSADH (Succínico semialdehído deshidrogenasa)	TGGACGGGAAGGCTCCAAGT	TGCCCTGTTGCTGGTCATCT
GLYR1 (Glioxilato reductasa 1)	AGAAGGCCAGAAGCATGGGATTG	AGGGCTGCAAACCAAGTCCG
GLYR2 (Glioxilato reductasa 2)	CCCCTCCAATTGCAGCAGCT	ACACGAGTTTGCTCAGGATTGCA
GAT1 (Transportador plasmático de GABA)	GCGGTTGCAGCGGTAAGACA	GCTACTAATAATGTGAGCCCATATGC C
MBFIC	TGGAGAGAGTGCTAGGCGTGA	TCGAAGGTAATTGGGGTTGCC
ADH (Alcohol deshidrogenasa)	GGGTCTGAGGTGCATTATTCGCA	TCGAAAGCCAAGGCCTCCATG
XERICO	TACATGCCCTCTTTCAGGACT	GCCCGATGCACTCACGTAAA
ATAF1	AGAAGAACAGCTTAAGGCTGGATG	CGTCGGATTTCGTTTCTTGACG
HK1 (Ribonucleoproteína nuclear)	AGTGGTGCAGTGGCTTTCAAC	TCAGACGAACCACAGGAAAGGG
HK3 (Elongina C)	CGAGTTCGTGATCCACAAGGAAGC	CTGGAGAAGTGAGCATGTTGCG
HK11 (proteína dedo de zinc tipo C2H2)	TAGCAGCAGCTATGTGGCTGAG	TCAGCAGTGTGGCCATGTCAC
HK17 (familia proteica endonucleasa/exonucleasa/ fosfatasa)	TTCGCTGCAAGCCTAGACCAAG	TCCAGGTCGGTCATTATTGCC
GSI.2 (Glutamina sintetasa 1.2)	GGAATTGAGTATTGGAAGATGATG G	TATGTTTATAAATGATCAACAGCC
PAL (Fenilalanina amonio liasa)	GTCCATTATCCTACATTGCTGG	ACCATGGAAGCCAAACCAGAACC
ASN3 (Asparagina sintetasa 3)	AGACCCTGCTTCTGGAGACC	ATGCCGTCCAACATGTCC
AAT (Aspartato aminotransferasa)	TACCAGGGTTTTGCTAGTGGT	TGCACCATGAATAGGTGGATT
PT-AAT (Aspartato aminotransferasa origen procariota)	GCTTCGAGTTGCAATTTGTC	GGGTTGCATCAGCCAGCC
IDHc (Isocitrato deshidrogenasa citosólica)	GGAGGTTATGTATGGGCATG	CTGTTTGCTGGTTTCACC

CAPITULO 8

NTR1-2 (Transportador de alta afinidad nitrato)	TCTTTGGTAGCAACTTGAACAA	TCTCTCTCTCTCTCGTCTCCCT
AMT 1-2 (Transportador alta afinidad amonio)	GATGGCATTATAAAGGCATCAAA	GAAGAAGGCCGTACGTGAATGA
NR (nitrato reductasa)	ATCATCGGATCGGAGAGTTGG	GACGGT-GCTAGTTGGCGTATAG
NiR (nitrito reductasa)	ACAAGTTGCCGATATTGGGTTTCAT	CCTCTATCACCCGTCGTAGTCTCTG
NADH-Gogat (NADH-Glutamina oxoglutarato aminotransferasa)	GGTGTGTGGATATTCCTCTCTG	TCAGATGCGGGCACAACCC
GDH (Glutamato deshidrogenasa)	ATTTATGCTAACTCAGGAGGCGTT	GAGGAGGAAACTAGGGCAATACAT
NRT 2-1 (Transportador de nitrato)	CTGGAAGCATCTTCTCTAGGC	AGTACTGGCATGACACAAAACG
Grf1 (proteína 14-3-3)	AATAGCAGTCTGGGAGCAGCC	TCGAACCACCCACATCCTCATACA
Grf8 (proteína 14-3-3)	AGGCTGGGTTTGGCACTGAA	TTTGCCATGCTGCAGGCTTT
Grf3 (proteína 14-3-3)	CTCTTGCTGAGGCGCTGAGG	ACAGTGGGGCGACATAACTGGT
CBF3	TGGGGACTGGAATGACGGGG	ATCCACAAAACCCTGACACGTCA

Análisis de datos de expresión

Una vez finalizada la amplificación se obtuvieron los valores de fluorescencia a través del programa LightCycler 480. Estos datos fueron analizados con el programa LinRegPCR para determinar la línea base de fluorescencia, calcular la eficiencia de cada reacción y el ciclo umbral (Cq: ciclo al cual aumenta la intensidad de emisión del fluoróforo respecto al ruido de fondo), y estimar el número inicial de moléculas (Ruijter y col., 2009). Los valores de expresión para cada gen fueron normalizados con los genes de referencia más estables. Para determinar los valores de estabilidad (M) y el número óptimo de genes de referencia se utilizó el programa geNorm v3.5 (Vandesompele y col., 2002). Los genes de referencia utilizados para la normalización en cada análisis se muestran en la tabla 2 y obtuvieron valores aceptables según los propuestos por Vandesompele y col. ($M < 0.5$; y $V < 0.15$).

Tabla 2. Genes de referencia más estables para la normalización de los valores de expresión. A, ribonucleoproteína heterogénea nuclear (*Potri.005G101200.1*); B, Factor de transcripción de la elongación B (*Potri.009G037800.1*); C, proteína dedo de zinc tipo C2H2 (*Potri.006G275300.1*); D, familia proteica endonucleasa/exonucleasa/fosfatasa (*Potri.016G061700.1*).

Tratamientos	Genes de referencia
Análisis de expresión en los diferentes órganos de la planta en condiciones normales	A B C
Regiones de la raíz	A B C
Estrés por temperatura (Frio y calor)	A B C
Estrés por hipoxia y sequía	A C D
Estrés por sal	B C D

Northern blotting

El Northern blotting se realizó siguiendo el protocolo de Ausubel y col., (2008). Se utilizaron las sondas correspondientes al extremo 3'UTR de la secuencia GAD1 (KP733694) y de la ACC oxidasa 1 (ACO1) (KP733697) de *P. tremula x P. alba*. Los cDNAs de *GAD1* y *ACO1* fueron clonados por 3' RACE (reversotranscriptasa AMV, ROCHE) usando cebadores específicos a cada uno de ellos respectivamente "GTATGCTGGGAGAAATTTGCAAGG" y "GGATGAGAACTTGAGCTTGCC". Las pre-hibridaciones e hibridaciones fueron realizadas a 65°C. Después de la hibridación, las membranas se lavaron a 65°C con 0.1 X SSC (1X SSC = 0,15M NaCl, 0,015M citrato de sodio, pH 7) y 0,1% SDS.

Fijación e inclusión del material

De cada muestra a analizar se tomó la región central. Así, para fijar tallo se cortaron piezas de aproximadamente 2-3 mm de la región central del entrenudo comprendido entre los nudos 7 y 8 (Capítulo 3). En hojas, se cortó una región en el centro de la hoja obteniendo nervio central y mesófilo. En las diferentes regiones de la raíz (Capítulo 4) también se cortaron piezas de la zona central correspondiente a cada región. Todas la muestras fueron fijadas por criosustitución con glutaraldehído al 1,25 % en metanol 100% según Regan y col. (1999) a -80°C durante 21 días.

Para la inclusión se procedió a sumergir el material secuencialmente en las siguientes soluciones y en una proporción de 2 mL de solución por pieza: metanol 100% (2 pases de 30 minutos), etanol 100% (2 x 30 min.), Clear-Rite™ y etanol en una proporción 1:3 (1 h. en agitación continua), Clear-Rite™:etanol 1:1 (idem), Clear-Rite™:etanol 3:1 (idem), Clear-Rite™ 100% (3 h. en agitación constante) e histosec (parafina en pastillas, Merck, ref. 115161) (2 pases de 24 horas a 59°C en agitación constante).

Cortes histológicos

Se cortaron secciones finas de 10 µm del tejido embebido en parafina con la ayuda de una cuchilla de acero inoxidable para micrótopo R35 (Feather Safety Razor Co., Osaka, Japón) en un micrótopo Leitz (Ernst Leitz, Midland, Ontario, Canadá). Los cortes se depositaron en portaobjetos poli-L-lisina (Super Frost®Plus, Thermo Scientific, Waltham, MA, EEUU) con agua destilada y se dejaron secar a 37°C durante toda la noche.

Tinción con azul de toluidina

Para hidratar los cortes, los portaobjetos se sumergieron en las siguientes soluciones: Clear-Rite™ 100% (2 pases de 10 min.), etanol 100% (2 pases de 5 min.) y etanol 90%, 70%, 50% y 30% (2 min. cada).

Para las tinciones los portaobjetos se sumergieron en agua destilada (2 pases de 30 seg.), y posteriormente en una solución de azul de toluidina al 0.05% (en agua destilada) durante 3 min. A continuación, los cortes se lavaron con abundante agua y se trató con etanol 95% (2 pases de 30 seg.) y etanol 100% (2 pases de 30 seg.). Para montar los cubreobjetos se dejaron 2-3 min. en etanol 100% y en xileno 100% (1 pase de 5 min. y un pase de 15 min). El montaje se realizó en Entellan (Merk, Darmstadt, Alemania).

Las imágenes se realizaron en campo claro con el microscopio virtual digital – dotslide- Olympus. Las imágenes fueron procesadas con el programa OlyVIA.

Inmunolocalización de GABA

La inmunolocalización se realizó según Hawes y Satiat-Jeunemaitre (2001). Para hidratar los cortes se sumergieron en las siguientes soluciones: Clear-Rite™ 100% (2 pases de 10 min.), etanol 100% (2 pases de 5 min.), etanol 90%, 70%, 50%, 30% y agua bidestilada (2 min. en cada paso). Los lavados se realizaron con PBS (NaCl, 8 g/L KCl,

0,2 g/L; Na₂HPO₄, 1,44 g/L; KH₂PO₄, 0,24 g/L; a pH 7,4) (dos pases de 10 minutos) y el bloqueo con BSA al 1% en PBS durante 15 min.

Los cortes se incubaron con una dilución 1:200 del anticuerpo primario (Monoclonal Anti- γ -Aminobutyric acid, clone GB-69, SIGMA, A 0310) en PBS durante una hora en una cámara de humedad a 26°C. Para lavar el anticuerpo primario, se empleó gelatina de pez (SIGMA, G 7765) en PBS (3mL de gelatina por cada 50 mL de PBS) (5 pases de 10 min.). Se incubó con una dilución 1:80 del anticuerpo secundario (ALEXA Fluor 488, INVITROGEN, A- 21200) en PBS durante una hora en una cámara de humedad a 26°C. Finalmente los cortes se lavaron con gelatina de pez en PBS (2 pases de 10 min.).

El montaje se realizó con medio de montaje para fluorescencia (Vector Laboratories, H- 1000), sellado con esmalte de uñas. La conservación hasta la visualización en microscopio (Leica, mod. SP5 II) se realizó a 4°C en oscuridad.

Los controles empleados en el estudio fueron los siguientes: [1] sin anticuerpo primario ni secundario, se comprueba de esta manera si existen compuestos con autofluorescencia en los cortes; [2] sin anticuerpo primario, en este caso se utilizó solo PBS para incubar los cortes a 26°C, la señal en estas condiciones se deberá a uniones del anticuerpo secundario independientemente del anticuerpo primario ó a compuestos autofluorescentes propios del tejido; [3] preadsorbido, que consistió en incubar la dilución 1:200 del anticuerpo primario en presencia de GABA al 3% durante toda la noche a 4°C, de tal manera que el anticuerpo primario queda unido al GABA de la solución y posteriormente, en la incubación con el corte el anticuerpo no puede unirse al GABA presente en el tejido siendo retirado en los lavados. De esta manera se verifica que en las condiciones ensayadas el anticuerpo primario es capaz de reconocer GABA. La única señal encontrada en los controles correspondió a la autofluorescencia de paredes celulares desarrolladas de xilema y epidermis (control 1). Por lo tanto, en las figuras se muestran únicamente uno de los controles (sin anticuerpo primario).

Las imágenes se realizaron con el microscopio invertido LEICA, mod. SP5 II. Las imágenes fueron procesadas con el programa LEICA LAS AF.

Bibliografía

- Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K (1997)** Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *The Plant Cell* 9: 1859–1868
- Ahmed S, Nawata E, Sakuratania T (2006)** Changes of endogenous ABA and ACC, and their correlations to photosynthesis and water relations in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczak cv. KPS1) during waterlogging. *Environmental and Experimental Botany* 57: 278–284
- Aiken RM, Smucker AJ (1996)** Root system regulation of whole plant growth. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34: 325–346
- Akama K, Akihiro T, Kitagawa M, Takaiwa F (2001)** Rice (*Oryza sativa*) contains a novel isoform of glutamate decarboxylase that lacks an authentic calmodulin-binding domain at the C-terminus. *Biochimica et biophysica acta* 1522: 143-150
- Akama K, Takaiwa F (2007)** C-terminal extension of rice glutamate decarboxylase (OsGAD2) functions as an autoinhibitory domain and overexpression of a truncated mutant results in the accumulation of extremely high levels of GABA in plant cells. *J. Exp. Bot.* 58: 2699-2707
- Akcay N, Bor M, Karabudak T, Özdemir F, Türkan I (2012)** Contribution of gamma amino butyric acid (GABA) to salt stress of *Nicotiana sylvestris* CMSII mutant and wild type plants. *Journal of Plant Physiology* 169: 452-458
- Akihiro T, Koike S, Tani R, Tominaga T, Watanabe S, Iijima Y, Aoki K, Shibata D, Ashihara H, Matsukura C, Akama K, Fujimura T, Ezura H (2008)** Biochemical mechanism on GABA accumulation during fruit development in tomato. *Plant & cell physiology* 49: 1378-1389
- Allan WL, Clark SM, Hoover GJ, Shelp BJ (2009)** Role of plant glyoxylate reductases during stress: a hypothesis. *Biochemical Journal* 423: 15–22
- Allan WL, Simpson JP, Clark SM, Shelp BJ (2008)** γ -Hydroxybutyrate accumulation in Arabidopsis and tobacco plants is a general response to abiotic stress: putative regulation by redox balance and glyoxylate reductase isoforms. *Journal of Experimental Botany* 59(9): 2555–2564
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer aa, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997)** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389–3402
- Andersson-Gunnerås S, Hellgren JM, Björklund S, Regan S, Moritz T, Sundberg B (2003)** Asymmetric expression of a poplar ACC oxidase controls ethylene production during gravitational induction of tension wood. *Plant Journal* 34: 339–349
- Andrews D, MacAlpine DM, Johnson JR, Kelley PM, Cobb BC, Drew MC (1993)** Differential Induction of mRNAs for the Glycolytic and Ethanolic Fermentative Pathways by Hypoxia and Anoxia in Maize Seedlings. *Plant Physiol.* 106: 1575-1582
- Ansari MI, Lee RH, Chen SG (2005)** A novel senescence-associated gene encoding gamma-aminobutyric acid (GABA): pyruvate transaminase is upregulated during rice leaf senescence. *Physiologia Plantarum* 123: 1-8
- Arazi T, Baum G, Snedden WA, Shelp BJ, Fromm H (1995)** Molecular and biochemical analysis of calmodulin interactions with the calmodulin-binding

BIBLIOGRAFÍA

- domain of plant glutamate decarboxylase. *Plant physiology* 108: 551-561
- Arend M, Monshausen G, Wind C, Weisenseel MH, Fromm J (2004)** Effect of potassium deficiency on the plasma membrane H⁺ - ATPase of the wood ray parenchyma in poplar. *Plant, Cell and Environment* 27: 1288–1296
- Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, Struhl K (2008)** *Current protocols in molecular biology* (John Wiley & Sons: New York)
- Bao H, Chen X, Lv S, Jiang P, Feng J, Fan P, Nie L, Li Y (2015)** Virus-induced gene silencing reveals control of reactive oxygen species accumulation and salt tolerance in tomato by γ -aminobutyric acid metabolic pathway. *Plant, Cell and Environment* 38: 600–613
- Barbosa JM, Singh NK, Cherry JH, Locy RD (2010)** Nitrate uptake and utilization is modulated by exogenous gamma-aminobutyric acid in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant physiology and biochemistry: PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* 48: 443-450
- Baum G, Lev.Yadun S, Fridmann Y, Arazi T, Katsnelson H, Zik M, Fromm H (1996)** Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation of glutamate and GABA metabolism and normal development in plants. *EMBO J* 15: 2988-2996
- Bender KW, Snedden Wa (2013)** Calmodulin-related proteins step out from the shadow of their namesake. *Plant Physiology*. 163: 486–495
- Beuvé N, Rispaill N, Laine P, Cliquet J-B, Ourry A, Deunff F (2004)** Putative role of γ -aminobutyric acid as a long-distance signal in up-regulation of nitrate uptake in *Brassica napus* L. *Plant Cell Environ.* 27: 1035-1046
- Bhargava S, Sawant K (2013)** Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant Breeding* 132: 21–32
- Bollhöner B, Prestele J, Tuominen H (2012)** Xylem cell death: emerging understanding of regulation and function. *Journal Experimental Botany* 63: 1081–1094
- Bor M, Seckin B, Ozgur R, Yilmaz O, Ozdemir F, Turkan I (2009)** Comparative effects of drought, salt, heavy metal and heat stresses on gamma-aminobutyric acid (GABA) levels of sesame. *Acta Physiol Plant* 31:655–659
- Bouche N, Fait A, Bouchez D, Moller SG, Fromm H (2003)** Mitochondrial succinic-semialdehyde dehydrogenase of the gamma-aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 6843-6848
- Bouché N, Fromm H (2004)** GABA in plants: just a metabolite? *Trends Plant Sci.* 9: 110-115
- Bouché N, Yellin A, Snedden Wa, Fromm H (2005)** Plant-specific calmodulin-binding proteins. *Annu. Rev. Plant Biology* 56: 435–466
- Bouché N y col.(2004)** The root-specific glutamate decarboxylase (GAD1) is essential for sustaining GABA levels in *Arabidopsis*. *Plant molecular biology*, 55:315-325
- Bown AW, Shelp BJ (1997)** The metabolism and Functions of γ -Aminobutyric Acid. *Plant Physiology* 115:1-5
- Breitkreuz KE, Allan WL, Van Cauwenberghe OR, y col. (2003)** A novel γ -

BIBLIOGRAFÍA

hydroxyl- butyrate dehydrogenase: identification and expression of an Arabidopsis cDNA and potential role under oxygen deficiency. *J. Biol. Chem.* 278:41552–41556

- Bush DS (1995)** Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 95–122
- Cantón FR, Le-provost G, Garcia V, Barré A, Frigerio JM, Paiva J, Fevereiro P, Ávila C, Mouret JF, Brach J, De-Daruvar A, Canovas FM, Plomion C (2004)** Transcriptome analysis of wood formation in maritime pine. In: *Sustainable Forestry, Wood products & Biotechnology, BIOFOR proceedings* 333-34
- Cao J, Barbosa JM, Singh NK, Locy RD (2013)** GABA shunt mediates thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen production. *Yeast* 30: 129–144
- Casida JE (1993)** Insecticide action at the GABA-gated chloride channel: recognition, progress and prospects. *Arch Insect Biochemistry Physiology* 22: 13-23
- Castro-Rodríguez V, García-Gutiérrez A, Canales J, Avila C, Kirby EG, Cánovas FM (2011)** The glutamine synthetase gene family in *Populus*. *BMC Plant Biology.* 11: 119
- Chang S, Puryear J, John C (1993)** A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology. Report* 11: 113–116
- Cheval C, Aldon D, Galaud JP, Ranty B (2013)** Calcium/calmodulin-mediated regulation of plant immunity. *Biochim. Biophys. Acta* 1833: 1766–1771
- Cholewa E, Cholewinski AJ, Shelp BJ, Snedden WA, Bown AW (1997)** Cold-shock-stimulated γ -aminobutyric acid synthesis is mediated by an increase in cytosolic Ca^{2+} , not by an increase in cytosolic H^{+} . *Can. J. Bot.* 75: 375–382
- Clark DG, Gubrium EK, Barrett JE, Nell TA, Klee HJ (1999)** Root formation in ethylene-insensitive plants. *Plant Physiol.* 121: 53–59
- Cohen D, Bogeat-Triboulot MB, Tisserant E, Balzergue S... y col., (2010)** Comparative transcriptomics of drought responses in *Populus*: a meta-analysis of genome-wide expression profiling in mature leaves and root apices across two genotypes. *BMC Genomics* 11:630
- Cole C, Barber JD, Barton GJ (2008)** The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.* 36: W197–201
- Coleman ST, Fang TK, Rovinsky S a, Turano FJ, Moye-Rowley WS (2001)** Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 276: 244–250
- Colmer TD, Bloom AJ (1998)** A comparison of NH_4^{+} and NO_3^{-} net fluxes along roots of rice and maize. *Plant, Cell and Environment* 21: 240–246
- Crawford LA, Bown AW, Breitzkreuz KE, Guinel FC (1994)** The Synthesis of $[\gamma]$ -Aminobutyric Acid in Response to Treatments Reducing Cytosolic pH. *Plant physiology* 104: 865-871
- Crosfrove DJ (2000)** Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* 407: 321-326
- Darling DL, Yingling, J, Wynshaw-Boris A (2005)** Role of 14-3-3 proteins in eukaryotic signaling and development. *Curr. Top. Dev. Biol.* 68: 281–315

BIBLIOGRAFÍA

- 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.* 2013 4:138
- De la Torre F, El-azaz J, Ávila C, Canovas FM (2014)** Deciphering the Role of Aspartate and Prephenate Aminotransferase Activities in Plastid Nitrogen Metabolism. *Plant Physiology* 164: 92–104
- Dolferus R, De Bruxelles GD, Dennis ES, Peacock WJ (1994)** Regulation of the Arabidopsis Adh gene by anaerobic and other environmental stresses. *Annals of Botany* 74: 301-308
- Dougherty MK, Morrison DK (2004)** Unlocking the code of 14-3-3. *J. Cell Sci.* 117: 1875–1884.
- Edel KH, Kudla J (2014)** Increasing complexity and versatility: How the calcium signaling toolkit was shaped during plant land colonization. *Cell Calcium* 57: 231-246
- El Katib RT, Hamerlynck EP, Gallardo F, Kirby EG (2004)** Transgenic poplar characterized by ectopic expression of a pine cytosolic glutamine synthetase gene exhibits enhanced tolerance to water stress. *Tree Physiology* 27: 729-736
- Else MA, Coupland D, Dutton L, Jackson MB (2001)** Hydraulic and chemical signalling in flooded and well-drained Castor oil (*Ricinus communis* L.) plants. *Physiologia Plantarum* 111: 46–54
- Ericsson T (1995)** Growth and shoot:root ratio of seedlings in relation to nutrient availability. *Plant and Soil* 168/169: 205-214
- Fait A, Fromm H, Walter D, Galili G, Fernie AR (2008)** Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. *Trends in plant science* 13: 14-19
- Feehily C, Karatzas K a G (2013)** Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. *J. Appl. Microbiol.* 114: 11–24
- Filleur S, Walch-Liu P, Gan Y, Forde BG (2005)** Nitrate and glutamate sensing by plant roots. *Biochemical Society Transactions* 33: 283–286
- Flowers TJ, Yeo AR (1995)** Breeding for salinity resistance in crop plants where next? *Australian Journal of Plant Physiology* 22: 875–884.
- Forde BG, Lea PJ (2007)** Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. *Journal of Experimental Botany* 58: 2339–2358
- Freeman AK, Morrison DK (2011)** 14-3-3 proteins: Diverse functions in cell proliferation and cancer progression. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22: 681–687
- Fromm J (2010)** Wood formation of trees in relation to potassium and calcium nutrition. *Tree Physiology* 30: 1140–1147
- Fu J, Sampalo R, Gallardo F, Canovas FM, Kirby EG (2003)** Assembly of cytosolic pine glutamine synthetase holoenzyme in leaves of transgenic poplar leads to enhanced vegetative growth. *Plant Cell and environment* 26:411-418
- Gallardo F, Fu J, Canton F, Garcia-Gutierrez a, Canovas F, Kirby E (1999)** Expression of a conifer glutamine synthetase gene in transgenic poplar. *Planta* 210:19–26
- Gallardo F, Fu J, Jing Z, Kirby E, Canovas F (2003)** Genetic modification of amino acid metabolism in woody plants. *Plant Physiol Biochem* 41:587–594

- Gallego PP, Whotton L, Picton S y col. (1995)** A role for glutamate decarboxylase during tomato ripening: the characterisation of a cDNA encoding a putative glutamate decarboxylase with a calmodulin-binding site. *Plant Molecular Biology* 27: 1143-1151
- Gerendás J, Zhu Z, Bendixen R, Ratcliffe RG, Sattelmacher B (1997)** Physiological and biochemical processes related to ammonium toxicity in higher plants. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 160:239–251
- Gibbs J, Greenway H (2003)** Review: Mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism. *Funct. Plant Biol.* 30:1–47
- Grallath S, Weimar T, Meyer A, Gummy C, Suter-Grotemeyer M, Neuhaus JM, Rentsch D (2005)** The AtProT family. Compatible solute transporters with similar substrate specificity but differential expression patterns. *Plant physiology* 137: 117-126
- Groover A, Jones AM (1999)** Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis. *Plant Physiology* 119: 375-384
- Guo FQ, Wang R, Chen M, Crawford NM (2001)** The Arabidopsis Dual-Affinity Nitrate Transporter Gene AtNRT1.1 (CHL1) Is Activated and Functions in Nascent Organ Development during Vegetative and Reproductive Growth. *The Plant Cell* 13: 1761–1777
- Gut H, Dominici P, Pilati S, Astegno A, Petoukhov MV, Svergun DI, Grütter MG, Capitani G (2009)** A common structural basis for pH- and calmodulin-mediated regulation in plant glutamate decarboxylase. *Journal Molecular Biology* 392: 334–351
- Haddon LE, Northcote DH (1975)** Quantitative measurement of the course of bean callus differentiation. *J. Cell Sci.* 17: 11-26
- Häusler RE, Ludewig F, Krueger S (2014)** Amino acids –A life between metabolism and signaling. *Plant Sci.* 229: 1–13
- Heber U, Tyankova L, Santarius KK (1971)** Stabilization and inactivation of biological membranes during freezing in the presence of amino acids. *Biochem. Biophys. Acta* 241:578-592
- Henriksen GH, Raj Raman D, Walker LP, Spanwicks RM (1992)** Measurement of net fluxes of ammonium and nitrate at the surface of barley roots using ion-selective microelectrodes. *Plant Physiology* 99: 734-747
- Huang NC, Liu KH, Lo HJ, Tsay YF (1999)** Cloning and Functional Characterization of an Arabidopsis Nitrate Transporter Gene That Encodes a Constitutive Component of Low-Affinity Uptake. *The Plant Cell* 11:1381–1392
- Hyun TK, Eom SH, Jeun YC, H HS, Kim JS (2013)** Identification of glutamate decarboxylases as a γ -aminobutyric acid (GABA) biosynthetic enzyme in soybean. *Industrial Crops & Products* 49: 864-870
- Hocking D (1971)** Preparation and use of a nutrient solution for culturing seedlings of lodgepole pine and white spruce, with selected bibliography. Canada Dept. Environ. Can. For. Serv. Inf. Rept. NOR-X-1. Edmonton
- Hosie A, Aronstein K, Sattelle DB, French-Constant RH (1997)** *Molecular Biology*

BIBLIOGRAFÍA

- of insect neuronal GABA receptors. *Trends Neuroscience* 20 (12): 578-583
- Hori K. et al. (2014).** *Klebsormidium flaccidum* genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation. *Nature Communications* 5: 3978
- Howarth CJ (2005)** Genetic improvements of tolerance to high temperature. In: Ashraf M, Harris PJC, editors. *Abiotic stresses: plant resistance through breeding and molecular approaches*. New York: Haworth Press Inc. p. 277-300
- Irving SN, Osborne MP, Wilson RG (1979)** Studies on L-glutamate in insect hemolymph. I. Effect of injected L-glutamate. *Physiology Entomology* 4: 139-146
- Ishikawa H, Evans ML (1993)** The role of the distal elongation zone in the response of maize roots to auxin and gravity. *Plant Physiol.* 102: 1203–1210
- Jackson MB, Attwood P (1996)** Roots of willow (*Salix viminalis* L.) show marked tolerance to oxygen shortage in flooded soils and solution culture. *Plant and Soil*
- Jansson S, Douglas CJ (2007)** *Populus*: a model system for plant biology. *Ann. Rev. Plant Biology* 58: 435-458
- Jing ZP, Gallardo F, Pascual MB, Sampalo R, Romero J, de Navarra AT, Cañovas FM (2004)** Improved growth in a field trial of transgenic hybrid poplar overexpressing glutamate synthetase. *New Phytologist* 164: 137–145
- Jungk (2001)** Root hairs and the acquisition of plant nutrients from soil. *Journal of Plant Nutrition And Soil Science* 164: 121-129
- Kaplan F, y col. (2007)** Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of *Arabidopsis* reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content. *The Plant journal* 50: 967-981
- Kathiresan A, Miranda J, Chinnappa CC, Reid DM (1998)** γ -aminobutyric acid promotes stem elongation in *Stellaria longipes*. *Plant Growth Regul.* 26: 131-137
- Kathiresan A, Tung P, Chinnappa CC, Reid DM (1997)** γ -Aminobutyric acid stimulates ethylene biosynthesis in sunflower. *Plant Physiol.* 115: 129-135
- Kennedy RA, Rumpho ME, Fox TC (1992)** Anaerobic metabolism in plants. *Plant Physiology* 100: 1-6.
- Kim JH, Choi D, Kende H (2003)** The AtGRF family of putative transcription factor is involved in leaf and cotyledon growth in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 34: 94-104
- Kinnersley AM, Lin F (2000)** Receptor modifiers indicate that 4-aminobutyric acid GABA is a potential modulator of ion transport in plants. *Plant Growth Regul.* 32: 65-76
- Kinnersley AM, Turano FJ (2000)** γ -aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Critical Rev. Plant Sci.* 19: 479-509
- Kisaka H, Kida T, Miwa T (2006)** Antisense suppression of glutamate decarboxylase in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) results in accumulation of glutamate in transgenic tomato fruits. *Plant Biotechnology* 23: 267–274
- Ko JH, Beers EP, Han KH (2006)** Global comparative transcriptome analysis identifies gene network regulating secondary xylem development in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Genet. Genomics* 276: 517–531
- Kotchoni SO, Kuhns C, Ditzer A, Kirch HH, Bartels D (2006)** Overexpression of different aldehyde dehydrogenase genes in *Arabidopsis thaliana* confers tolerance

to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress. *Plant Cell Environ.* 29:1033–1048

- Krasensky J, Jonak C (2012)** Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of experimental botany* 63: 1593-1608
- Kreuzwieser J, Hauberg J, Howell KA, Carroll A, Rennenberg H, Millar HA, Whelan J (2009)** Differential Response of Gray Poplar Leaves and Roots Underpins Stress Adaptation during Hypoxia. *Plant Physiology* 149: 461–473
- Lacombe B, Becker D, Hedrich R, DeSalle R, Hollmann M, Kwak JM, Schroeder JI, Le Novere N, Nam HG, Spalding EP, Tester M, Turano FJ, Chiu J, Coruzzi G (2001)** The identity of plant glutamate receptors. *Science* 292: 1486-1487
- Lancien M, Roberts MR (2006)** Regulation of *Arabidopsis thaliana* 14-3-3 gene expression by γ -aminobutyric acid. *Plant Cell Environ.* 29: 1430-1436
- Lazof DB, Rufty Jr-TW, Redinbaugh MG (1992)** Localization of nitrate absorption and translocation within morphological regions of the corn root. *Plant Physiology* 100: 1251-1258
- Lewis OAM, James DM and Hewitt EJ (1982)** Nitrogen assimilation in barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Mazurka) in response to nitrate and ammonium nutrition. *Ann. Bot.* 49: 39–49
- Lee Y, Choi D, Kende H (2001)** Expansins: ever-expanding numbers and functions- *Current Opin. Plant Biology* 4: 527-532
- Lee SH, Johnson D, Walsh MP, Lierop J E Van, Sutherland C, Xu A, Snedden WA, Kosk-kosicka D, Fromm H, Narayanan N, Cho MJ (2000)** Differential regulation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent enzymes by plant calmodulin isoforms and free Ca^{2+} concentration. *Biochemistry Journal* 306: 299–306
- Lee JH, Kim YJ, Jeong DY, Sathiyaraj G, Pulla., Shim JS, In JG, Yang DC (2010)** Isolation and characterization of a glutamate decarboxylase (GAD) gene and their differential expression in response to abiotic stresses from *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Molecular Biology Reports* 37: 3455-3463
- Lep le JC, Brasileiro ACM, Michel MF, Delmotte F, Jouanine L (1992)** Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs. *Plant Cell Rep.* 11:137-141
- Liu X, Jin XHL (2014)** Identification and transcript analysis of two glutamate decarboxylase genes, CsGAD 1 and CsGAD 2, reveal the strong relationship between CsGAD 1 and citrate utilization in citrus fruit. *Mol. Biol. Rep* 41: 6253-6262
- Liu C, Zhao L, Yu G (2011)** The dominant glutamic acid metabolic flux to produce gamma-amino butyric acid over proline in *Nicotiana tabacum* leaves under water stress relates to its significant role in antioxidant activity. *Journal of integrative plant biology* 53: 608-618
- Long DM, Oaks A (1990)** Stabilization of Nitrate Reductase in Maize Roots by Chymostatin. *Plant Physiol.* 93(3): 846–850
- Love J, Bj rklund S, Vahala J, Hertzberg M, Kangasj rvi J, Sundberg B (2009)** Ethylene is an endogenous stimulator of cell division in the cambial meristem of

- Populus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106: 5984–5989
- Lucas WJ et al. (2013)** The Plant Vascular System: Evolution, Development and Functions. *J. Integr. Plant Biol.* 55: 294–388
- Ludewig F, Hüser A, Fromm H, Beauclair L, Bouché N (2008)** Mutants of GABA transaminase (POP2) suppress the severe phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase (ssadh) mutants in Arabidopsis. *PLoS ONE*, 3: e3383
- Mae N, Makino Y, Oshita S, Kawagoe Y, Tanaka A, Aoki K, Kurabayashi A, Akihiro T, Akama K, Koike S, Takayama M, Matsukura C, Ezura H (2012)** Accumulation mechanism of γ -aminobutyric acid in tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) under low O₂ with and without CO₂. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 1013–1019
- Merino I, Contreras A, Jing ZP, Gallardo F, Canovas FM, Gomez L (2014)** Plantation forestry under global warming: hybrid poplar with improved thermotolerance provide new insights on the in vivo function of small heat shock protein chaperones. *Plant Physiology* 164: 978-991
- Meyer A, Eskandari S, Grallath S, Rentsch D (2006)** AtGAT1, a high affinity transporter for gamma-aminobutyric acid in Arabidopsis thaliana. *The Journal of biological chemistry* 281: 7197-7204
- Michaeli S, Fait A, Lagor K, Nunes-Nesi A, Grillich N, Yellin A, Bar D, Khan M, Fernie AR, Turano FJ, Fromm H (2011)** A mitochondrial GABA permease connects the GABA shunt and the TCA cycle, and is essential for normal carbon metabolism. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 67: 485-498
- Michaeli S, Fromm H (2015)** Closing the loop on the GABA shunt in plants: are GABA metabolism and signaling entwined? *Front. Plant Sci.* 6: 1–7
- Mirabella R, Rauwerda H, Struys EA, Jakobs C, Triantaphylides C, Haring MA, Schuurink RC (2008)** The Arabidopsis her1 mutant implicates GABA in E-2-hexenal responsiveness. *Plant J.* 53: 197-213
- Miyashita Y, Good AG (2008)** Contribution of the GABA shunt to hypoxia-induced alanine accumulation in roots of Arabidopsis thaliana. *Plant & cell physiology* 49: 92-102
- Miyashita Y, Dolferus R, Ismond KP, Good AG (2007)** Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 49: 1108–1121
- Molina-Rueda JJ (2009)** ¿Están la glutamato descarboxilasa y la isocitrato deshidrogenasa citosólica implicadas en el desarrollo vascular de los árboles?. Tesis doctoral. Univesidad de Málaga
- Molina-Rueda JJ, Garrido-Aranda A, Gallardo F (2015)** Glutamate Decarboxylase. In *Amino Acids in Higher Plants*, J. P. Felix D’Mello, ed, pp. 129–141.
- Molina-Rueda JJ, Pascual MB, Canovas FM, Gallardo F (2010)** Characterization and developmental expression of a glutamate decarboxylase from maritime pine. *Planta* 232: 1471-1483
- Molina-Rueda, J.J. y col., 2015.** A putative role for γ -aminobutyric acid (GABA) in vascular development in pine seedlings. *Planta* 241: 257-267
- Murashige T, Skoog F (1962)** A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497

- Nakagami H, Sugiyama N, Mochida K, Daudi A, Yoshida Y, Toyoda T, Tomita M, Ishihama Y, Shirasu K (2010)** Plant Physiology 153: 1161-1174
- Narsai R, Howell KA, Carroll A, Ivanova A, Millar AH, Whelan J (2009)** Defining core metabolic and transcriptomic responses to oxygen availability in rice embryos and young seedlings. Plant Physiology 151: 306–322
- Nawy T, y col. (2005)** Transcriptional profile of the Arabidopsis root quiescent center. Plant Cell 17:1908–1925
- Nibau C, Gibbs DJ, Coates JC (2008)** Branching out in new directions: the control of root architecture by lateral root formation. New Phytologist 179: 595–614
- Oecking C, Jaspert N (2009)** Plant 14-3-3 proteins catch up with their mammalian orthologs. Curr. Opin. Plant Biol. 12: 760–765.
- Oh S-H, Choi W-G, Lee I-T, Yun SJ (2005)** Cloning and characterization of a rice cDNA encoding glutamate decarboxylase. J Biochem Mol Biol 38(5):595–601
- O'Neil KT, DeGrado WF (1990)** How calmodulin binds its targets: sequence independent recognition of amphiphilic alpha-helices. Trends in biochemical sciences 15: 59-64
- Ortega-Martinez O, Pernas M, Carol RJ, Dolan L (2007)** Ethylene Modulates Stem Cell Division in the Arabidopsis thaliana Root. Science 317, 507
- Palanivelu R, Brass L, Edlund AF, D P (2003)** Pollen tube growth and guidance is regulated by *POP2*, an *Arabidopsis* gene that controls GABA levels. Cell 114: 47-59
- Palomo J, Gallardo F, Suarez MF, Canovas FM (1998)** Purification and characterization of NADP β -linked isocitrate dehydrogenase from Scots Pine. Evidence for different physiological roles of the enzyme in primary development. Plant Physiol. 118: 617–626
- Pascual MB, Jing ZP, Kirby EG, Canovas FM, Gallardo F (2008a)** Response of transgenic poplar overexpressing cytosolic glutamine synthetase to phosphinotricin. Phytochemistry 69:382-389
- Pascual MB, Molina-Rueda JJ, Canovas FM, Gallardo F (2008b)** Spatial distribution of cytosolic NADP⁺-isocitrate dehydrogenase in pine embryos and seedlings. Tree physiology 28: 1773-1782
- Pate JS (1980)** Transport and partitioning of nitrogenous solutes. Annu. Rev. Plant Physiol. 31: 313–340
- Peat LJ, Tobin AK (1996)** The effect of nitrogen nutrition on the cellular localization of glutamine synthetase isoforms in barley roots. Plant Physiol. 111:1109–1117
- Pesquet E, Tuominen H (2011)** Ethylene stimulates tracheary element differentiation in *Zinnia elegans* cell cultures. New Phytology 190: 138-149
- Pires ND, Dolan L (2012)** Morphological evolution in land plants: new designs with old genes. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 367: 508–518.
- Pitre FE et al. (2010)** High nitrogen fertilization and stem leaning have overlapping effects on wood formation in poplar but invoke largely distinct molecular pathways. Tree Physiol. 30: 1273–89.
- Ramputh A, Bown A (1996)** Rapid [γ]-Aminobutyric acid synthesis and the inhibition of the growth and development of oblique-banded leaf-roller larvae.

Plant Physiology 111: 1349-1352

- Ranty B, Aldon D, Galaud JP (2006)** Plant calmodulins and calmodulin-related proteins: multifaceted relays to decode calcium signals. *Plant Signal. Behav.* 1: 96–104
- Regan S, Bourquin V, Tuominen H, Sundberg B (1999)** Accurate and high resolution in situ hybridization analysis of gene expression in secondary stem tissues. *Plant Journal* 19: 363–369
- Reggiani (2006)** A role for ethylene in low-oxygen signaling in rice roots. *Amino Acids* 30: 299-301
- Renault H, El Amrani A, Palanivelu R, Updegraff EP, Yu A, Renou JP, Preuss D, Bouchereau A, Deleu C (2011)** GABA accumulation causes cell elongation defects and a decrease in expression of genes encoding secreted and cell wall-related proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & cell physiology* 52: 894-908
- Renault H, Roussel V, El Amrani A, Arzel M, Renault D, Bouchereau A, Deleu C (2010)** The *Arabidopsis* pop2-1 mutant reveals the involvement of GABA transaminase in salt stress tolerance. *BMC Plant Biology* 10: 20
- Roberts MR, (2007)** Does GABA act as a signal in plants? Hints from molecular studies. *Plant Signa. Behav.* 2: 408–409
- Roberts JKM, Callis J, Jardetzky O, Walbot V, Freeling M (1984).** Cytoplasmic acidosis as a determinant of flooding intolerance in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 81: 6029 6033
- Robinson D (1994)** The responses of plants to non-uniform supplies of nutrients. *New Phytologist* 127: 635–674
- Rocha M, Sodek L, Licausi F, Hameed MW, Dornelas MC. van Dongen JT (2010)** Analysis of alanine aminotransferase in various organs of soybean (*Glycine max*) and in dependence of different nitrogen fertilisers during hypoxic stress. *Amino Acids* 39: 1043–1053
- Rubery PH, Northcote DH (1968)** Site of phenylalanine ammonia-lyase activity and the synthesis of lignin during xylem differentiation. *Nature* 219: 1230-1 232
- Ruelland E, Zachowski A (2010)** How plants sense temperature. *Enviromental and Experimental Botany* 69: 225-232
- Satyanarayan V, Nair PM (1990)** Metabolism, enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants. *Phytochemistry* 29: 367-375
- Schiefelbein JW (2000)** Constructing a plant cell. The genetic control of root hair development. *Plant Physiology* 124: 1525– 1531
- Scott-Taggart CP, Van Cauwenberghe OR, McLean MD, Shelp BJ (1999)** Regulation of γ -aminobutyric acid synthesis in situ by glutamate availability. *Physiology Plant* 106 (4): 363-369
- Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, MKwak J, Waner D (2001)** Guard cell signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:627–658
- Shelp BJ, Bown AW, McLean MD (1999)** Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends Plant Sci.* 4: 446-452
- Shelp BJ, Bozzo GG, Trobacher CP, Chiu G, Bajwa VS (2012a)** Strategies and tools for studying the metabolism and function of γ -aminobutyrate in plants. I.

- pathway structure. *Botany* 90: 651-668
- Shelp BJ, Bozzo GG, Trobacher CP, Zarei A, Deyman KL, Brikis CJ (2012b)** Hypothesis/ review: contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress. *Plant Science* 193-194, 130-135.
- Shelp BJ, Mullen RT, Waller JC (2012c)** Compartmentation of GABA metabolism raises intriguing questions. *Trends in plant science* 17: 57-59
- Shelp BJ, Bozzo GG, Zarei A, Simpson JP, Trobacher CP, Chiu G, Allan WL (2012d)** Strategies and tools for studying the metabolism and function of γ -aminobutyrate in plants. II. Integrated analysis. *Botany* 90: 781-793
- Shi SQ, Shi Z, Jiang ZP, Qi LW, Sun XM, Li CX, Liu JF, Xiao WF, Zhang SG (2010)** Effects of exogenous GABA on gene expression of *Caragana intermedia* roots under NaCl stress: regulatory roles for H₂O₂ and ethylene production. *Plant, cell & environment* 33: 149-162
- Shimajiri Y, Oonishi T, Ozaki K, Kainou K, Akama K (2013)** Genetic manipulation of the gamma-aminobutyric acid (GABA) shunt in rice: overexpression of truncated glutamate decarboxylase (GAD2) and knockdown of gamma-aminobutyric acid transaminase (GABA-T) lead to sustained and high levels of GABA accumulation in rice kernels. *Plant biotechnology journal* 11: 594-604
- Shin S, Kim H, Joo Y, Lee S, Lee Y, Lee SJ, Lee D (2014)** Characterization of Glutamate Decarboxylase from *Lactobacillus plantarum* and Its C-Terminal Function for the pH Dependence of Activity. *J. Agric. Food Chem.* 62: 12186–12193
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000)** Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. 3: 217–223
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1997)** Gene expression and ZhangC-s, LuQ, Verma DPS. 1995. Removal of feedback signal transduction in water-stress response. *Plant Physiology* 115: 327–334
- Simpson JP, Di Leo R, Dhanoa PK, Allan WL, Makhmoudova A, Clark SM, Hoover GJ, Mullen RT, Shelp BJ (2010)** Characterization and identification of a plastid-localized *Arabidopsis* glyoxylate reductase isoform: comparison of a cytosolic isoform and implication for cellular redox homeostasis and aldehyde detoxification. *Journal of Experimental Biology* 59: 2545-2554
- Sjodin A, Street NR, Sandberg G, Gustafsson P, Jansson S (2009)** The *Populus* Genome Integrative Explorer (PopGenIE): a new resource for exploring the *Populus* genome. *The New phytologist* 182: 1013-1025
- Smertenko A, Blume A, Viklicky V, Draber P (1997)** Exposure of tubulin structural domains in *Nicotiana tabacum* microtubules probed by monoclonal antibodies. *European Journal of Cell Biology* 72:104-112
- Smith S, De Smet I (2012)** Root system architecture: insights from *Arabidopsis* and cereal crops. *Phil. Trans. R. Soc. B* 367: 1441–1452
- Snedden WA, Koutsia N, Baum G, Fromm H (1996)** Activation of a recombinant *petunia* glutamate decarboxylase by calcium/calmodulina or by a monoclonal antibody which recognizes the calmodulina binding domain. *The journal of Biological Chemistry* 271: 4148-53

- Sorce C, Giovannelli A, Sebastiani L, Anfodillo T (2013)** Hormonal signals involved in the regulation of cambial activity, xylogenesis and vessel patterning in trees. *Plant Cell Rep.* 32: 885–898
- Sterky F, Bhalerao RR, Unneberg P, Segerman B, Nilsson P, Brunner AM, Charbonnel-Campaa L, Lindvall JJ, Tandré K, Strauss SH, Sundberg B, Gustafsson P, Uhlén M, Bhalerao RP, Nilsson O, Sandberg G, Karlsson J, Lundeberg J, Jansson S (2004)** A *Populus* EST resource for plant functional genomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:13951-13956
- Stockinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF (1997)** Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1035-1040
- Subbaiah C, Sachs M (2003)** Molecular and cellular adaptations of Maize to flooding . *Annals of Botany* 90:119-127
- Sukhareva BS, Mamaeva OK (2002)** Glutamate decarboxylase: computer studies of enzyme evolution. *Biochemistry. Biokhimiia* 67: 1180-1188
- Suzuki N, Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Mittler R (2005)** Enhanced Tolerance to Environmental Stress in Transgenic Plants Expressing the Transcriptional Coactivator Multiprotein Bridging Factor 1c. *Plant Physiology* 139:1313–1322
- Suzuki N, Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Mittler R (2008)** The Transcriptional Co-activator MBF1c Is a Key Regulator of Thermotolerance in Arabidopsis thaliana. *J. Biol. Chem.* 283:9269-9275
- Sweetlove LJ, Beard KFM, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Ratcliffe RG (2010)** Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. *Trends Plant Sci.* 15: 462-470
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013)** MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725–2729
- Taylor G (2002)** Populus: Arabidopsis for forestry. Do we need a model tree? *Annals of Botany* 90: 681-689
- Tcherkez G, Mahé A, Gauthier P, Mauve C, Gout E, Bligny R, Cornic G, Hodges M (2009)** In Folio Respiratory Fluxomics Revealed by ¹³C Isotopic Labeling and H/D Isotope Effects Highlight the Noncyclic Nature of the Tricarboxylic Acid "Cycle" in Illuminated Leaves. *Plant Physiol.* 151: 620-630
- Timell T (1986)** Compression wood in gymnosperms (Springer-Verlag: New York)
- Trobacher CP, y col. (2013)** Calmodulin-dependent and calmodulin-independent glutamate decarboxylases in apple fruit. *BMC plant biology* 13: 144
- Tsuchida T, Mashiko K, Yamada K, Hiratsuka H, Shimada T, Itagaki Y, Fujinuma H, Samejima K, Nakamura T, Hasegawa T, Matsubayashi T (2003)** Clinical Study of .GAMMA.-Aminobutyric Acid-rich Chlorella for Subjects with High-normal Blood Pressure and Mild Hypertension. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* 56: 97-102
- Turano FJ, Fang TK (1998)** Characterization of two glutamate decarboxylase cDNA clones from Arabidopsis. *Plant Physiol* 117:1411–1421
- Tuskan GA, DiFazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, y col. (2006)** The

BIBLIOGRAFÍA

genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313:1596-1604

- Ueno H, Inoue Y, Matsukawa S, Nakamura Y (2012)** Glutamate decarboxylase. In: D'Mello JPF (ed) *Amino Acids in Human Nutrition and Health*. CAB International, pp 103-120
- Uemura M, Warren G, Steponkus PL (2003)** Freezing sensitivity in the SFR4 mutant of *Arabidopsis* is due to low sugar content and is manifested by loss of osmotic responsiveness. *Plant Physiology* 131: 1800–1807
- Urano K, y col. (2009)** Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in *Arabidopsis* by metabolomics. *The Plant journal* 57: 1065-1078
- Vartapetian BB, Jackson MB (1997)** Plant adaptations to anaerobic stress. *Annals of Botany* 79: 3–20
- Vetter SW, Leclerc E (2003)** Novel aspects of calmodulin target recognition and activation. *Eur. J. Biochem.* 270: 404–414
- Vollenweider P, Gunthardt-Goerg MS (2005)** Erratum to “Diagnosis of abiotic and biotic stress factors using the visible symptoms in foliage”. *Environmental Pollution* 140: 562-571
- Wahid A, Gelani S, Ashraf M, Foolad MR (2007)** Heat tolerance in plants: an overview. *Environ. Exp. Bot.* 61: 199–223
- Walch-Liu P y col. (2006)** Evidence that L-glutamate can act as an exogenous signal to modulate root growth and branching in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 47:1045-57
- Walch-Liu P, Forde BG (2008)** Nitrate signaling mediated by the NRT1.1 nitrate transporter antagonises L-glutamate-induced changes in root architecture. *The Plant Journal* 54: 820–828
- Wallace W, Secor J, Schrader LE (1984)** Rapid accumulation of [gamma]-Aminobutyric acid and alanina in Soybean leaves in response to an abrupt transfer to lower temperature, darkness or mechanical manipulation. *Plant Physiology* 75: 170-175
- Wang C, Fan L, Gao H, Wu X, Li J, Lv G, Gong B (2014)** Polyamine biosynthesis and degradation are modulated by exogenous gamma-aminobutyric acid in root-zone hypoxia-stressed melon roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 82: 17-26
- Wang YY, Hsu PK, Tsai YF (2012)** Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends in Plant Science* 17: 1360-1385
- Wanner LA, Junttila O (1999)** Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 120: 391–399
- Watanabe M (2014)** The role of GABA in the regulation of GnRH neurons. *Front Neurosci.* 8: 1–9
- Wei J, Davis KM, Wu H, Wu J, Sciences B, Atlantic F, Uni V, Raton B (2004)** Protein Phosphorylation of Human Brain Glutamic Acid Decarboxylase (GAD) 65 and GAD67 and Its Physiological Implications. *Biochemistry* 65: 6182–6189
- Willis K, McElwain J (2002)** *The Evolution of Plants* (Oxford University Press, NY, USA)
- Wirth, J. et al. (2007)** Regulation of root nitrate uptake at the NRT2.1 protein level in

BIBLIOGRAFÍA

- Arabidopsis thaliana. J. Biol. Chem. 282: 23541–23552
- Wong CG, Bottiglieri T, Snead OC (2003)** GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease. Ann Neurol 54 suppl 6: S3-12
- Worku D (2012)** Phenotypic and chemotypic characterization of GABA-shunt mutants in Arabidopsis thaliana. Dissertation
- Wu Y, Deng Z, Lai J, Zhang Y, Yang C, Yin B, Zhao Q, Zhang L, Li Y, Yang C, et al. (2009)** Dual function of Arabidopsis ATAF1 in abiotic and biotic stress responses. Cell Res. 19: 1279–1290
- Yang T, Poovaiah BW (2003)** Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. TRENDS in Plant Science 8: 1360-1385
- Yang YF, Zhu T, Niu DK (2013)** Association of intron loss with high mutation rate in Arabidopsis: implications for genome size evolution. Genome biology and evolution 5: 723-733
- Yevtushenko DP, McLean MD, Peiris S, Van Cauwenberghe OR, Shelp BJ (2003)** Calcium/calmodulin activation of two divergent glutamate decarboxylases from tobacco. J Exp Bot 54:2001–2002
- Yin YQ, Yang RQ, Gu ZX (2014)** Calcium regulating growth and GABA metabolism pathways in germinating soybean (Glycine max L.) under NaCl stress. Eur. Food Res. Technol. 239: 149-156
- Yoon GM, Kieber JJ (2013)** 14-3-3 Regulates 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Synthase Protein Turnover in Arabidopsis. Plant Cell 25: 1016-1028
- Yu G, Liang J, He Z, Sun M (2006)** Quantum dot-mediated detection of gamma-aminobutyric acid binding sites on the surface of living pollen protoplasts in tobacco. Chemistry & biology 13: 723-731
- Zhang J, Davis WJ (1987)** ABA in roots and leaves of flooded pea plants. Journal of Experimental Botany 38: 649-659
- Zhang H, Forde BG (1998)** An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. Science 279: 407–409.
- Zhang H, Forde BG (2000)** Regulation of Arabidopsis root development by nitrate availability. Journal of Experimental Botany 51: 51–59
- Zhang L, Xi D, Li S, Gao Z, Zhao S, Shi J, Wu C, Guo X (2011)** A cotton group C MAP kinase gene, GhMPK2, positively regulates salt and drought tolerance in tobacco. Plant Molecular Biology 77: 17–31
- Zik M, Arazi T, Snedden WA, Fromm H (1998)** Two isoforms of glutamate decarboxylase in Arabidopsis are regulated by calcium/calmodulin and differ in organ distribution. Plant Mol. Biol. 37: 967– 975
- Zik M, Fridmann-Sirkis Y, Fromm H (2006)** C-terminal residues of plant glutamate decarboxylase are required for oligomerization of a high-molecular weight complex and for activation by calcium/calmodulin. Biochimica et biophysica acta 1764: 872-876
- Zhu JK (2001)** Plant salt tolerance. Trends in Plant Science 6: 66–71

