

ULL

Universidad
de La Laguna



Facultad de Ciencias
Sección BIOLOGÍA



Caracterización molecular de la ruta de activación del gen *P5CS1*

Molecular characterization of the activation
pathway of the gene *P5CS1*

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biología

Francisco Javier García Machado

Julio 2015

SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO Curso Académico: 2014/2015	ENTRADA Fecha: Núm:
--	--------------------------------------

Datos Personales



Nº DNI o pasaporte:	Nombre y Apellidos:
78592402-E	Francisco Javier García Machado
Teléfono:	Dirección de correo electrónico:
608985014	fjaviergarma@gmail.com

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

TÍTULO

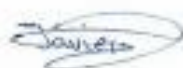
Caracterización molecular de la ruta de activación del gen *P5CS1*

Autorización para su depósito, defensa y evaluación

D./Dña. Andrés Borges Rodríguez	
Profesor/a del Departamento de Agrobiología, IPNA-CSIC	
y D./Dña. Francisco Valdés González	
Profesor/a del Departamento de Biología Vegetal	
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado	
Fdo.: 	Fdo.: 

La Laguna, a 6 de julio de 2015

Firma del interesado/a



SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA

Resumen

La sequía y el aumento de la salinidad en suelos y aguas, son los dos estreses abióticos que más significativamente inciden en la pérdida de rendimiento de los cultivos. Entre los mecanismos que las plantas emplean para defenderse de ambos estreses la acumulación del aminoácido prolina, como osmolito compatible, es uno de los más importantes. A nivel molecular, la expresión de algunos factores de transcripción ha mostrado ser crucial en la señalización en respuesta al estrés abiótico. Entre estos factores de transcripción, se encuentran los codificados por la familia multigénica ZAT, entre los que destaca ZAT12. Para estudiar el papel de ZAT12, se llevó a cabo un estudio comparativo en condiciones de cultivo hidropónico, entre el ecotipo salvaje de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Col-0) y una línea mutante para el gen *ZAT12*, analizando la expresión del gen responsable de la biosíntesis de prolina, *P5CS1*, y la acumulación de este osmolito compatible a distintos tiempos tras la adición de NaCl y sorbitol. Mediante análisis molecular se determinó que el mutante estudiado no se correspondía realmente con el KO-*ZAT12*. Sin embargo, este mutante acumuló a las 72 h más prolina que Col-0 en respuesta a sorbitol. Su posible papel en respuesta al estrés osmótico es discutido.

Drought and increased of salinity in soils and water, are the two abiotic stresses that more significantly affect to the loss of crops yield. Among the mechanisms that plants use to face both stresses the accumulation of the amino acid proline, as compatible osmolite, is one of the most important. At molecular level, the expression of some transcription factors has showed to be crucial in the signalling in response to abiotic stress. Among these transcription factors, are those codified by the multigenic family ZAT, between them stand out ZAT12. To study the role of ZAT12, it was carried out a comparative study under hydroponic conditions, between the wild-type ecotype Col-0 of *Arabidopsis thaliana* and a mutant line for the gene *ZAT12*, analysing expression of the gene involved in proline biosynthesis, *P5CS1*, and the accumulation of this compatible osmolite at different time-points after the addition of NaCl and sorbitol. Through a molecular analysis was determined that the mutant studied was not a real KO-*ZAT12*. However, the mutant accumulates at 72 h more proline than Col-0 in response to sorbitol. It is possible role in response osmotic stress is discussed.

Palabras clave: estrés osmótico, estrés salino, factores de transcripción, *P5CS1*, prolina, *ZAT12*

Keywords: osmotic stress, *P5CS1*, proline, saline stress, transcription factors, *ZAT12*

Índice

	Página
Introducción	1
Materiales y métodos	3
Material vegetal	3
Condiciones de cultivo en hidroponía	3
Tratamientos y recolección de muestras	5
Extracción de ácidos nucleicos y síntesis de ADN complementario (ADNc)	5
PCR directa	5
PCR semicuantitativa	6
Análisis de amplicones por electroforesis	7
Cuantificación de prolina	7
Análisis estadístico	7
Resultados y discusión	8
Obtención del genotipo homocigótico	8
Análisis de expresión del gen <i>ZAT12</i>	9
Análisis bioinformático de la línea SALK 117922.38.70.X	10
Análisis de expresión del gen <i>P5CS1</i>	13
Acumulación de prolina	14
Conclusiones	15
Bibliografía	16
Anexo	18

Introducción

Debido a su condición de organismos sésiles, las plantas, a lo largo de la evolución, han tenido que desarrollar numerosos mecanismos para hacer frente a condiciones adversas. Estas condiciones adversas pueden deberse a factores ambientales, lo que se denomina estrés abiótico, tales como el estrés hídrico, salino, térmico, etc., o a la interacción con otros organismos (estrés biótico), entre los que se incluyen otras plantas, hongos, bacterias, etc. (Bohnert *et al.*, 2006). Ashraf y colaboradores (2008) señalan a los estreses abióticos como los principales responsables de las pérdidas en los cultivos, entre ellos destacan la sequía y la salinidad de suelos y aguas. Esta merma en la productividad agrícola afecta a cerca del 37 % del total de tierras cultivables en el mundo (Munns y Tester, 2008; Reynolds y Tuberosa, 2008).

El estrés salino es generado por la acumulación de sales solubles en la solución del suelo, lo que incide sobre el crecimiento y desarrollo vegetal impidiendo a las raíces incorporar agua y posteriormente desarrollando fenómenos de toxicidad al aumentar la absorción de dichas sales (Munns y Tester, 2008). Las especies iónicas que normalmente más contribuyen a la salinidad del medio es el catión Na^+ y el anión Cl^- , debido a que se encuentran de manera predominante en la mayoría de las aguas y suelos salinos, particularmente en las zonas costeras (Jaleel *et al.*, 2008). Por esta razón, aunque se puede generar toxicidad con otros compuestos, se suele emplear comúnmente en condiciones de laboratorio el cloruro sódico para provocar un estrés por sal a la planta (Jaleel *et al.*, 2007). El estrés por sequía, se debe a un descenso de la cantidad de agua disponible para la planta (Farooq *et al.*, 2008), dando como resultado una reducción drástica del crecimiento de la planta. La sequía tienen una amplia gama de efectos desde el nivel fisiológico, molecular y bioquímico, siendo evidentes en todos los estadios de crecimiento de la planta donde el déficit hídrico tenga efecto, desde la germinación (Harris *et al.*, 2002) hasta la planta adulta en sus relaciones hídricas (Egilla *et al.*, 2005). La sequía en condiciones de laboratorio se simula agregando a medios de cultivo o soluciones hidropónicas sustancias osmóticas como manitol, sorbitol o polietilenglicol (Verslues *et al.*, 2006).

Sequía y salinidad generan una dificultad para que las plantas puedan acceder al agua que se encuentra en el suelo. En este sentido, ambos estreses tienen un alto grado de similitud en su respuesta fisiológica, bioquímica y molecular (Sairam y Tyagi, 2004). Por otro lado, la sequía fisiológica ocurre cuando las sales solubles se encuentran en altas concentraciones en la

solución del suelo, limitando la toma de agua por la planta debido al bajo potencial hídrico que se genera (Carrow y Duncan, 1998). De esta forma, las plantas pueden ajustar su potencial osmótico generando un potencial hídrico menor que el de la solución del suelo, y así poder acceder al agua presente (Taiz y Zeiger, 2006). El ajuste osmótico descrito es una de estas vías comunes tanto para el estrés por salinidad como por sequía (Munns y Tester, 2008; (Lemcoff *et al.*, 2002; respectivamente). Este ajuste puede ser realizado por la acumulación de sustancias osmóticamente activas, también denominados osmolitos compatibles, tales como la glicina, la betaína y el aminoácido prolina, siendo este último uno de los más empleados por las plantas para el ajuste osmótico en respuesta a condiciones de estrés (Szabados y Saviouré, 2009).

La biosíntesis de prolina tiene lugar tanto en el citoplasma como en los cloroplastos. La síntesis constitutiva de prolina se realiza en el citoplasma y en la especie vegetal modelo, *Arabidopsis thaliana*, es controlada por el gen *P5CS2* (Székely *et al.*, 2008). Sin embargo, el aumento de la concentración en condiciones de estrés está controlado por el gen *P5CS1* y tiene lugar principalmente en los cloroplastos (Székely *et al.*, 2008). La activación de este gen es debida a dos vías independientes, inducidas por estrés osmótico o salino: la vía promovida por el estrés salino, es independiente del ácido absícico (ABA) e implica la participación de una Fosfolipasa C y un factor de transcripción denominado MYB2, que activa la señalización mediada por Ca^{2+} -calmodulina (Parre *et al.*, 2007). La otra vía, inducida por el estrés osmótico, ABA-dependiente, es controlada por el gen *ABII* y la señalización es mediada por el peróxido de hidrógeno (Szabados y Saviouré, 2009).

Estudios previos realizados por el grupo de investigación donde ha sido desarrollado este Trabajo de Fin de Grado, sugieren que la biosíntesis de prolina a través del gen *P5CS1* podría estar en parte controlada por una familia multigénica de factores de transcripción denominada ZAT. En concreto, *ZAT12*, es un gen fundamental en la señalización por especies del oxígeno reactivo (ROS) en *Arabidopsis thaliana* bajo condiciones de estrés abiótico (Davletova *et al.*, 2005). En plantas de *Arabidopsis* bajo condiciones de estrés salino tras la adición de 50 mM de NaCl al medio hidropónico (Jiménez-Arias *et al.*, 2015; Jiménez-Arias *et al.*, 2015, en revisión) se observó como este factor de transcripción tras 6 horas de tratamiento, incrementó su nivel relativo de expresión 4 veces con respecto a las plantas del grupo Control (sin tratamiento). Asimismo, tras 12 horas de tratamiento con NaCl, se observó un aumento significativo de la expresión de *P5CS1* y la acumulación de prolina. Además, cuando las

plantas fueron pretratadas en semilla con un agente inductor de primado¹, en concreto el MSB (Menadiona Sodio Bisulfito, derivado hidrosoluble de la vitamina K₃), ambos genes se expresaron antes (*ZAT12* tan sólo a 1 hora tras la adición de la sal y *P5CSI* a las 6 horas), lo que señala una secuencialidad en la activación de ambos genes (Jiménez-Arias *et al.*, 2015; Jiménez-Arias *et al.*, 2015, en revisión).

El objetivo de este trabajo es dilucidar si el factor de transcripción *ZAT12* se encuentra relacionado con la biosíntesis de prolina en un contexto de estrés abiótico. Para la consecución de este objetivo, se llevó a cabo un estudio comparativo en condiciones de cultivo hidropónico, entre el ecotipo salvaje de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Col-0) y una línea mutante de esta para el gen *ZAT12*, analizando la expresión del gen responsable de la biosíntesis de prolina, *P5CSI*, y la acumulación de este osmolito compatible a distintos tiempos tras la adición de NaCl y sorbitol.

Materiales y métodos

Material vegetal

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (ecotipo Col-0) se obtuvieron de Leslhe Seeds (USA), mientras que las semillas mutantes (línea SALK_117922.38.70.x) se obtuvieron del Centro Europeo de Arabidopsis-NASC de la colección de semillas cedida por Joseph R. Ecker. Ambas líneas se conservaron a temperatura ambiente y oscuridad hasta su utilización. Previamente a su germinación, las semillas fueron estratificadas durante dos días en agua destilada y oscuridad a una temperatura de 4° C.

Condiciones de cultivo en hidroponía

Para el cultivo de plantas necesarias para los ensayos se empleó un sistema de cultivo hidropónico (Figura 1). Este sistema se estableció en cubetas de hidroponía con 1,9 L de capacidad (Araponics®) donde se hicieron crecer 18 plantas por recipiente. Una mezcla de arena de río de dos granulometrías distintas fue usada como sustrato físico. Las semillas fueron sembradas en contenedores de semillas (*seed-holders*), que se depositaron durante una semana en un pequeño invernadero, consistente en una bandeja de polietileno de alta

¹ Estado de sensibilización inducido en la planta tras un primer episodio de estrés que se traduce en una respuesta fisiológica más eficaz frente a un segundo estrés

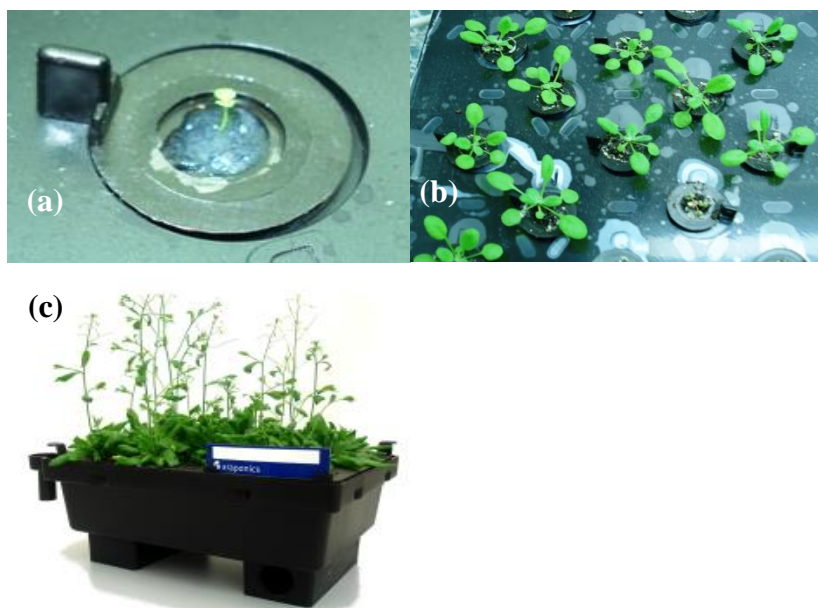


Figura 1.- Crecimiento de *A. thaliana* en el sistema de hidroponía de Araponics[®]. Cotiledón de *A. thaliana* germinado en un *seed-holder* (a); plantas de 3 semanas de *A. thaliana* (b); plantas de 5 semanas de *A. thaliana* en fase de floración (c).

densidad con arena de río (arena silíceá lavada, con granulometría media) con agua destilada estéril cubierta con una lámina plástica transparente, que fue depositado en una cámara de cultivo a $22 \pm 2^\circ \text{C}$, con un fotoperiodo de 16 horas de luz ($100\text{-}110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de PAR) y con un 100% de humedad relativa. Tras una semana, los *seed-holders* con las plántulas fueron transferidas a las cubetas de hidroponía en las mismas condiciones de fotoperiodo e intensidad lumínica, pero con un 60-70% de humedad relativa. Las plántulas se mantuvieron sin aireación durante la primera semana, a partir de ella la solución (Tabla 1) fue generosamente aireada mediante bombas de aireación y fue renovada cada 7 días.

Tabla 1. Componentes de la solución hidropónica.

Macronutrientes (mM)	Micronutrientes (μM)
KNO_3 (1,25)	H_3BO_3 (50)
KH_2PO_4 (0,5)	$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (10)
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0,75)	$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (2)
$\text{Ca} (\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (0,75)	$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (1,5)
	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$ (0,075)
	Sequestrene [®] (44,8)

Tratamientos y recolección de muestras

Transcurridos 27 días desde la siembra, las plantas (Col-0 y mutante) fueron sometidas a dos tratamientos: 50 mM de NaCl y 100 mM de sorbitol mediante su adición directamente a la solución nutritiva. Para los ensayos de biología molecular se recogieron 4 plantas (100 mg aproximadamente) de cada tratamiento a las 6 y 12 horas. En el caso de la cuantificación de prolina se tomaron 6 plantas a las 24 y 72 horas de cada tratamiento. Además, tanto para los ensayos de biología molecular como para los de prolina, se recogieron plantas sin tratar y fueron utilizadas como controles para cada uno de los tiempos. Una vez recogidas, las muestras se conservaron a -80° C hasta su utilización.

Extracción de ácidos nucleicos y síntesis de ADN complementario (ADNc)

La extracción de ADN genómico (ADNg) para PCR directa se llevó a cabo utilizando un kit comercial (Extract-N-AmpTM Plant PCR kits, Sigma-Aldrich) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La purificación de ARN total también se realizó mediante un kit comercial (E.Z.N.A.[®] Plant RNA Kit, Omega) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se cuantificó el ARN obtenido mediante la absorbancia a 260 nm y se comprobó su pureza usando el ratio 260/280 nm. Para disminuir la contaminación por ADNg, 2 µg de ARN fueron sometidos a tratamiento con DNasa-I (DNase Free Kit, Ambion). Tras el tratamiento con DNasa-I, una alícuota de 1 µg de ARN se sometió a transcripción inversa empleando un kit comercial (IScriptTM cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad), siguiendo las recomendaciones propuestas por el fabricante, mientras que la otra fue diluida hasta un volumen de 200 µl, a modo de control negativo. El ADNc obtenido se diluyó hasta un volumen final de 200 µl con agua destilada. La posible interferencia de contaminaciones de ADNg en los ensayos de PCR semicuantitativa fue evaluada incorporando los pertinentes controles negativos de las muestras de ADNc.

PCR directa

A partir del ADNg extraído se prepararon las reacciones de PCR con un volumen final de 20 µl. El contenido de cada reacción se muestra en la Tabla 2. El programa de PCR usado fue: 30 s de desnaturalización inicial a 98° C; 35 ciclos de amplificación que incluían 5 s de

desnaturalización a 98° C, 20 s de anillado a 60° C y 45 s de extensión a 72° C; 5 min de extensión final a 72° C.

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores para las reacciones de amplificación (Anexo 1) fueron diseñados con el programa GeneRunner. La especificidad de los cebadores fue comprobada mediante una herramienta informática (PCR electrónica) implementada en la aplicación web Primer-BLAST (NCBI).

Tabla 2. Componentes de las reacciones de PCR.

Componente	20 µl de reacción	Concentración final
ADNg	2 µl	
Primer directo	3 µl	0,4 µM
Primer reverso	3 µl	0,4 µM
25 mM dNTPs	0,4 µl	500 µM cada uno
5x Phire [®] Reaction Buffer	4 µl	1x
Phire [®] Hot Start II DNA Polymerase	0,4 µl	
H ₂ O	7,2 µl	

PCR semicuantitativa

Para analizar la expresión de *P5CSI* y comprobar si el gen *ZAT12* se expresaba o no en la línea mutante, se realizó una PCR semicuantitativa utilizando el ADNc obtenido mediante transcripción inversa. Las reacciones de PCR utilizadas tenían el mismo contenido que las de PCR directa (Tabla 2), usando los cebadores del Anexo 1. El programa de PCR también fue el mismo en el caso de *ZAT12* pero para *P5CSI* se modificó el número de ciclos de amplificación. Para la amplificación del gen *P5CSI* las reacciones se sometieron a 25 ciclos y a 30 ciclos de amplificación. Se utilizó un transiluminador para visualizar las bandas de ADN con luz azul y estas fueron utilizadas para su estudio de expresión relativa mediante el programa de análisis de imágenes ImageJ.

Análisis de amplicones por electroforesis

Los amplicones obtenidos tanto por PCR directa como por semicuantitativa, se sometieron a una electroforesis en agarosa 1,5%. Se cargó en cada pocillo 10 µl de producto de PCR con 5 µl de tampón de carga (3x DNA loading), usando como agente intercalante Gel Green (Biotium) en una proporción 1:10000 y se aplicó un voltaje de 120 voltios durante 40 minutos. Se utilizó un transiluminador para visualizar las bandas de ADN con luz azul. Para la electroforesis del genómico se utilizó el marcador GeneRuler™ 100 pb DNA Ladder, mientras que para el resto de electroforesis se utilizó GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder.

Cuantificación de prolina

El contenido en prolina fue determinado siguiendo las recomendaciones de Bates y colaboradores (Bates, *et al.*, 1973) con pequeñas modificaciones. La prolina fue extraída a partir de 100 mg de tejido fresco, que fue inmediatamente introducido en nitrógeno líquido, homogeneizado y mezclado con 4 ml de ácido sulfosalicílico al 3%. Tras centrifugación a 12000 x g durante 30 minutos, 2 ml del extracto se hicieron reaccionar con 2 ml de ninhidrina ácida durante 60 min a 100° C. Pasado este tiempo se paró la reacción usando un baño de hielo. La mezcla de reacción fue extraída con 4 ml de tolueno y se mezcló en un vórtex. La absorbancia de la fase orgánica fue medida a 520 nm en un espectrofotómetro (Simatzu UV-Visible Recording Spectrophotometer, Japan). La cantidad de prolina se determinó a partir de una curva de calibrado con concentraciones conocidas de prolina y se normalizó en base al peso fresco inicial.

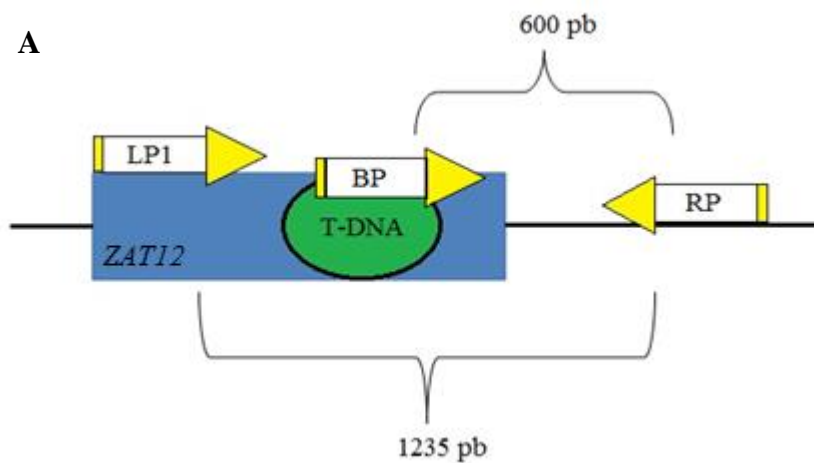
Análisis estadístico

Los datos de las diferentes variables fueron sometidos a la prueba de normalidad usando el test de Kolmogorov-Smirnov con la corrección Lilliefors. Para comprobar la homocedasticidad de los datos se empleó el test de Levene. Como los datos se comportaron siguiendo una distribución normal sus medias se compararon mediante one-way ANOVA y las diferencias significativas fueron calculadas utilizando el test *post hoc* de Tamhane para los datos de acumulación de prolina a 24 h y el test de Bonferroni para los de 72 h (Anexo 2). Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete informático SSPS versión 20 para Windows.

Resultados y discusión

Obtención del genotipo homocigótico

Con el fin de comprobar la homocigosis del mutante de *ZAT12* (línea SALK_117922.38.70.x), previa extracción y amplificación por PCR de ADNg del material vegetal procedente de este mutante, se procedió al análisis de los amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa. Además, se incluyó el ecotipo salvaje Col-0, que fue utilizado para comprobar la presencia del alelo salvaje (no inserción), tal y como se indica en el esquema de la Figura 2A. Como se observa en la Figura 2B, cuando dos plantas representativas de la línea mutante, Mut1 y Mut2, se sometieron a amplificación usando los cebadores para la inserción (BP/RP), ambos amplificaron para el tamaño de amplicón esperado, pero cuando se emplearon los cebadores para el alelo salvaje (LP1/RP) no se detectó ninguna banda. Este último resultado indica que no hubo amplificación debido a la presencia del inserto. Por tanto, se concluyó que las dos plantas analizadas eran homocigóticas para el alelo mutante.



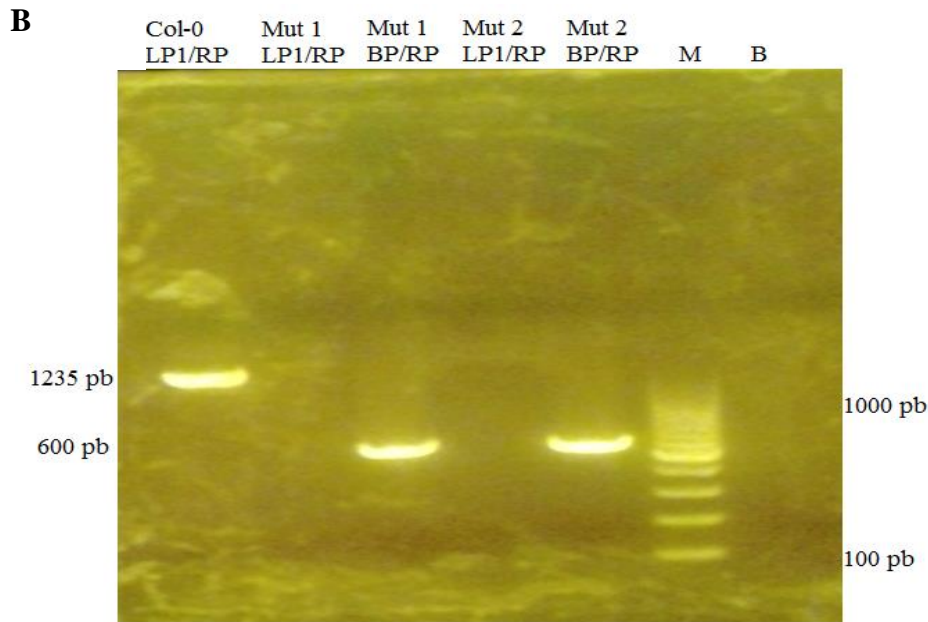


Figura 2.- Esquema de la inserción del T-DNA y de las posiciones de los distintos cebadores para comprobar la homocigocis del mutante (A); Amplicones de la PCR (B); LP1/RP, cebadores para el alelo salvaje; BP/RP, cebadores para el alelo mutante; M, marcador de peso molecular GeneRuler™ 100 pb DNA Ladder; B, control negativo sin ADN molde.

Análisis de expresión del gen *ZAT12*

Una vez determinado que las plantas obtenidas eran homocigóticas para la inserción, procedimos a comprobar si efectivamente éstas no eran capaces de expresar el gen *ZAT12*. Para ello, llevamos a cabo un análisis mediante RT-PCR semicuantitativa previa extracción del ARN total y la posterior síntesis de ADNc. Tal y como se observa en la Figura 3, tanto en el ecotipo salvaje Col-0, donde *ZAT12* se expresa cuando la planta es sometida a estrés salino y osmótico (Davletova *et al.*, 2005), como en las teóricos mutantes *ZAT12* homocigóticos, amplificaron una banda para el tamaño esperado de este gen. Este último resultado imprevisto nos hizo replantearnos si realmente las semillas obtenidas del NASC eran los mutantes esperados de *ZAT12*.

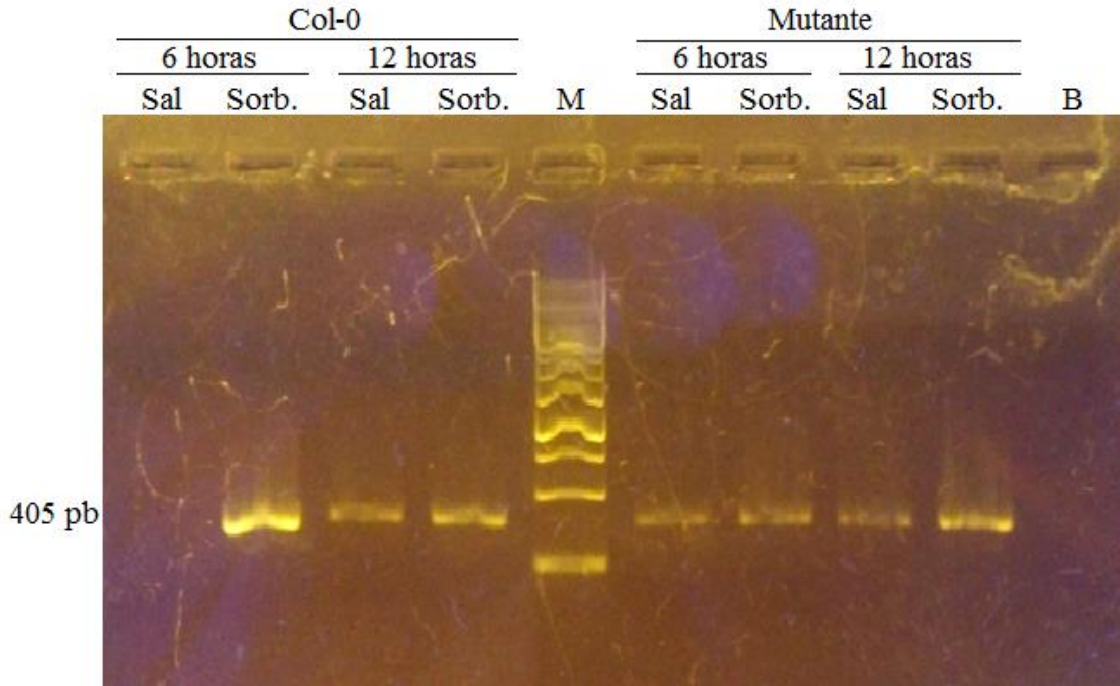


Figura 3.- Resultado de la amplificación del gen *Zat12* para el ecotipo salvaje Col-0 y para el mutante tras la adición de sal y sorbitol a diferentes tiempos; M, marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder; B, control negativo sin ADN molde.

Análisis bioinformático de la línea SALK 117922.38.70.X

En primer lugar, utilizando la herramienta online Seq-viewer que se encuentra dentro de la base de datos de *Arabidopsis thaliana* (www.arabidopsis.org), pudimos comprobar como el inserto de la línea Salk se encuentra en la región intergénica inmediatamente posterior al gen *ZAT12* (Figura 4A). En concreto, entre este gen y otro gen de función desconocida (*At5g59830*) (Figura 4B). Por tanto, atribuimos este fallo en la posición del inserto a un error en la anotación en la base de datos del NASC en el momento de solicitar las semillas, ya que al solicitar una línea mutante para el gen *ZAT12* ésta era la única disponible. Actualmente, la anotación ha sido corregida (Anexo 3) y el inserto realmente se encuentra unas 300-400 pares de bases corriente abajo del final de transcripción de este gen, por lo que nunca podrá interrumpir su transcripción (Figura 4A).

A

```

atc atcac aactac tatcac accaaact caaaaa cacaaacc acaagagga tcatt tca
ttttttat tgtttc gttttt aatcat catcat cagaag aaaaATC GTTGGGATATCGGAGA
TCAAGTCGACGGTGATGT CACGGC GCGAATTGTTTGATGCTTTTATCTAGAGTTGGAC
AAGAAAAC GTTGAC GGTGGCGATCAAAAAC GCGTTTTTCACATGTAAAACGTGTTTGAAAC
AGTTTCATTTCGTTTCAAGCCTTAGGAGGTCACCGTCCGAGTCACAAGAAGCCTAACAAACG
ACGCTTTGTCGTCTGGATTGATGAAAGAGGTGAAAACGTCGTCGCATCCTTGTCCCATAT
GTGAGTGAGGTTTCCGATGGGACAAGCTTTGGGAGGACACATGAGGAGACACAGGAACG
AGAGTGGGCTGCTGCTGGTGGCGCGTTGGTTACACGCGCTTTGTTGCCGGAGCCCACGGTGA
CTACGTTGAAGAAAATCTAGCAGTGGGAAGA GAGTGGCTTGTGTTGGATCTGAGTCTAGGGA
TGGTGGAC AATTTGAATCTCAAGTTGGAGCTTGGAAAGAACA GTTTATTCGAtt ttatttat
tttccttaaat tttctgaaatattt tgtttctctc attcctt tgaatttttct taata ttc
tagattatac atac atccgcagatt taggaaactt tcatagagt gtaacttttctt tct
gtaaaaat atattt tactt gtagcat tggagattt gttatgagatta tcttacttagcat
ttagt gaa taatct attagcctatt ttgcc gacgt gaaaat accattt tctat ttaattt
tgattact tatcaact actatta agctgtt atttt cccccat cagaaataaaa acaacc
aagaaatag atattt atttgaattt gaaac ttacc tataaat |=====
===== SALK_117922.38.70.X=====
===== SALK_117922.38.70.X=====
===== >gtccaaata
aatggatt caaaga acatggtt caacacca tctc agtgcacctt tgcgatggctc atg
ctgctccta aggta atata tgccaa tcttc gagcagcga agatgca gagactc attggttc
tctgtaa ggtgt gatctt ggaaa aggtacc ata atgcag tctttatctct tccctaaa
ccaatatg agcaca tcaaaaaca
  
```

ZAT12

B

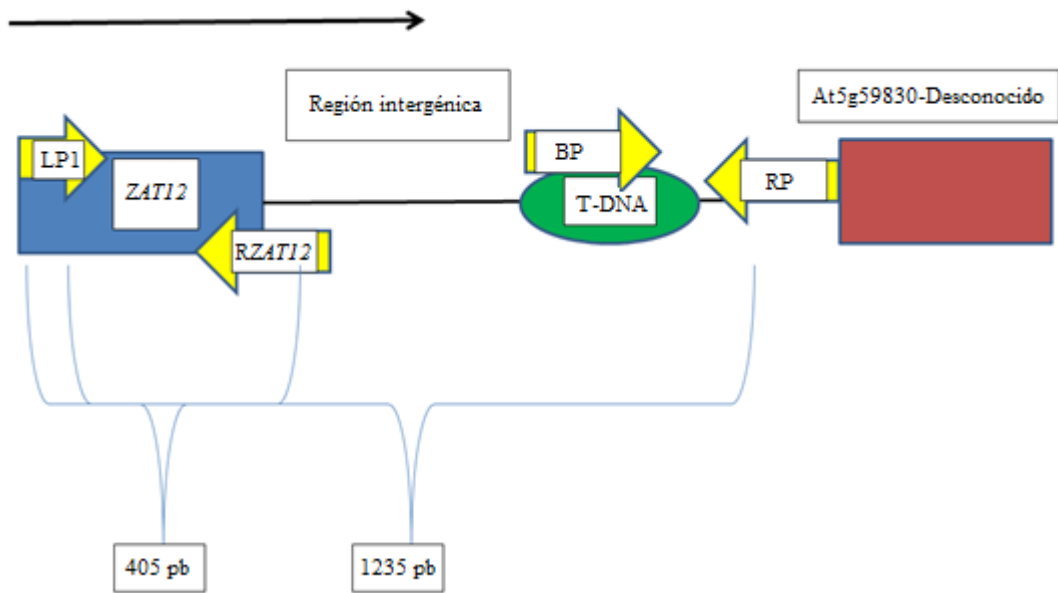
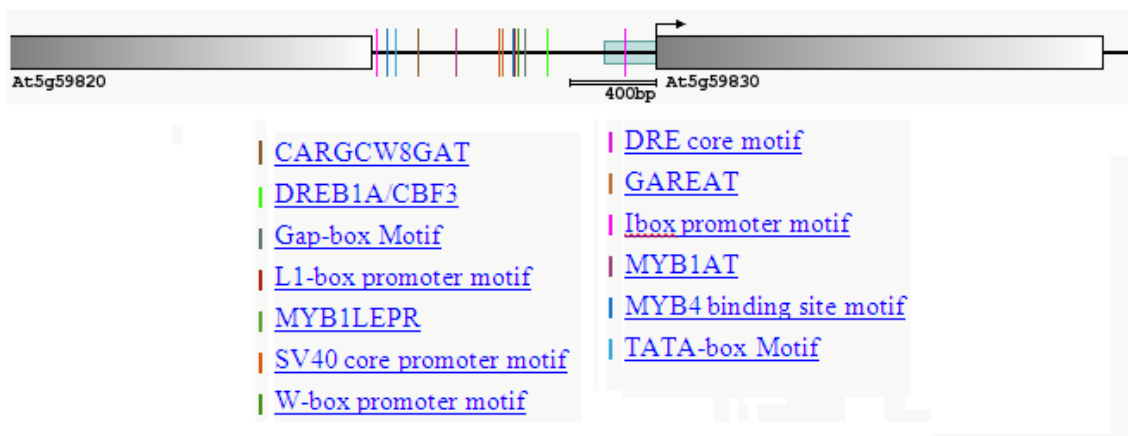


Figura 4.- Localización del inserto en el cromosoma 5 de *Arabidopsis thaliana*. Inserción de la línea SALK 117922.38.70.X. Las letras en color rojo representan la región perteneciente al gen ZAT12 que no se traduce (UTR). En dorado se representa el exón perteneciente a este gen. En negro se encuentra la región intergénica. El lugar de la inserción viene representado en color violeta. La flecha verde indica la dirección que sigue el gen al ser transcrito (A). Esquema del inserto en la región intergénica entre At5g59820 y At5g59830 (B).

Sin embargo, debido a que el inserto se encuentra corriente abajo de *ZAT12* pero por el contrario corriente arriba del gen de función desconocida, podría estar bloqueando la región promotora del mismo. Las regiones promotoras se suelen encontrar, corriente arriba del inicio de transcripción de los genes. Por este motivo nos pareció interesante realizar un estudio de la región intergénica para comprobar si puede verse afectada la región promotora de este gen.

En la Figura 5A se muestra el estudio de los posibles factores de transcripción que podrían unirse en esa región intergénica realizado en el programa informático online Athena (O'Connor *et al.*, 2005). En la Figura 5B se observa en detalle como el inserto se encuentra corriente abajo de la caja TATA, que es considerada como la principal secuencia del promotor y está implicada en el proceso de transcripción mediado por la ARN polimerasa (Yang *et al.*, 2007). Este hecho sugiere que este inserto podría estar bloqueando el inicio de transcripción de este gen de función desconocida.

A



B

```

AAAATACCATTTTCTATTTAATTTTGATTACTTATCAACTACTATTAAGCTGTTATTTTCCCCATCAG
AATAAAAACAACCCAAGAAATAGATATTTATTTGAATTTGAAACTTACC TATAAATTTAGTTGAGCTAAT
CAAAATTAAATTTTAAAGCATGATCAGAAGTGAATTCTTGAGAGTGTTGTTTGTGATCTGTCAACATCT
TCTGTCCAATAAATGGATTCAAGAACATGGTTCAACACCATCTCAGTGTCACCTTTGCGCATGGCTCA
TGCTGCTCCTAAGGTAATATATGCCAATCTTCGAGCAGCGAAGATGCAGAGCTCATTGGTTCTCCTGTAA
  
```

Figura 5.- Estudio de la región intergénica. Estudio de los posibles factores de transcripción que se pueden unir a esta región (A); En verde se subraya la caja TATA, en azul se subraya el lugar donde se localiza el T- DNA inserto (B).

Por último, debido a que el gen en cuestión podría tratarse simplemente de un gen localizado por herramientas bioinformáticas y no de un gen verdadero, se comprobó utilizando la

herramienta bioinformática GENEINVESTIGATOR (Hruz *et al.*, 2008), si éste tenía un patrón de expresión diferenciado bajo diferentes condiciones. Se realizó un estudio de los niveles relativos en el desarrollo de *Arabidopsis* (Figura 6), donde se observa como durante la floración el gen parece no transcribirse. También se realizó un estudio de la transcripción de este gen bajo diferentes condiciones de estrés, donde cabe destacar que el gen es fuertemente reprimido (3,21 veces) en condiciones de sequía. Es bien sabido, que en condiciones de estrés hídrico, las plantas suelen acumular prolina en respuesta a este estrés (Hare y Cress, 1997), pero además, ésta puede acumularse para otros fines. Chiang y Dandekar (1995) han comprobado como en tejidos reproductores de *Arabidopsis* (flores y polen), la prolina representa el 26% del total del pool de aminoácidos de estos tejidos, mientras que en tejidos vegetativos alcanza del 1 al 3%. En este sentido, la represión de este gen podría estar directamente relacionada con la acumulación de prolina.

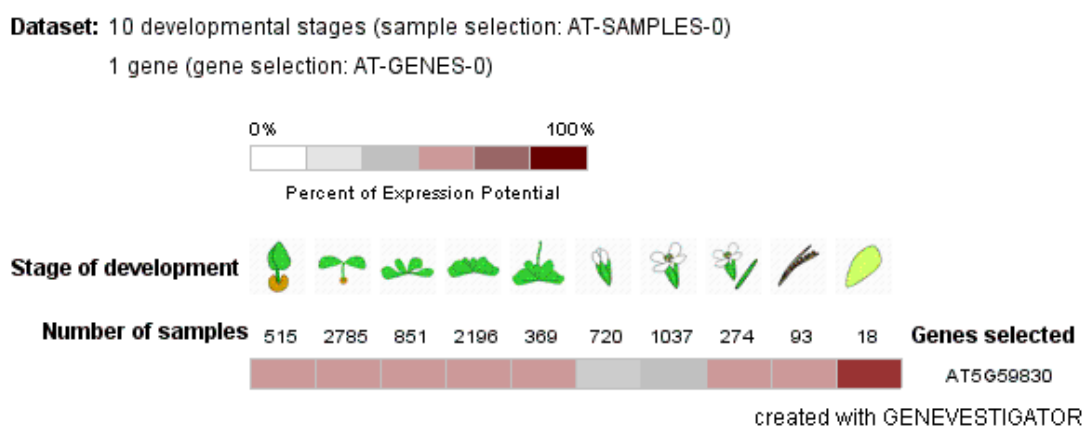


Figura 6.- Datos del patrón de expresión en diferentes estadios de desarrollo para el gen At5g59830 proporcionados por el programa bioinformático GENEINVESTIGATOR

Análisis de expresión del gen *P5CS1*

El análisis del perfil de expresión de *P5CS1* a las 6 y 12 h tras la adición de sal y sorbitol al medio hidropónico (Figura 7A, 7B), no reveló aumentos de expresión significativos para ninguno de los tratamientos entre el ecotipo salvaje Col-0 y el mutante. Sin embargo, se observa un incremento de expresión significativo respecto al tratamiento control (ausencia de estrés) a las 12 h en el tratamiento sal para el ecotipo salvaje Col-0, y también a las 12 h en el tratamiento sal y sorbitol para el mutante. Los datos obtenidos tras añadir 50 mM de NaCl,

son muy parecidos a los obtenidos, en estudios previos, utilizando PCR a tiempo real en nuestro laboratorio (Jiménez-Arias *et al.*, 2015, en revisión).

A



B

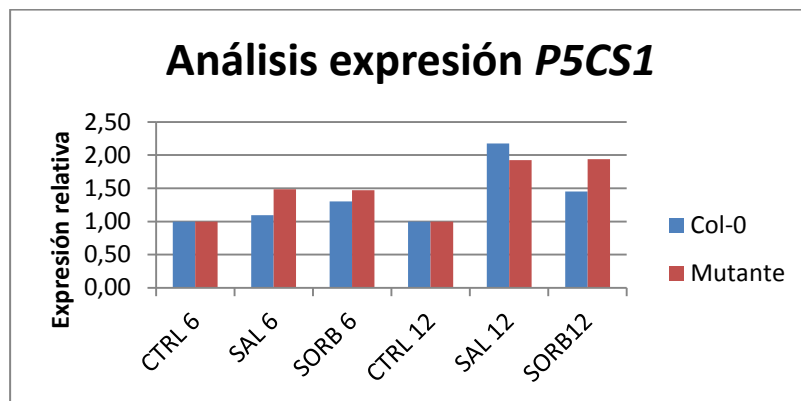


Figura 7.- Perfil de expresión del gen *P5CS1* a diferentes horas tras la adición de sal y sorbitol para el ecotipo salvaje Col-0 y para el mutante. Resultados de la electroforesis de amplicones de *P5CS1* comparado con el estándar interno (A); Análisis de expresión relativa de *P5CS1* (B).

Acumulación de prolina

Para determinar la acumulación de prolina tras la adición de sal y sorbitol se procedió a cuantificar este aminoácido a las 24 y 72 h posteriores al inicio del estrés. Como se puede observar (Figura 8) los valores obtenidos a las 24 h no son significativos con independencia de la línea utilizada. Querriamos destacar que la concentración de prolina alcanzada por el tratamiento sal en el ecotipo Col-0 mostró unos valores muy parecidos a los obtenidos en ensayos previos de este grupo (Jiménez-Arias *et al.*, 2015; Jiménez-Arias *et al.*, 2015, en

revisión). Sin embargo, a las 72h los valores obtenidos por el tratamiento sal no siguen el mismo patrón de acumulación de ensayos previos con 50 mM de NaCl. Esto puede ser debido a que a diferencia de estudios previos, en los presentes la aireación fue continua, y este hecho pudo influir de alguna manera. Por su parte, parece que en el mutante el estrés salino no induce la acumulación de prolina, ya que no se observa acumulación en ninguno de los tiempos ensayados.

En el estrés mediado por el sorbitol (Figura 8) si vemos un efecto claro sobre la acumulación de prolina en el tiempo. Nuevamente a las 24h no existen diferencias significativas con respecto al control, mientras que a las 72 h si, tanto en el ecotipo Col-0 como en el mutante. En este último, la concentración es mayor (hasta 2 $\mu\text{M}/\text{mg}$ Peso fresco mayor) comparado con el ecotipo Col-0. Este último resultado sugiere que este mutante, en condiciones de estrés osmótico por sorbitol, es capaz de alcanzar concentraciones más altas de prolina.

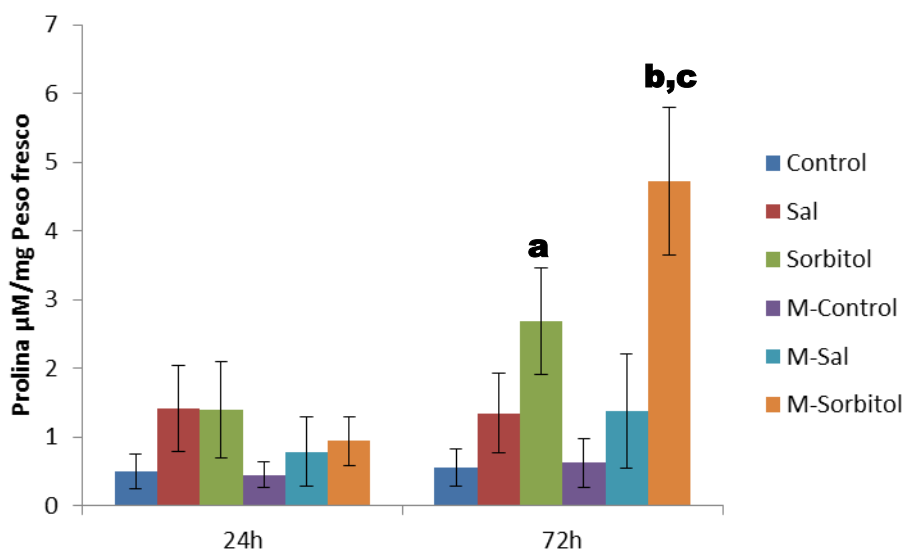


Figura 8.- Dinámica en la acumulación de prolina para los diferentes tratamientos a las 24 y 72 horas para el ecotipo salvaje Col-0 y para el mutante. Control, tratamiento control Col-0; Sal, tratamiento sal Col-0; Sorbitol, tratamiento sorbitol Col-0; M-Control, tratamiento control mutante; M-Sal, tratamiento sal mutante; M-Sorbitol, tratamiento sorbitol mutante. Letras: a, diferencias significativas frente al control Col-0; b, diferencias con respecto al control mutante, y c, diferencias con respecto al tratamiento sorbitol para el ecotipo salvaje Col-0.

Conclusiones

1. La línea SALK 117922.38.70.X no bloquea la transcripción del gen *ZAT12*, debido a que la inserción del T-DNA se encuentra en la región intergénica corriente abajo del gen.

2. A través del programa bioinformático GENEINVESTIGATOR, se comprueba que la transcripción de este gen es menor en los estadios temprano del desarrollo floral y también en condiciones de sequía, procesos que tienden a acumular concentraciones importantes de prolina. Por tanto, su transcripción parece que es contraria a la acumulación de este aminoácido.
3. De los resultados obtenidos de este trabajo se deduce que el mutante estudiado está implicado de algún modo en el metabolismo de la prolina en condiciones de estrés osmótico pero no en condiciones de estrés salino.

En cualquier caso, este trabajo constituye una primera aproximación pero se necesitan más estudios para comprobar si esta hipótesis es correcta.

1. The Salk line SALK 117922.38.70.X does not block the transcription of the gene *ZAT12*, due to the T-DNA insertion is located into an intergenic region downstream of this gene.
2. By using the bioinformatic tool GENEINVESTIGATOR, we have checked that the transcription of this gene is lower at early development stages of flowering, as well as under drought conditions, processes which tend to accumulate important concentrations of proline. Hence, its transcription seems to be contrary to the proline accumulation.
3. From the results obtained in this work it can be deduced that the studied mutant is somehow involved in proline metabolism under osmotic stress but not under salt stress conditions.

Anyway, this is a first approach but further studies are necessary to check if this hypothesis is correct.

Bibliografía

- Ashraf, M., Athar, H., Harris, P., Kwon, T. (2008). Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. *Advances in Agronomy* 97: 45-110.
- Bates, L., Waldren, R., Teare, I. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- Bohnert, H., Gong, Q., Li, P., Ma, S. (2006). Unraveling abiotic stress tolerance mechanism-getting genomics going. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 180-188.

- Carrow, R., Duncan, R. (1998). Salt-Affected Turfgrass Sites: Assessment and management. Farmington Hills, Michigan.
- Chiang, H., Dandekar, A. (1995). Regulation of proline accumulation in *Arabidopsis* during development and in response to desiccation. *Plant Cell and Environment* 18: 1280-1290.
- Davletova, S., Schlauch, K., Coutu, J., Mittler, R. (2005). The zinc-finger protein ZAT12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139: 847-856.
- Egilla, J., Davies Jr, F., Boutton, T. (2005). Drought stress influences leaf water content, photosynthesis, and water-use efficiency of *Hibiscus rosa-sinensis* at three potassium concentrations. *Photosynthetica* 43: 135-140.
- Farooq, M., Aziz, T., Basra, S., Cheema, M., Rehamn, H. (2008). Chilling tolerance in hybrid maize induced by seed priming with salicylic acid. *Journal of Agronomy and Crop Science* 194: 161-168.
- Hare, P., Cress, W. (1997). Metabolic implications of stress induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 21: 79-102.
- Harris, D., Tripathi, R., Joshi, A. (2002). On-farm seed priming to improve crop establishment and yield in dry direct-seeded rice. Direct seeding: Research Strategies and Opportunities. Pandey, S., Mortimer, M., Wade, L., Tuong, T., Lopes, K., Hardy, B., (págs. 231-240). International Research Institute, Manila, Philippines.
- Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler S., Oertle, L., Widmayer, P., Gruissem, W., Zimmermann, P. (2008). GENEVESTIGATOR V3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Advances in Bioinformatics*.
- Jaleel, C., Manivannan, P., Lakshmanan, G., Sridharan, R., Panneerselvam, R. (2007). NaCl as a physiological modulator of proline metabolism and antioxidant potential in *Phyllanthus amarus*. *Comptes Rendus Biologies* 300: 806-813.
- Jaleel, C., Sankar, B., Sridharan, R., Panneerselvam, R. (2008). Soil salinity alters growth, chlorophyll contents and secondary metabolite accumulation in *Catharanthus roseus*. *Turkish Journal of Biology* 32:79-83.
- Jiménez-Arias, D., Borges, A., Luis, J., Valdés-González, F., Sandalio, L., Pérez, J. (2015, en revisión). Priming effect of menadione sodium bisulphite against salinity stress in *Arabidopsis* involves epigenetic changes in genes controlling proline metabolism. *Environmental and experimental botany*.
- Jiménez-Arias, D., Pérez, J., Luis, J., Martín-Rodríguez, V., Valdés-González, F., Borges, A. (2015). Treating seeds in menadione sodium bisulphite primes salt tolerance in *Arabidopsis* by inducing an earlier plant adaptation. *Environmental and experimental botany* 109: 23-30.
- Lemcoff, J., Guarnaschelli, A., Garau, A., Prystupa, P. (2002). Elastic and osmotic adjustments in rooted cuttings of several clones of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. from southeastern Australia after a drought. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 197: 134-142.
- Munns, R., Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681.
- O'Connor, T., Dyreson, C., Wyrick, J. (2005). Athena: a resource for rapid visualization and systematic analysis of *Arabidopsis* promoter sequences. *Bioinformatics* 2: 4411-4413.
- Parre, E., Ghars, M., Leprince, A., Thiery, L., Lefebvre, D., Bordenave, M., Richard, L., Mazars, C., Abdelly, C., Saviouré, A. (2007). Calcium signaling via phospholipase C is essential for proline accumulation upon ionic but not nonionic hyperosmotic stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 144: 503-512.
- Reynolds, M., Tuberosa, R. (2008). Translational research impacting on crop productivity in drought-prone environments. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 171-179.
- Sairam, R., Tyagi, A. (2004). Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science* 86: 407-421.
- Szabados, L., Saviouré, A. (2009). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15: 89-97.
- Székely, G., Abrahám, E., Csépló, A., Rigó, G., Zsigmond, L., Csiszár, J., Ayaydin, F., Strizhov, N., Jásik, J., Schmelzer, E., Koncz, C., Szabados, L. (2008). Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Plant Journal* 53:11-28.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2006). *Plant Physiology*. Sunderland, Massachusetts.
- Verlues, P., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., Zhu, J. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal* 45: 523-539.
- Yang, C., Bolotin, E., Jiang, T., Sladek, F., Martínez, E. (2007). Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. *Gene* 389: 52-65.

Anexo 1. Cebadores empleados.

Gen	Identificador	Cebadores	T _M ° C	Exón	Amplicón (pb)	
					ADNc	ADNg
MUT salvaje (sin inserción)	At5g59830	D. ACACAAACCACAAGAGGATCATT	64	-	1235	
		R. GCATTTTCAGCATTTGATTTGG	66,2			
MUT homocigótico para la inserción	At5g59830	D. ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	63,5	-	600	
		R. GCATTTTCAGCATTTGATTTGG	64,7			
<i>ZAT12</i>	At5g59820	D. ACACAAACCACAAGAGGATCATT	66,5	1	405	405
		R. CCACCAGCAGCCCCACTC	64,7			
<i>P5CSI</i>	At2g39800	D. TGCCGTTGGTCTTGGTCG	66,6	16	170	256
		R. GCATCGCTTTGACAGTTTCAC	64,9	17		
PSBR (estándar interno)	At1g79040	D. CGACAAGCCCTTCGGAAT	64,5	1 y 2	158	-
		R. CTGACCACTCGTTCTCGTTG	62,2	4		

Anexo 2. Datos del análisis estadístico.

24 h

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: prolina
Tamhane

(I) tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		
				Límite inferior	Límite superior	
Control	Sal	,85386	,27627	,247	-2,0806	,3729
	Sorbitol	-,84542	,30685	,381	-2,2433	,5525
	M-Control	,06085	,13216	1,000	-,4534	,5751
	M-Sal	-,23630	,23087	,998	-1,2112	,7386
	M-Sorbitol	,02471	,12391	1,000	-,4752	,5246
Sal	Control	,85386	,27627	,247	-,3729	2,0806
	Sorbitol	,00844	,38522	1,000	-1,4665	1,4833
	M-Control	,91471	,26777	,194	-,3400	2,1694
	M-Sal	,61757	,32793	,759	-,6495	1,8846
	M-Sorbitol	,87858	,26380	,230	-,3958	2,1529
Sorbitol	Control	,84542	,30685	,381	-,5525	2,2433
	Sal	-,00844	,38522	1,000	-1,4833	1,4665
	M-Control	,90627	,29923	,309	-,5233	2,3358
	M-Sal	,60913	,35408	,851	-,7834	2,0017
	M-Sorbitol	,87014	,29567	,352	-,5794	2,3197
M-Control	Control	-,06085	,13216	1,000	-,5751	,4534
	Sal	-,91471	,26777	,194	-2,1694	,3400
	Sorbitol	-,90627	,29923	,309	-2,3358	,5233
	M-Sal	-,29715	,22064	,977	-1,2884	,6941
	M-Sorbitol	-,03614	,10360	1,000	-,4356	,3633
M-Sal	Control	,23630	,23087	,998	-,7386	1,2112
	Sal	-,61757	,32793	,759	-1,8846	,6495
	Sorbitol	-,60913	,35408	,851	-2,0017	,7834
	M-Control	,29715	,22064	,977	-,6941	1,2884
	M-Sorbitol	,26101	,21580	,991	-,7470	1,2690
M-Sorbitol	Control	-,02471	,12391	1,000	-,5246	,4752
	Sal	-,87858	,26380	,230	-2,1529	,3958
	Sorbitol	-,87014	,29567	,352	-2,3197	,5794
	M-Control	,03614	,10360	1,000	-,3633	,4356
	M-Sal	-,26101	,21580	,991	-1,2690	,7470

72 h

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: prolina
Bonferroni

(I) tratamiento		Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Control	Sal	-,23281	,42277	1,000	-1,5809	1,1153
	Sorbitol	-2,19513 [*]	,42277	,000	-3,5433	-,8470
	M-Control	-,05976	,42277	1,000	-1,4079	1,2884
	M-Sal	-,81438	,42277	,954	-2,1625	,5337
	M-Sorbitol	-4,16440 [*]	,42277	,000	-5,5125	-2,8163
Sal	Control	,23281	,42277	1,000	-1,1153	1,5809
	Sorbitol	-1,96232 [*]	,42277	,001	-3,3104	-,6142
	M-Control	,17305	,42277	1,000	-1,1751	1,5212
	M-Sal	-,58158	,42277	1,000	-1,9297	,7665
	M-Sorbitol	-3,93159 [*]	,42277	,000	-5,2797	-2,5835
Sorbitol	Control	2,19513 [*]	,42277	,000	,8470	3,5433
	Sal	1,96232 [*]	,42277	,001	,6142	3,3104
	M-Control	2,13537 [*]	,42277	,000	,7872	3,4835
	M-Sal	1,38074 [*]	,42277	,041	,0326	2,7289
	M-Sorbitol	-1,96927 [*]	,42277	,001	-3,3174	-,6211
M-Control	Control	,05976	,42277	1,000	-1,2884	1,4079
	Sal	-,17305	,42277	1,000	-1,5212	1,1751
	Sorbitol	-2,13537 [*]	,42277	,000	-3,4835	-,7872
	M-Sal	-,75463	,42277	1,000	-2,1028	,5935
	M-Sorbitol	-4,10464 [*]	,42277	,000	-5,4528	-2,7565
M-Sal	Control	,81438	,42277	,954	-,5337	2,1625
	Sal	,58158	,42277	1,000	-,7665	1,9297
	Sorbitol	-1,38074 [*]	,42277	,041	-2,7289	-,0326
	M-Control	,75463	,42277	1,000	-,5935	2,1028
	M-Sorbitol	-3,35002 [*]	,42277	,000	-4,6981	-2,0019
M-Sorbitol	Control	4,16440 [*]	,42277	,000	2,8163	5,5125
	Sal	3,93159 [*]	,42277	,000	2,5835	5,2797
	Sorbitol	1,96927 [*]	,42277	,001	,6211	3,3174
	M-Control	4,10464 [*]	,42277	,000	2,7565	5,4528
	M-Sal	3,35002 [*]	,42277	,000	2,0019	4,6981

Anexo 3. Anotación actual de la línea Salk en la página web del NASC

https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?name=SALK_137325.51.80.X&type=polyallele

Polymorphism: SALK_117922.38.70.x

Name ?	SALK_117922.38.70.x
Date last modified ?	2010-11-19
Tair Accession	Polymorphism:1005055267
Type ?	insertion Insertion Type ? T-DNA
Chromosome ?	5
Construct Type	simple_insert
Mutagen ?	T-DNA insertion
Mutation Site ?	intergenic region
Description ?	PCR was performed on Arabidopsis thaliana lines each of which contains one or more TDNA insertion elements. The resultant fragment for each line was directly sequenced to determine the genomic sequence at the site of insertion. Details of the protocols used can be found at http://signal.salk.edu/tdna_protocols.html

Associated Polymorphisms ?

Insertion ?	Species Variant (attribution) ?	Length	Polymorphic Sequence ?	Polymorphism Verified
	Col	unknown		unknown

Associated Nucleotide Sequences ?

Insertion Flanking Sequence	ATTTTCCCCCATCACGAATAAAAAACAACCCAAGAAATAGATATTTATTTGAATTTGAAGC TTACCTATAAATTTAGTTGAGCTAATCAAAATTAATTTTAAAGCATGATCAGAAGTGGA ATT (Length:123)
GenBank Accession	BZ382147

Map Locations ?	chrom	map	map type ?	coordinates	orientation	attrib
	5	AGI	nuc_sequence	24103842 - 24103964 bp	forward	details
	5	MMN10	assembly_unit	17309 - 17431 bp	forward	

Map Links ?

Germplasm ?	Name/Image	Polymorphisms	Background	Stock Name ?	Select
Showing 1 of 1 entries	SALK_117922	SALK_117922.0; SALK_117922.38.70.x		SALK_117922	<input type="checkbox"/>

Phenotype ?

None available

Order from ABRC

Reset

(European Users)

Annotations	date	by	annotation
	2002-11-26	GenBank	This is single pass sequence recovered from the left border of TDNA. This sequence lies within 300 bases of the 3' end of At5g59820.

Add My Comment

Attribution ?	type	name	date
	submitted_by	GenBank	11/26/2002
	submitted_by	Joseph Ecker	11/26/2002