



Universidad Nacional de Rosario
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Tesis de Doctorado

**“Caracterización de proteínas de función
desconocida involucradas en estrés en
Arabidopsis thaliana”**

Presentada por
Lic. Ana Virginia Osella

Directora: Dra. María Inés Zanor

Rosario, Argentina

2017

**“Caracterización de proteínas de función desconocida involucradas en estrés en
Arabidopsis thaliana”**

Ana Virginia Osella

.....

**Licenciada en Biotecnología. Egresada de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y
Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario.**

Esta tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el laboratorio de Metabolismo y Señalización del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (UNR-CONICET) dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 01/04/2011 y el 31/05/2016 bajo la dirección de la Dra. María Inés Zanor.

Agradecimientos:

Ante todo quisiera mencionar que este trabajo de Tesis fue posible gracias al financiamiento del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT). También quisiera agradecer a la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR) y al Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR) por permitirme trabajar en sus instalaciones.

Quisiera agradecer a todas las personas que hicieron posible la realización de esta tesis. En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Estela Valle, por haberme dado la oportunidad de unirme a su grupo de trabajo, y muy especialmente a la Dra. María Inés Zanol, por dirigirme en la realización de esta tesis, por sus aportes a mi formación académica, por brindarme su conocimiento y experiencia, y por su dedicación al avance de esta Tesis.

A todas aquellas personas que colaboraron conmigo durante estos años. Al personal de apoyo del IBR, porque sin ellos las tareas diarias serían imposibles de realizar, en especial a Claudia y Diego, que siempre estuvieron atentos a mis pedidos.

A los integrantes del Lab (Carlita, Matilde, Telma, Gise, Vicky, Ivi, Arletica, Lau, Maru, Ceci, Ana, Cami, Diego, Vale) y Lauri, buenos amigos que han hecho ameno el trabajo diario y con quienes he compartido alegrías, frustraciones, problemas experimentales, congresos, tertulias y helados.

A mis amigas de siempre Jor, Mechi y Estefi por sus interminables charlas.

A mi hermana Caro, mis suegros Angélica y Roberto y a mis padres, por su ayuda en la etapa de escritura, sin uds no hubiese sido posible la culminación de este trabajo.

A Emilio y Bianca, por su apoyo y aguante en todo el transcurso de esta tesis.

A todos, muchas gracias!!!

Parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral fueron dados a conocer en las siguientes publicaciones y reuniones científicas:

- ✓ **Osella, A.V., Mengarelli, D., Valle, E.V. y Zanor, M.I. (2017) FITNESS, a CCT domain-containing protein, leads to deregulation of reactive oxygen species levels in Arabidopsis. Manuscrito enviado.**
- ✓ “Physiologic and Metabolic changes associated to altered expression of UKCCT in Arabidopsis” Osella, Ana Virginia, Valle, Estela, Zanor, María Inés, presentado como póster en el Congreso de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular Argentina, realizado los días 11 al 14 de Noviembre de 2014.
- ✓ “Deregulation of hydrogen peroxide levels by a CCT domain-containing protein in Arabidopsis” Osella, Ana Virginia, Valle, Estela, Zanor, María Inés, presentado como póster en el Congreso de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular Argentina, realizado en Noviembre de 2013.
- ✓ “Estudio del rol de proteínas de función desconocida en estrés abiótico en Arabidopsis” Osella, Ana Virginia, Valle, Estela, Zanor, María Inés, presentado como póster en la XXIX Reunión de la Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal realizada en la ciudad de Mar del Plata durante los días 17 al 20 de Septiembre de 2012.

Índice:

Abreviaturas y símbolos	VI
Lenguaje especial	X
1. Introducción	
1.1 Las plantas y el estrés ambiental	1
1.2 Especies Reactivas del Oxígeno	2
1.3 Metabolismo y estrés oxidativo	3
1.3.1 Generación de ERO	4
1.3.2 Remoción de ERO	5
1.3.2.1 Metabolitos antioxidantes y vías de remoción no enzimáticas	5
1.3.2.2 Vías de remoción enzimáticas	9
1.3.2.3 Evasión de la formación de ERO	11
1.4 Señalización y estrés oxidativo	12
1.5 Genes que codifican proteínas de función desconocida	17
1.6 Genes elegidos para su estudio	21
1.7 Modelo de trabajo: <i>Arabidopsis thaliana</i>	22
2. Objetivos	23
3. Materiales y Métodos	
3.1 Material vegetal utilizado	24
3.2 Esterilización de semillas	24
3.3 Sincronización de la geminación	24
3.4 Crecimiento de plantas en tierra	24
3.5 Crecimiento de plantas en medio definido	24
3.6 Métodos generales para el clonado de fragmentos de ADN y análisis de recombinantes	24
3.6.1 Cepas bacterianas utilizadas	24
3.6.2 Plásmidos utilizados	25
3.6.3 Extracción de ADN plasmídico	26
3.6.4 Electroforesis en geles de agarosa	26
3.6.5 Secuenciación de ADN	26
3.6.6 Digestión con enzimas de restricción	27
3.6.7 Purificación de fragmentos de ADN	27
3.6.8 Ligación de fragmentos de ADN	27

3.6.9	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	27
3.6.10	Cebadores utilizados	27
3.6.11	Subclonado en vector comercial	27
3.6.12	Extracción de ARN de Arabidopsis	27
3.6.13	Síntesis de la hebra de ADNc	28
3.6.14	Extracción de ADN de Arabidopsis	28
3.6.15	Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	28
3.6.16	Preparación de células electrocompetentes de <i>A. tumefaciens</i>	29
3.6.17	Transformación de células procariotas	29
3.6.17.1	Método químico	29
3.6.17.2	Electroporación	29
3.6.18	Transformación estable de Arabidopsis	30
3.6.19	Selección de líneas transformantes estables	30
3.6.20	Mutagénesis sitio dirigida y PCR constructiva para la generación de	30
líneas silenciadas utilizando la técnica de micro ARN artificiales (amiARN)		
3.7	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	32
3.8	Análisis de proteínas	32
3.8.1	Preparación de extractos vegetales	32
3.8.2	Determinación de la concentración de proteínas	33
3.8.3	Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	33
3.8.4	Transferencia e inmunodetección de proteínas en membranas de	33
nitrocelulosa		
3.9	Obtención de anticuerpos policlonales	34
3.9.1	Construcción del vector de expresión	34
3.9.2	Expresión y purificación de la proteína codificada por el gen <i>At1g07050</i>	34
3.9.3	Protocolo de inmunización	35
3.9.4	Evaluación de los anticuerpos obtenidos	35
3.10	Determinación de actividades enzimáticas	35
3.10.1	Catalasa (CAT)	35
3.10.2	Glutación reductasa (GR)	35
3.10.3	Superóxido dismutasa (SOD)	36
3.10.4	Ascorbato peroxidasa (APX)	36
3.11	Determinación de parámetros fotosintéticos	36
3.12	Determinación de pigmentos fotosintéticos	37

3.13	Determinación de metabolitos	38
3.13.1	Métodos espectrofotométricos	38
3.13.2	Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)	39
3.14	Evaluación fenotípica ante la aplicación de diferentes condiciones de estrés abiótico	39
3.14.1	Estrés salino en tierra	39
3.14.2	Estrés salino en medio líquido	40
3.14.3	Estrés oxidativo	40
3.15	Detección de H ₂ O ₂ intracelular por tinción con DAB	40
3.16	Detección de O ₂ ⁻ intracelular por tinción con NBT	40
3.17	Análisis histoquímico de la actividad GUS	41
3.18	Microscopía Confocal de Fluorescencia	41
3.19	Determinación del área de células epidérmicas	41
3.20	Análisis Filogenéticos	42
3.21	Análisis bioinformáticos	43
Resultados y Discusión		
4. Capítulo I: Análisis funcional de la proteína AtTX24		
4.1	Introducción	44
4.2	AtTX24 posee un dominio TIR y un dominio X	46
4.3	Patrón de expresión de <i>AtTX24</i> en Arabidopsis	48
4.4	Análisis de co-expresión de <i>AtTX24</i>	50
4.5	Efectos fenotípicos de la expresión alterada de <i>AtTX24</i> en líneas de Arabidopsis	52
4.5.1	Análisis de la ausencia del gen <i>AtTX24</i>	52
4.5.1.1	Selección de una línea mutante homocigota <i>attx24</i>	52
4.5.1.2	Análisis fenotípico de la línea <i>attx24</i> en condiciones normales de crecimiento	54
4.5.1.3	Análisis fenotípico de la línea <i>attx24</i> en condiciones de estrés abiótico	56
4.5.2	Análisis de la sobreexpresión del gen <i>AtTX24</i>	62
4.5.2.1	Generación de líneas sobreexpresantes <i>AtTX24_{ox}</i>	62
4.5	Discusión	64
5. Capítulo II: Análisis funcional de la proteína AtERF112		
5.1	Introducción	67

5.2	<i>AtERF112</i> pertenece a la superfamilia de FT AP2/ERF	68
5.3	Localización subcelular de la proteína <i>AtERF112</i>	71
5.4	Análisis de la región promotora de <i>AtERF112</i> y de su patrón de expresión en Arabidopsis	72
5.4.1	Estudios predictivos de elementos regulatorios	72
5.4.2	Generación de líneas transgénicas que expresan el gen reportero β -glucuronidasa (<i>uidA</i>) bajo la dirección del fragmento promotor	73
5.5	Genes que se co-expresan con <i>AtERF112</i>	74
5.6	Análisis fenotípicos de las líneas de Arabidopsis con niveles alterados de <i>AtERF112</i>	77
5.6.1	Análisis de la ausencia del gen <i>AtERF112</i>	77
5.6.2	Análisis de la sobreexpresión del gen <i>AtERF112</i>	78
5.7	Discusión	80
6. Capítulo III: FITNESS, una proteína con dominio CCT que provoca la desregulación de ERO en Arabidopsis		
6.1	Introducción	86
6.2	<i>FITNESS</i> pertenece a una familia de genes no caracterizados que poseen un único dominio CCT (CMF)	87
6.3	Análisis de la región promotora de <i>FITNESS</i> y de su patrón de expresión en Arabidopsis	90
6.3.1	Estudios predictivos de elementos regulatorios	90
6.3.2	Patrón de expresión tejido-específico del gen <i>FITNESS</i>	90
6.3.3	Expresión del gen <i>FITNESS</i> en diferentes condiciones de estrés abiótico	92
6.4	Efectos fenotípicos de la expresión alterada de <i>FITNESS</i> en líneas de Arabidopsis	93
6.4.1	Selección de una línea mutante homocigota <i>fitness</i>	93
6.4.2	Selección de líneas sobreexpresantes de <i>FITNESS</i>	94
6.4.3	Análisis fenotípico en condiciones normales de crecimiento	95
6.5	La expresión alterada de <i>FITNESS</i> promueve la desregulación de los niveles de ERO	99
6.6	Análisis de los niveles de expresión de genes relacionados a ERO, en condiciones normales de crecimiento, mediante qPCR	103
6.7	Cambios metabólicos relacionados a niveles alterados de ERO	106
6.8	Las líneas <i>FITNESS</i> presentan alteraciones en las vías de fotorrespiración	109

6.9	<i>FITNESS</i> provoca cambios en los niveles de AS	112
6.10	Las mutantes <i>fitness</i> poseen tolerancia aumentada al estrés oxidativo	115
6.11	Expresión de la proteína <i>FITNESS</i> recombinante para la generación de anticuerpos policlonales	118
6.11.1	Análisis de la proteína <i>FITNESS in planta</i>	120
6.12	Discusión: Rol propuesto para la proteína <i>FITNESS</i>	121
7.	Conclusiones	131
8.	Resumen	135
9.	Material Suplementario	138
10.	Referencias bibliográficas	142

Abreviaturas y símbolos:

2CysA	2-Cys-peroxirredoxina A
2CysB	2-Cys-peroxirredoxina B
AA	Aminoácidos
ABA	Ácido Abscísico
ABRC	<i>Arabidopsis Biological Resource Center</i>
ADNc	ADN complementario
ADN-T	ADN de transferencia
ADNg	ADN genómico
amiARN	microARN artificiales
AP2	<i>APETALA2</i>
APX	Ascorbato peroxidasa
sAPX	Ascorbato peroxidasa estromática
AS	Ácido salicílico
ASC	Ascorbato
ASPG1	<i>ASPARTIC PROTEASE IN GUARD CELL 1</i>
AtFd2	Ferredoxina 2
AOX	Oxidasa alternativa
BAR	<i>The Bio-Analytic Resource for Plant Biology</i>
CaMV	Virus del Mosaico del Coliflor
CAT	Catalasa
CC	<i>coiled-coil</i>
chl	Clorofila
CMF	<i>CCT MOTIF FAMILY</i>
CCT	CO, COL, y TOC1
CO	<i>CONSTANS</i>
COL	<i>CONSTANS LIKE</i>
DAB	Diaminobencidina
DHA	Dehidroascorbato
DHAR	Dehidroascorbato reductasa
dNTPs	Mezcla de desoxinucleótidos dATP, dTTP, dCTP, dGTP
DO _{600nm}	Densidad óptica medida a 600 nm
DTT	Ditiotreitol

EBE	<i>ERF BUD ENHANCER</i>
EDS1	<i>ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1</i>
ERF	Factor de Respuesta a Etileno
ERO	Especies reactivas del oxígeno
ET	Extracto total
ETFBETA	<i>ELECTRON TRANSFER FLAVOPROTEIN BETA</i>
F ₀	Fluorescencia mínima en hojas adaptadas a oscuridad
F _m '	Fluorescencia mínima en hojas adaptadas a luz
F _{m0}	Fluorescencia máxima en hojas adaptadas a oscuridad
F _t	Fluorescencia máxima en hojas adaptadas a luz
FT	Factor de transcripción
GA	Giberelinas
GFP	Proteína verde fluorescente
GO	Glicolato oxidasa
GPX	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GUS	β-glucuronidasa
GRX	Glutarredoxinas
GR	Glutación reductasa
GST	Glutación S-transferasa
H ₂ DCFDA:	Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína
His	Histidinas
Hsp	<i>Heat-shock proteins</i>
IC	Isocorismato
ICS	IC sintasa
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranósido
Kan ^R	Resistencia a kanamicina
LB	Luria-Bertani
LRR	Repeticiones ricas en Leucina
MAPK	Proteínquinas activadas por mitógenos
MBF1c	<i>MULTIPROTEIN BRIDGING FACTOR 1C</i>
MDHA	Monodehidroascorbato
MDHAR	Monodehidroascorbato reductasa

MKK4	<i>MAPK Kinasa 4</i>
MM	Masa Molecular
MV	Metil Viológeno
MS	Murashige & Skoog
NB	dominio de unión a nucleótidos
NBT	Azul de nitrotetrazolio
NPQ	Atenuación no fotoquímica de la fluorescencia
NPR1	<i>NON EXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENE 1</i>
OG	Ontología Génica
ORS1	<i>ORE-SARA1 SISTER1</i>
PAD4	<i>PHYTOALEXIN DEFICIENT 4</i>
PAL	Fenilalanina amonio liasa
PCD	Muerte celular programada
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFD	Proteínas de función desconocida
PI	Ioduro de propidio
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PR	señalización relacionada a patógenos
PR1	<i>PATHOGENESIS-RELATED 1</i>
Pro	Prolina
PRX	Peroxirredoxinas
qPCR	PCR en tiempo real
R	Resistencia
RPS4	<i>RESISTANT TO P. SYRINGAE 4</i>
RT-PCR	PCR semicuantitativa
SHMT	Serina hidroximetiltransferasa
SN	Sobrenadante
SOD	Superóxido dismutasa
TAIR	<i>Arabidopsis Information Resource</i>
TIR	<i>Toll and Interleukin-1 like receptors</i>
TN	TIR-NB
TNL	TIR-NB-LRR
TOC-1	<i>TIMING OF CHLOROPHYL AB EXPRESSION1</i>
TX	TIR-X

WT	<i>wild type</i>
Φ PSII	Rendimiento cuántico del fotosistema II
X-gluc	Ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-glucurónico
x+c	Carotenoides

Lenguaje Especial:

buffer: solución amortiguadora

fitness: buen estado, saludable

fold change: razón de cambio

heat map: representación gráfica de datos donde los valores individuales, contenidos en una matriz, son representados con colores.

in planta: que ocurre o tiene lugar dentro de una planta

in silico: hecho por computadora o vía simulación computacional

knock-out: línea mutante que posee la expresión de un gen interrumpida

loop: bucle

pool: conjunto o grupo

random coil: espiral al azar

score: puntuación

screening: cribado, tamizaje para identificar una línea mutante homocigota

shock: golpe

wild type: planta salvaje o sin alteraciones genéticas introducidas

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Las plantas y el estrés ambiental

En un sentido amplio el estrés en las plantas se puede definir como *“cualquier condición desfavorable que afecta o bloquea el metabolismo, el crecimiento o el desarrollo de una planta”* (Lichtenthaler, 1996).

Las plantas son organismos sésiles y están continuamente expuestas a un amplio rango de estreses ambientales que pueden clasificarse en abióticos y bióticos, ocurriendo los primeros como consecuencia del exceso o defecto de algún agente físico (temperatura, agua, sales, luz, entre otros) y los segundos por la actividad de microorganismos u organismos herbívoros. Los principales estreses abióticos que han sido intensamente estudiados incluyen sequía, salinidad, calor, frío, congelamiento, alta intensidad de luz, ozono y anaerobiosis (Wang y col., 2003; Chaves y Oliveira, 2004; Agarwal y Grover, 2006; Nakashima y Yamaguchi-Shinozaki, 2006; Hirel y col., 2007; Bailey-Serres y Voeselek, 2008). El estrés ambiental representa el factor limitante más importante para la productividad vegetal y el rendimiento de las cosechas (Allen, 1995). Las plantas han desarrollado una red compleja de mecanismos físicos, metabólicos y genéticos que permiten a las células vegetales responder a las fluctuaciones naturales de su ambiente (Greene, 2002) y a las modificaciones impuestas por el hombre tales como el cambio climático y la contaminación (Sandalo y Foyer, 2015).

Actualmente, la reducción de fuentes de agua potable y el aumento de la población mundial, que se relaciona directamente con un aumento en la demanda alimentaria, hacen que la comunidad científica anticipe la necesidad de una segunda revolución verde para aumentar los rendimientos agronómicos y la estabilidad de los mismos bajo condiciones de crecimiento adversas o subóptimas (Zhang, 2007; Eckardt y col., 2009).

Las estrategias que tienen las plantas para combatir los desafíos ambientales dependen del tipo, severidad y la combinación de estreses, y requiere combinaciones específicas y flexibles de componentes de señalización para desencadenar respuestas de adaptación y aclimatación que podrían aplicarse a más de una señal ambiental, generalmente en un proceso llamado tolerancia-cruzada (Suzuki y col., 2012, 2014). El inicio y regulación de la mayoría de estos procesos involucra moléculas de señalización bien caracterizadas, tales como fitohormonas (Pieterse y col., 2012; Bartoli y col., 2013), iones calcio (Stael y col., 2015), especies reactivas de nitrógeno (Kocsy y col., 2013), y especies reactivas del oxígeno (ERO; Baxter y col., 2014; Mignolet-Spruyt y col., 2016).

1.2 Especies Reactivas del Oxígeno

Las ERO son formas reactivas del oxígeno molecular (oxígeno triplete, O_2) que pueden generarse por excitación de una molécula de O_2 para formar oxígeno singulete (1O_2) o por transferencia de uno, dos o tres electrones al O_2 para formar radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o radical hidroxilo (OH^{\cdot}) respectivamente (Figura 1.1).

En el $O_2^{\cdot-}$ hay un electrón desapareado en el orbital externo, lo que lo convierte en una especie más reactiva que el O_2 , es decir, un radical libre inestable. Su tiempo de vida media es de 1 a 1000 μs , razón por la cual sólo difunde unos pocos micrómetros desde su sitio de generación (Kavdia, 2006). El $O_2^{\cdot-}$ participa en varias reacciones, pero la de mayor prevalencia es la reacción con H^+ que genera radical perhidroxilo HO_2^{\cdot} ; el cual es permeable a las membranas biológicas. Dos moléculas de HO_2^{\cdot} reaccionan dando O_2 y H_2O_2 en forma espontánea o enzimática por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD; Demidchik, 2015).

El H_2O_2 es la ERO más estable con funciones fisiológicas esenciales (Halliwell y Gutteridge, 2007; Apel y Hirt, 2004; Foyer y Noctor, 2009). Es una molécula no cargada, que puede difundir a través de medios acuosos o lipídicos y tiene mayor tiempo de vida media que el $O_2^{\cdot-}$, el cual se estima es menor a 1 s, debido a la actividad de enzimas detoxificantes como catalasa (CAT) y peroxidasa (Halliwell y Gutteridge, 2007).

El $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 pueden reaccionar para generar OH^{\cdot} (reacción de Fenton) en presencia de iones metálicos de transición tales como hierro o cobre. El OH^{\cdot} es altamente reactivo (Desikan y col., 2003) y es la causa principal de daño oxidativo a proteínas y ácidos nucleicos así como también de la peroxidación lipídica durante el estrés oxidativo. Está involucrado directamente en la señalización del estrés oxidativo y en la muerte celular programada (Demidchik, 2003 y 2010). La vida media del OH^{\cdot} es aproximadamente 1 ns, lo que permite su difusión a distancias muy cortas, menores a 1 nm (Sies, 1993). No existen detoxificantes y antioxidantes específicos para este radical. Sin embargo, se ha reportado que el manitol, el sorbitol, el dimetil sulfóxido y la tiourea pueden tener efectos detoxificantes indirectos sobre el mismo (Demidchik, 2015).

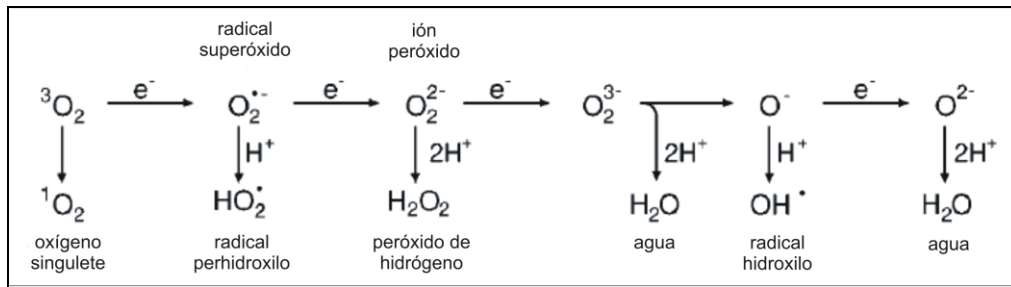


Figura 1.1: Generación de las ERO por transferencia de energía o reducción secuencial univalente de oxígeno molecular. Adaptado de Apel y Hirt, 2004.

1.3 Metabolismo y estrés oxidativo

Bajo condiciones de crecimiento normales, la producción de ERO es baja. Sin embargo, cuando una planta experimenta algún tipo de estrés ambiental, como ser sequía, salinidad, congelamiento, shock térmico, metales pesados, radiación UV, entre otros, se genera un gran aumento en la concentración de estas especies generando una disrupción de la homeostasis celular redox, lo que produce en la planta estrés oxidativo. El “estrés oxidativo” puede definirse como un fenómeno químico y fisiológico complejo que acompaña virtualmente a todos los estreses bióticos y abióticos en plantas superiores y se desarrolla como resultado de una sobreproducción y acumulación de ERO (Demidchik, 2015). El “estrés oxidativo” se caracteriza por:

- ✓ Aumento de la carga oxidativa (producción aumentada de ERO),
- ✓ Potencial de oxidación descontrolado debido a velocidades de producción que exceden las velocidades del metabolismo,
- ✓ Daño oxidativo a componentes celulares, asumiendo que la velocidad de oxidación excede a la de reparación o reemplazo de los mismos, lo que ocasiona
- ✓ Acumulación de componentes celulares dañados que conducen a la pérdida de función y eventual muerte (Foyer y Noctor, 2011).

Hace 45 años se descubría la actividad enzimática SOD (McCord y Fridovich, 1969), que marcaría el nacimiento de la biología de las ERO como área de estudio. Durante las dos últimas décadas, se han identificado las principales fuentes y sitios de producción de ERO, las moléculas antioxidantes y las enzimas que las detoxifican en plantas. Sin embargo, el conocimiento actual sobre la homeostasis de ERO y la señalización sigue siendo fragmentario (You y Chan, 2015).

1.3.1 Generación de ERO:

Las ERO son producidas en varios compartimentos subcelulares en respuesta a estímulos específicos y, con el fin de evitar efectos secundarios perjudiciales, su producción se encuentra estrictamente controlada. Mientras que en animales las mitocondrias son la fuente más importante de ERO, en plantas los cloroplastos (en presencia de luz) y los peroxisomas son los principales productores; ambos generan veinte veces más ERO que las mitocondrias (Wrzaczek y col., 2013).

CLOROPLASTOS: En el caso particular de cloroplastos, cualquier desbalance que sufra la célula, ya sea a causa de factores externos o internos, inhibe directa o indirectamente la fijación de CO₂, frenando el ciclo de Calvin, lo que conduce a una acumulación del NADPH producido en las reacciones primarias de la fotosíntesis, con la consiguiente disminución en los niveles disponibles de NADP⁺. La deficiencia crónica de este aceptor de la cadena de transporte electrónico lleva a una sobrerreducción de la misma, y así el O₂ puede actuar como aceptor electrónico oportunista, generando O₂⁻, y luego sus derivados tóxicos (Palatnik y col., 2002). El O₂⁻ es convertido a H₂O₂ por la SOD presente en el estroma del cloroplasto y la producción del OH[·] requiere de la presencia de las especies anteriores junto con iones metálicos en su forma reducida (Asada, 2006). Por lo tanto, el Fotosistema I sería el principal sitio de generación de O₂⁻ en la cadena de transporte electrónico fotosintético. Esta producción puede ser aumentada enormemente empleando el herbicida pro-oxidante Metil Viológeno (MV, paraquat; Mehler, 1951), que actúa como un catalizador cíclico de transferencia de electrones desde el centro FeS del Fotosistema I hacia el O₂ (Foyer y Noctor, 2009). En esta organela también se produce ¹O₂ en el Fotosistema II, donde la remoción mediada por carotenoides es menos efectiva (Foyer y col., 2006). El ¹O₂, es más reactivo que O₂⁻ y H₂O₂ y durante mucho tiempo se pensó que era una molécula de difusión limitada; sin embargo, evidencias recientes demuestran que podría difundir distancias significativas desde su sitio de producción (Fischer y col., 2007).

PEROXISOMAS: Otro lugar de formación de ERO son los peroxisomas, en los cuales se genera principalmente H₂O₂ mediante la reacción de la enzima glicolato oxidasa (GO) fotorrespiratoria, la β-oxidación de ácidos grasos de cadena larga (mayores a 22 átomos de carbono) mediada por la enzima acil-CoA oxidasa, la reacción enzimática de flavin oxidasas y la dismutación de los radicales superóxido (Baker y Graham, 2002; del Río 2002, Foyer y Noctor 2003). También se ha visto que puede generarse O₂⁻ en la matriz de la organela mediante la acción de la enzima xantina oxidasa y en la membrana del peroxisoma de manera NAD(P)H dependiente (Sandalio y col., 1988; del Río y col., 1989, 2002).

MITOCONDRIAS: Las ERO formadas en mitocondrias se producen en los complejos mitocondriales de la cadena de transporte electrónico respiratoria, particularmente en los complejos NADH deshidrogenasa y ubiquinol citocromo c reductasa (Boveris, 1984; Loschen y col, 1974; Ksenzenko y col, 1983; Bowler y col, 1989).

APOPLASTO y MEMBRANA PLASMÁTICA: Además de las organelas, la membrana plasmática junto con el apoplasto son sitios importantes de generación de ERO en respuesta a señales endógenas y estímulos ambientales exógenos. Varios tipos de enzimas, tales como NADPH oxidasas, amina oxidasas, poliamina oxidasas, oxalato oxidasas, y una familia grande de peroxidasas clase III, que se localizan en la superficie celular o el apoplasto, contribuyen a la formación de ERO en el apoplasto (Apel y Hirt, 2004; Cosio y Dunand, 2009; Gill y Tuteja, 2010). A diferencia del citoplasma, que es un compartimiento alcalino altamente reducido y enriquecido en antioxidantes, el espacio extracelular es un espacio ácido y normalmente no contiene altos niveles de enzimas detoxificantes (Hernández y col., 2001).

1.3.2 Remoción de ERO

Las plantas poseen un sistema antioxidante enzimático y no enzimático muy eficiente para protegerse contra el daño oxidativo y, por otro lado, pueden modular de manera muy fina los niveles de ERO en la transducción de señales (You y col., 2015). La ubicuidad de las ERO en el metabolismo vegetal explica sin duda la complejidad y redundancia de los sistemas antioxidantes en plantas, que incluyen una gran variedad de metabolitos reductores así como de enzimas antioxidantes (Mittler y col., 2004).

1.3.2.1 Metabolitos antioxidantes y vías de remoción no enzimáticas

Existen varios compuestos de bajo peso molecular que actúan en la detoxificación de ERO, ya sea reaccionando directamente con las mismas o como sustrato de enzimas detoxificantes. Los antioxidantes no enzimáticos incluyen una serie de compuestos orgánicos de bajo peso molecular entre los cuales los mayoritarios son la vitamina C o ascorbato (ASC) y el glutatión reducido (GSH). Otros antioxidantes no enzimáticos son la vitamina E (tocoferol), los flavonoides, los alcaloides, los carotenoides, los derivados de fenilpropanoides, las poliaminas, los azúcares, los azúcares alcohol y los solutos compatibles como la prolina (Pro; Bray y col, 2000; Foyer y Noctor, 2009). Estos compuestos son capaces de reaccionar químicamente con las ERO, dando productos relativamente estables, los cuales normalmente pueden ser regenerados a su forma reducida por sistemas enzimáticos. En la Tabla 1.1 se detallan los lugares donde se sintetizan estos compuestos.

Antioxidantes	Lugar de síntesis
Ascorbato (Vitamina C)	Apoplasto, Citosol, Plástidos, Vacuola
β -carotenos	Plástidos
Glutati3n reducido (GSH)	Apoplasto, Citosol, Mitocondrias, Plástidos
Poliaminas (ejemplo: putrescina)	Citosol, Mitocondrias, N3cleo, Plástidos
Vitamina E (α -tocoferol)	Membranas celulares
Zeaxantina	Cloroplastos

Tabla 1.1: Principales sistemas de protecci3n antioxidante no enzimáticos en plantas. Lugares de s3ntesis de los compuestos antioxidantes de las v3as de remoci3n de ERO no enzimáticas. *Adaptado de Bray y col., 2000.*

El ASC y el GSH son los principales antioxidantes solubles de la c3lula vegetal encontrándose hasta en concentraciones milimolares. El ASC puede detoxificar H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$, regenerar tocoferol y adem3s es sustrato en las reacciones catalizadas por las enzimas violaxantina deepoxidasa y ascorbato peroxidasa (APX) (Noctor y Foyer, 1998). El GSH actúa detoxificando H_2O_2 , protegiendo los grupos tioles de las enzimas del estroma y generando fitoquelatinas que protegen frente a los efectos t3xicos de metales pesados. Se han encontrado altos niveles de GSH luego de tratamientos con altas y bajas temperaturas, ataque de pat3genos y sequía (Noctor y col., 2002). Adem3s, la actividad de las enzimas que sintetizan GSH se incrementa durante los estreses ambientales (Vanacker y col., 2000; Vernoux y col., 2002). El GSH participa en el ciclo del ascorbato-glutati3n (ASC-GSH) que involucra el metabolismo del H_2O_2 en compartimentos celulares donde no hay CAT presente (Halliwell y Gutteridge 2007; Noctor y Foyer 1998). El glutati3n oxidado (GSSG), el monodehidroascorbato (MDHA) y el dehidroascorbato (DHA), son reducidos en este ciclo, el cual ocurre en cloroplastos, citoplasma y mitocondrias (Noctor y Foyer 1998). Este ciclo utiliza las reacciones de cuatro enzimas antioxidantes: APX, glutati3n reductasa (GR), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) y dehidroascorbato reductasa (DHAR). El DHA es reducido a ASC por GSH, reacci3n catalizada por la DHAR. El GSSG es regenerado a la forma reducida por medio de GR y consumo de NADPH, mientras que el ASC es oxidado a DHA vía la enzima APX, la cual adem3s reduce H_2O_2 a H_2O . La ubicuidad del ciclo ASC-GSH y la alta concentraci3n de ASC y GSH denotan la importancia cr3tica del mismo como regulador del balance redox celular (Figura 1.2) (Noctor y Foyer, 1998).

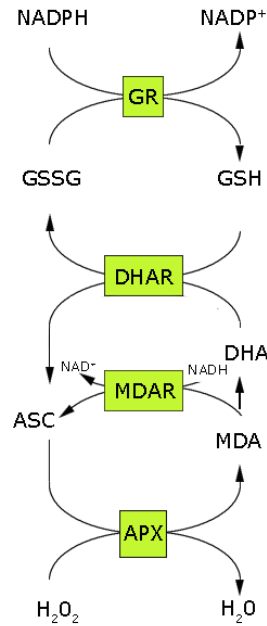


Figura 1.2: Ciclo Ascorbato-Glutatión. Adaptado de Foyer y Noctor, 1998.

El ASC y el GSH, son capaces no sólo de limitar el tiempo de vida de las ERO sino también de participar en un amplio rango de otras funciones regulatorias y de señalización redox (Foyer y col., 2009a).

El estado redox del glutatión sería un buen indicador de cambios en el estado redox celular, al menos de aquellos generados por un aumento intracelular de H₂O₂. Mientras que el agotamiento de glutatión total puede ser desencadenado por diferentes estreses. Por otro lado, existen otras situaciones en las cuales puede acumularse glutatión, al menos transitoriamente, como por ejemplo, patógenos y ozono (Vanacker y col., 2000; Bick y col., 2001; Gómez y col., 2004a). Los cambios en los niveles de glutatión permiten relacionar funcionalmente el H₂O₂ intracelular con respuestas relacionadas a patógenos (Han y col., 2013a, b). Aún se desconocen los mecanismos por los cuales el glutatión está involucrado en señalización de estrés oxidativo pero podría involucrar procesos de formación de puentes disulfuro entre proteínas, S-glutationilación o S-nitrosilación (Dixon y col., 2005; Feechan y col., 2005; Tada y col., 2008; Palmieri y col., 2010; Zaffagnini y col., 2012). También podría darse como señalización mediada por calcio (Gómez y col., 2004b), posiblemente dirigida por el sensado de las concentraciones crecientes de glutatión en el apoplasto (Li y col., 2013).

El ASC posee un rol importante en la protección del aparato fotosintético de los efectos adversos generados por alta luz. Además, el ASC y la enzima ascorbato oxidasa ejercen

una fuerte influencia en el crecimiento y desarrollo de la planta, característica que ha sido atribuida a efectos directos de ASC en la expansión celular (Pignocchi y col., 2003; Conklin y Barth, 2004; Pavet y col., 2005). Además de los efectos directos del ASC en la fotosíntesis y el metabolismo de pared celular, el ASC participa en la síntesis de las principales hormonas vegetales tales como Ácido Abscísico (ABA) y Giberelinas (GA) las cuales pueden ser relevantes para vías de señalización ERO-independientes (Foyer y Noctor, 2011). En cuanto a respuesta a estrés, recientemente se ha reportado que el DHA actúa como un regulador de la dinámica estomática (Hemavathi y col. 2011; Fotopoulos y col. 2008) y el ASC juega un rol crucial en la protección contra varios estreses ambientales tales como sequía, donde participa en la percepción de las señales ambientales; salinidad y ozono, donde niveles aumentados de ASC o mayor actividad de la enzima APX generan tolerancia a estos estreses (Kwon y col. 2003; Huang y col. 2005; Wang y col. 2005; Sun y col. 2010a; Zhang y col. 2011; Venkatesh y col. 2012; Zheng y col. 2000; Sanmartin y col. 2003; Feng y col. 2010) y alta intensidad de luz, donde los cambios en los niveles de ASC dependientes de alta intensidad de luz pueden relacionarse a la regeneración de tocoferoles y al ciclo de las xantófilas (Grace y Logan, 1996; Gatzek y col., 2002; Smirnoff, 2011; Müller-Moulé y col. 2004; Talla y col. 2011).

La vitamina E es un grupo de compuestos que incluye a tococromanoles, 4 tocoferoles y 4 tocotrienoles. Los tococromanoles son moléculas anfipáticas, cuya cabeza polar deriva del metabolismo citosólico de aminoácidos (AA) aromáticos mientras que la cola saturada deriva de la vía plastídica de la deoxixilulosa 5-fosfato para la síntesis de la cola fitil-difosfato o GGDP para tocoferoles y tocotrienoles, respectivamente. Los tococromanoles α -, β -, γ - y δ - difieren solamente en el número y posición de los sustituyentes metílicos en el anillo aromático. Los tococromanoles interaccionan con grupos acilo poliinsaturados y protegen los lípidos de membrana (especialmente ácidos grasos poliinsaturados) del daño oxidativo por detoxificación de radicales de lípidos peroxidados y reaccionan también con $^1\text{O}_2$ y otras ERO, como O_2^- (Havaux y col., 2003; Schneider, 2005; DellaPenna y Pogson, 2006).

Los carotenoides son moléculas liposolubles que pueden relajar térmicamente las clorofilas y el $^1\text{O}_2$, inhibir la lipoperoxidación y estabilizar las membranas (Vershinin, 1999).

Los solutos compatibles son moléculas pequeñas entre los cuales está la Pro, la glicina betaína, los azúcares y los azúcares alcohol que actúan como osmoprotectores. Además de este rol, existe cada vez mayor evidencia de que estos compuestos podrían ser importantes en el control de la acumulación de ERO. Por ejemplo, el aminoácido Pro actuaría regulando los niveles de ERO a través de la homeostasis del *pool* de piridínnucleótidos (Szabados y Savouré, 2010; Sharma y col., 2011). Por otro lado, existen cada vez más evidencias de que los azúcares

solubles, que incluyen disacáridos, fructanos y oligosacáridos de la familia de la rafinosa, tienen un rol dual respecto a las ERO (Couée y col., 2006; Keunen y col., 2013). Los azúcares solubles fueron directamente ligados a la velocidad de producción de ERO por la regulación de las vías metabólicas que producen ERO, tales como respiración mitocondrial o fotosíntesis. Sin embargo, ellos también alimentan al metabolismo productor de NADPH para participar de procesos oxidativos (Couée y col., 2006). Además, los azúcares y los azúcares alcohol son metabolitos antioxidantes porque detoxifican OH^\cdot (Smirnoff y Cumbes, 1989; Couée y col., 2006; Nishizawa y col., 2008). Por último, otros azúcares alcohol, tales como el sorbitol y el manitol, pueden ser oxidados a azúcares por deshidrogenasas NAD(P) dependientes y así detoxificar ERO (Bolouri-Moghaddam y col., 2010; Noctor y col., 2014).

1.3.2.2 Vías de remoción enzimáticas

Las enzimas que detoxifican ERO incluyen SOD, APX, CAT, glutatión peroxidasa (GPX), MDHAR, DHAR, GR, glutatión S-transferasa (GST), y peroxirredoxinas (PRX). En plantas, estas enzimas se encuentran en casi todos los compartimentos subcelulares. Además, usualmente se puede encontrar más de una enzima para una ERO determinada en cada uno de los compartimentos celulares (Tabla 1.2). La SOD actúa como la primera línea de defensa convirtiendo $\text{O}_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 . CAT, APX y GPX actúan detoxificando el H_2O_2 . A diferencia de CAT, APX requiere ASC y/o glutatión para completar el ciclo que involucra MDHAR, DHAR y GR. GPX, GST y PRX reducen H_2O_2 e hidroperóxidos orgánicos a través de las vías que utilizan GSH mediadas por tioles-ascorbato independientes, tiorredoxinas o glutarredoxinas (GRX) como nucleófilos (Dietz y col., 2006; Meyer y col., 2012; Noctor y col., 2014).

Enzima	Reacción catalizada	Localización subcelular
Superóxido dismutasa	$\text{O}_2^{\cdot-} + \text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	cloroplastos, citosol, mitocondrias, peroxisomas, apoplasto
Catalasa	$\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{O}_2$	peroxisomas
Ascorbato peroxidasa	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{AA} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{DHA}$	cloroplastos, citosol, mitocondrias, peroxisomas, apoplasto
Monodehidroascorbato reductasa	$\text{MDHA} + \text{NAD(P)H} \rightarrow \text{Asc} + \text{NAD(P)}^+$	cloroplastos, citosol, mitocondrias
Dehidroascorbato reductasa	$\text{DHA} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{Asc} + \text{GSSG}$	cloroplastos, citosol, mitocondrias
Glutatión reductasa	$\text{GSSG} + \text{NAD(P)H} \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NAD(P)}^+$	cloroplastos, citosol, mitocondrias

Tabla 1.2: Principales enzimas antioxidantes que detoxifican ERO. Adaptado de Gill y Tuteja, 2010.

Remoción de O₂⁻

Las enzimas SOD son una familia de metaloenzimas que catalizan la dismutación del O₂⁻ a H₂O₂ (Fridovich 1995; Halliwell y Gutteridge 2007), lo que las convierte en una de las principales mediadoras en la producción de H₂O₂ a partir de fuentes intracelulares de O₂⁻. Las SOD están codificadas por distintos genes, cada uno de los cuales tiene un patrón de expresión durante el desarrollo y responde a distintos estímulos ambientales (Scandalios, 2002). Las diferentes isoformas de SOD están categorizadas de acuerdo al cofactor metálico de la enzima: Cu/Zn, Mn, Fe (III) o Ni (II/III) y cada una de estas isoenzimas actúa en un tejido específico o en un compartimento subcelular en particular. Los compartimentos donde habitualmente se encuentran son cloroplastos, citoplasma, mitocondria, apoplasto, núcleo (Ogawa y col., 1996; Alscher y col., 2002; Corpas y col., 2006; Rodríguez-Serrano y col., 2007) y peroxisomas (del Río y col., 1983; Sandalio y col., 1987).

Remoción de H₂O₂

La detoxificación del H₂O₂ en plantas es esencial para la protección celular y la señalización (Mittler, 2002). Las plantas contienen varias enzimas capaces de eliminar rápida y eficientemente el H₂O₂. En Arabidopsis las mismas están codificadas por familias génicas: CAT (3 genes), APX (9 genes), y peroxidasa (11 genes). Estas enzimas junto con los antioxidantes ASC y GSH proveen a la célula de una maquinaria eficiente de detoxificación de H₂O₂ (Noctor y Foyer, 1998; Mittler y Poulos, 2005).

La enzima CAT elimina el H₂O₂ generando H₂O y O₂. A diferencia de otras enzimas que actúan en la detoxificación del H₂O₂, CAT sólo se encuentra en peroxisomas y es una enzima muy eficiente para la eliminación de H₂O₂ cuando los niveles de esta molécula son muy elevados. Esto se debe a que tiene una baja afinidad por el H₂O₂ y un número de recambio muy alto. Además, CAT no depende de ningún reductor para detoxificar el H₂O₂. En Arabidopsis existen 3 isoformas de catalasa, CAT1, CAT2 y CAT3, que poseen distintas localizaciones tejido específica. El gen que codifica para CAT2 se induce por luz y su expresión muestra un ritmo circadiano, siendo su máximo al comienzo del día (Zhong y col. 1994; Zhong y McClung, 1996; Mhamdi y col., 2012). Se ha reportado que la deficiencia de CAT2 reduce la resistencia de las plantas de Arabidopsis a la alta luz (Vanderauwera y col., 2005). Consistente con esto, CAT2 se expresa principalmente en tejidos fotosintéticos. Además, en condiciones basales, los niveles de expresión de CAT2 son mayores que los de CAT1 y CAT3 (Du y col., 2008).

La enzima APX cataliza la reducción de H_2O_2 en H_2O utilizando ASC. Es una clase única de peroxidasa que se encuentra principalmente en algas fotosintéticas y en plantas. La enzima APX se encuentra en casi todos los compartimentos subcelulares de las plantas y su función es clave en la defensa antioxidante y también en la señalización mediada por H_2O_2 (Mittler y Poulos, 2005). Se pueden encontrar isoenzimas de APX en cloroplastos, mitocondrias, citosol, peroxisomas y apoplasto.

Existe un gran número de peroxidasas que cumplen roles tanto en la tolerancia a estrés como durante el desarrollo y crecimiento de las plantas. Rao y col (1996) han reportado, mediante geles de actividad, la existencia de una a cuatro isoenzimas diferentes en hojas de *Arabidopsis* de acuerdo al genotipo de la planta.

La enzima GR es una flavoproteína que cataliza la reducción de GSSG a GSH dentro del ciclo ASC-GSH que detoxifica H_2O_2 . Posee una alta afinidad tanto por GSSG como por NADPH (Halliwell y Foyer, 1978; Edwards y col., 1990). La alta relación GSH:GSSG que existe en las células es mantenida por la actividad de esta enzima. Estudios de fraccionamiento clásicos describen una elevada actividad GR en cloroplastos (Foyer y Halliwell, 1976) aunque también se ha detectado GR en citosol, mitocondrias y peroxisomas (Edwards y col., 1990; Rasmusson y Møller, 1990; Jiménez y col., 1997; Stevens y col., 2000; Romero-Puertas y col., 2006). En *Arabidopsis* existen dos genes que codifican para GR. El primero, GR2 (At3g54660) codifica para una proteína similar a la GR de arveja que fue la primera proteína identificada en mostrar un doble direccionamiento, cloroplastos y mitocondrias (Creissen y col., 1995). La localización dual de este producto génico en estos dos compartimientos también se ha demostrado en *Arabidopsis* (Chew y col., 2003). La actividad GR citosólica está codificada por GR1 (At3g24170) aunque análisis proteómicos sugieren que este gen también codifica para actividad GR en peroxisomas (Kaur y col., 2009).

1.3.3 Evasión de la formación de ERO

Además del sistema antioxidante, existen otros mecanismos importantes para mantener la homeostasis de ERO. Uno de ellos es aliviar los efectos del estrés en el metabolismo de la planta, evitando la producción de ERO e incluyen: (1) adaptaciones morfológicas como movimiento y curvado de las hojas, desarrollo de epidermis refractarias y ocultamiento de estomas en estructuras especializadas; (2) adaptaciones fisiológicas como el metabolismo C4 y CAM y (3) mecanismos moleculares que reordenan el aparato fotosintético y sus antenas de acuerdo a la calidad e intensidad de luz o suprimiendo completamente la

fotosíntesis. De esta forma la planta evita la sobrerreducción del aparato fotosintético y, como consecuencia de ello, la producción de ERO (Mittler, 2002).

Por otro lado, la generación de ERO puede disminuirse drenando los electrones de la cadena de transporte de electrones cloroplástica y mitocondrial por medio de una ruta alternativa en la que interviene la enzima oxidasa alternativa (AOX), que puede desviar los electrones que fluyen en la cadena de transporte de electrones y usarlos para reducir el O_2 a H_2O . Así, la enzima AOX disminuye la generación de ERO por medio de dos mecanismos: evita que los electrones reduzcan el O_2 a O_2^- y reduce el nivel de O_2 en la organela el cual es el sustrato para la producción de ERO (Mittler, 2002).

1.4 Señalización y estrés oxidativo

Durante el curso de la evolución las plantas han desarrollado una red elaborada y eficiente de mecanismos de detoxificación que les permiten sobrellevar la toxicidad de las ERO y comenzar a usar algunas de estas moléculas tóxicas como mediadores de la transducción de señales (Bailey-Serres y Mittler 2006, Mittler y col. 2004).

El delicado balance entre la producción y detoxificación de las ERO que permite esta dualidad de función en plantas sería orquestado por una gran red de genes llamada “red génica ERO”, que incluye más de 150 genes en *Arabidopsis*, y que regulan fuertemente la producción y detoxificación de las ERO (Mittler y col. 2004). Por lo tanto, la señalización mediada por ERO estaría controlada predominantemente por su producción y detoxificación (Mittler y col. 2004).

Además de formar parte de la señalización directa mencionada en el párrafo anterior, las ERO participarían en la *señalización retrógrada*, que involucra la modificación de la expresión génica nuclear mediante señales que se originan en las organelas (Kleine y Leister, 2016). Los cloroplastos y mitocondrias han conservado una parte pequeña pero esencial de su genoma bacteriano ancestral, y debido a que la mayoría de las proteínas dentro de estas organelas están codificadas en los genes nucleares, hay una íntima comunicación que asegura la expresión coordinada de componentes involucrados en la fotosíntesis, respiración y otros procesos. Un número de FT de las familias NAC y WRKY han sido implicados en la señalización retrógrada tanto de cloroplastos como de mitocondrias (Kleine y Leister, 2016).

Las plantas constantemente sensan y analizan el nivel de ERO y reprograman su expresión génica para responder de manera óptima a las condiciones cambiantes de su medioambiente. El uso de mutantes que han perdido enzimas que detoxifican ERO como APX1 y CAT permitió la identificación de proteínas regulatorias claves involucradas en el sentido de

ERO y la regulación de la expresión de los transcritos por diferentes señales de ERO (Davletova y col. 2005, Vandenabeele y col. 2004, Vanderauwera y col. 2005). Estas proteínas regulatorias estarían codificadas por genes de respuesta temprana, que responden a las 0,5-6 hs de percibido el estrés o genes de respuesta tardía, que responden a tiempos mayores a 6 hs desde que la planta experimenta el estrés (Cheong y col., 2002). Por ejemplo, se identificó que las proteínas del choque térmico participan del sensado temprano del H₂O₂ en plantas. Por otro lado, utilizando plantas *knock-out* para el gen que codifica la NADPH oxidasa D se demostró que dicha proteína es necesaria para la amplificación de la señal de ERO durante el estrés por luz (Davletova y col., 2005).

¿Cómo son percibidas y transmitidas las señales de ERO al núcleo? Una posibilidad es que los cambios redox dentro de las organelas sean transmitidos a la membrana externa, donde un receptor proteico retransmite la señal a las vías citosólicas. Hasta ahora es poco lo que se conoce de estos supuestos receptores en la señalización organela-núcleo relacionada a ERO, pero existen precedentes. Una vez que la señal dependiente de ERO llega al citosol, deben ser transmitidas por cascadas de proteinquinas activadas por mitógenos (MAPK) que son reconocidas por su rol importante en las respuestas a estrés. En efecto, MPK6, un conocido participante de las respuestas al estrés biótico, ha sido recientemente implicado en la señalización retrógrada cloroplasto-núcleo (Vogel y col., 2014). Los módulos de señalización MAPK también podrían ser importantes en la transmisión de las señales relacionadas a ERO que se originan en las mitocondrias (Noctor y Foyer, 2016).

Los receptores solubles y unidos a membrana sensibles a redox serían quienes probablemente transmitan la señal redox al interior celular. Sin embargo, aunque algunos detalles de las vías de señalización están siendo dilucidados (Wrzaczek y col., 2015), la información de la identidad de los blancos iniciales que son afectados por ERO aún es escasa (Noctor y Foyer, 2016).

Además, se han propuesto al menos tres mecanismos diferentes para el sensado de ERO en las células vegetales: (1) proteínas receptoras aún no identificadas, (2) FT sensibles al estado redox de la célula como por ejemplo los FT del choque térmico (Hsfs) e (3) inhibición directa de fosfatasas por ERO (Apel y Hirt 2004, Miller y Mittler, 2006, Mittler 2002, Mittler y col. 2004, Pieterse y Van Loon, 2004). La identidad química y la fuente subcelular de las ERO que se acumulan durante el estrés podrían dictar el patrón específico de expresión de un grupo de genes y la inducción de ciertos mecanismos de defensa y aclimatación (Mittler y col. 2004).

La señalización mediada por ERO involucra proteínas G heterotriméricas (Joo y col. 2005) y la fosforilación de proteínas regulada por MAPK específicas y proteintirosinfosfatasas (Kovtun y col., 2000; Gupta y Luan, 2003; Rentel y col., 2004). Las bases bioquímicas y estructurales de la activación de ERO vía quinasas podría estar relacionada con la oxidación de grupos tioles. El sistema de transducción de señales redox mejor caracterizado en plantas es el *sistema ferredoxina-tiorredoxina* del estroma de cloroplasto, que funciona en la regulación del metabolismo del carbono fotosintético. La transmisión de la señal involucra la conversión de tioles disulfuro en enzimas blanco y una disminución en la inducción por luz en el potencial redox de tiorredoxina (Setterdahl y col., 2003). La regulación basada en tioles puede ser importante en la aclimatación de las plantas a los cambios ambientales, particularmente donde las interacciones redox juegan un rol clave en la organización de la respuesta al estrés abiótico. Mientras los ajustes redox son centrales en la mayoría de las respuestas a estrés, la extensión en que las concentraciones de ERO aumentan como resultado del estrés es altamente variable. Muchas observaciones sugieren que los cambios en el estado del glutatión podrían ser tan importantes como aumentar el *pool* de ERO en la señalización redox (Creissen y col., 1999; Vanacker y col., 2000; Mou y col., 2003; Ball y col., 2004; Gomez y col., 2004b; Evans y col., 2005).

Actualmente está claro que las ERO están involucradas en señalización sistémica de larga distancia (Miller y col., 2009). Nuestro conocimiento del movimiento subcelular de metabolitos activos redox como H₂O₂, glutatión, y ASC es muy limitado. Las membranas externas de cloroplastos y mitocondrias son permeables a la mayoría de los metabolitos, aunque es posible que exista cierta selectividad incluso en este nivel (Bolter y Soll, 2001). Las membranas internas son una barrera importante para el movimiento de metabolitos, por lo que se requiere de transportadores. En *Arabidopsis* se han descrito a nivel molecular los transportadores de glutatión (CLT-like) y ASC (AtPHT4.4) en la envoltura interna cloroplástica (Maughan y col., 2010; Miyaji y col., 2014).

El transporte de ERO o compuestos relacionados desde las organelas al exterior para afectar la transcripción o traducción (o ambos) podría considerarse una limitante en la efectividad, ya que el tiempo de vida media de las ERO es corto. En cambio, los cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas son estructuras más dinámicas que fijas y pueden producir extensiones en forma de túbulos llenos de líquido que contienen los componentes solubles de los compartimentos. Estas estructuras son conocidas como estrómulos (cloroplastos), matrículos (mitocondrias), y peróxulos (peroxisomas) (Scott y col., 2007; Foyer y Noctor, 2007). Desde hace unos años se sabe que la formación de peróxulos es estimulada por el estrés

oxidativo (Sinclair y col., 2009). Recientemente se ha reportado que la aplicación de H₂O₂ o ácido salicílico (AS) a hojas de tabaco estimula la generación rápida de estrómulos (dentro de 1h; Caplan y col., 2015). Además, la formación de estrómulos está regulada por una proteína específica localizada en la membrana de la envoltura externa del cloroplasto, llamada CHUP1 (*chloroplast unusual positioning 1*). Este estudio reportó la transferencia de metabolitos y proteínas de señalización, tales como H₂O₂, al núcleo directamente desde el cloroplasto (Caplan y col., 2015). Cabe resaltar que todas las clases de plástidos, no solamente los cloroplastos, pueden formar estrómulos que pueden asociarse a la membrana plasmática y las mitocondrias, así como también al núcleo. Esto sugiere que puede ocurrir la transferencia directa de proteínas y metabolitos entre estas organelas y el apoplasto. Esto ofrece una ruta alternativa al sistema de transporte transmembrana para el pasaje de componentes redox (Noctor y Foyer, 2016).

Por otro lado, las organelas pueden cambiar sus propiedades dinámicas y comunicarse con otras en respuesta a su ambiente. La funcionalidad celular requiere del movimiento de las organelas, incluyendo la comunicación cruzada entre organelas y para señalización (Rodríguez-Serrano y col., 2009; Suzuki y col., 2012). Los peroxisomas son organelas altamente dinámicas, pueden aumentar en número bajo condiciones de estrés inducidas por ozono, luz, xenobióticos, salinidad y metales, en un proceso llamado proliferación (Oksanen y col., 2003; Mitsuya y col., 2011; Sandalio y col., 2013). La proliferación de peroxisomas ocurre a través de un proceso complejo que involucra elongación, constricción y fisión (Hu y col., 2012). Unos de los mayores desafíos en la investigación en peroxisomas es descifrar las vías de señalización que gobiernan la regulación de este proceso bajo diferentes condiciones ambientales y metabólicas. Algunas evidencias sugieren que la proliferación de los peroxisomas está dirigida por ERO, dado que los genes involucrados en la biogénesis peroxisomal son regulados por H₂O₂ tanto en plantas como en animales (Lopez-Huertas y col., 2000). Esto sugiere que la proliferación peroxisomal puede ser un mecanismo de protección contra el estrés oxidativo. Sin embargo, las mutantes de *Arabidopsis* y tabaco que muestran una proliferación constitutiva de peroxisomas no evidencian mayor resistencia a los tratamientos con sal o infecciones, esto probablemente se deba a un desbalance en la homeostasis redox (Mitsuya y col., 2011; Valenzuela-Soto y col., 2011). Aunque aún no ha sido establecido el rol que desempeñan estos cambios en la dinámica de los peroxisomas, se ha sugerido que podrían (1) mejorar la detoxificación de H₂O₂ en las diferentes partes de la célula; (2) ayudar en los procesos de señalización; y (3) facilitar el importe de proteínas nuevas, necesarias para la defensa (Rodríguez-Serrano y col., 2009). Por lo tanto, los peroxisomas pueden actuar como

sensores de ERO/cambios redox en la célula y probablemente desencadenen una respuesta rápida y muy específica a señales ambientales, aunque aún debe ser estudiado en mayor profundidad (Sandalio y Romero-Puertas., 2015).

Adicionalmente es importante destacar el rol del espacio extracelular apoplástico, un ambiente ácido que ha recibido mucha atención como sitio donde se producen y perciben compuestos oxidantes como las ERO. En cuanto a los controles redox en el apoplasto y en el citoplasma se sabe que: (1) la membrana plasmática es un sitio importante para la percepción y transducción de señales ambientales a través de señales redox; (2) los cambios redox apoplásticos facilitan interacciones entre proteínas receptoras que contienen tioles oxidables que se ubican en o cerca de la superficie de membrana; (3) debido a que la capacidad amortiguadora redox apoplástica es baja, existe un gradiente redox pronunciado a través de la membrana plasmática; (4) este gradiente desencadena o desarrolla actividad de canal de membrana involucrando la liberación de calcio y el funcionamiento de acuaporinas y peroxiporinas. Además, la baja amortiguación antioxidante apoplástica permite que algunas reacciones sean activadas por eventos de señalización inducidos por oxidantes secundarios en la pared celular, tales como la liberación de pequeños oligosacáridos generados durante la ruptura de las pectinas (Foyer y Noctor, 2005).

Además del apoplasto, el lumen tilacoide es otro compartimiento en el que la baja amortiguación antioxidante puede aumentar o facilitar la señalización redox. La membrana tilacoide transporta ASC solamente por difusión (Foyer y Lelandais, 1996; Horemans y col., 2000), a pesar de la localización de las reacciones claves que requieren ASC tales como la deepoxidación de violaxantina en el lado interno de la membrana. La baja amortiguación antioxidante podría permitir la acumulación de señales oxidativas dentro del lumen, lo que podría ser importante en la transducción de la señal redox y conduciría a una muerte celular programada (PCD) (Foyer y Noctor, 2005).

Existen dos tipos de señalización que se diferencian entre sí por la distancia y la escala de tiempo. Se pueden distinguir la señalización por ERO a tiempos cortos y otra a tiempos largos. La primera no involucra estrés oxidativo y ocurriría de segundos a minutos; es el enfoque más estudiado tanto dentro de las células como entre las mismas (Miller y col., 2009; Verstergaard y col., 2013). En la señalización a tiempos largos (horas a días) es necesaria la producción de ERO sostenida para alcanzar un umbral de perturbación del estado celular redox que active las vías de señalización (Foyer y Noctor, 2016). Uno de los procesos de señalización más largos estudiados es la señalización relacionada a patógenos (PR), e involucra AS y otras fitohormonas.

Muchas fitohormonas y compuestos de señalización, cuya síntesis ocurre al menos en parte en cloroplastos (por ejemplo, ABA, AS, jasmonatos, estrigolactonas), están íntimamente unidos a las vías de señalización dependientes de ERO. Sin embargo, es importante aclarar que, en la mayoría de los casos la activación de la síntesis de una fitohormona en particular ha sido precedida por la transducción de la señal de ERO al núcleo, que activa la expresión de los genes apropiados para su síntesis (Noctor y Foyer, 2016).

La señalización por ERO tiene una posición central en la interfase entre metabolismo y respuestas de desarrollo o medioambientales (Foyer y Noctor, 2005). También implica que aún la misma ERO producida en la misma localización puede no siempre desencadenar una respuesta uniforme y predecible. Un buen ejemplo que muestra que la señalización por ERO es altamente dependiente del contexto proviene del análisis de los efectos de las ERO producidas por fotorrespiración. El exceso de producción de ERO en los peroxisomas desencadena respuestas de estrés oxidativo que son dependientes de la longitud del día (Chaouch y col., 2010). El crecimiento en condiciones de día largo permite al H₂O₂ del peroxisoma desencadenar una respuesta PR que no se daría en plantas crecidas en condiciones de día corto, un efecto que está ligado al estado de fosforilación de las proteínas (Li y col., 2014). El contexto de día largo también favorece el desarrollo de lesiones en respuesta a una exposición de *Arabidopsis* a ozono, una condición que inicialmente desencadena una gran producción de ERO inicial y estrés oxidativo en el apoplasto (Dghim y col., 2013).

1.5 Genes que codifican proteínas de función desconocida.

Aproximadamente el 40% de las proteínas codificadas en genomas eucariotas son proteínas de función desconocida (PFD) (Horan y col., 2008). En el caso de *Arabidopsis*, a pesar de que su genoma fue secuenciado hace más de 15 años (*Arabidopsis Genome Initiative*, 2000), aún se desconoce la función de muchos de sus genes. Es por esto que uno de los principales desafíos de la biología moderna es poder determinar la función de cada uno de ellos.

Existen dos métodos para definir PFD en organismos modelos, el método *in silico* o de similitud y el método empírico. El más usado es el método *in silico*, que considera PFD a todas aquellas proteínas que no muestran similitudes de secuencia o estructurales detectables con proteínas de función conocida en bases de datos de referencia (Boeckman y col., 2003; Leinonen y col., 2004). El método empírico es un método más conservador, que considera PFD a todas aquellas proteínas para las que no existe evidencia experimental directa que demuestre su función específica (Horan y col., 2008).

El término función génica puede tener diferentes significados para diferentes personas, razón por la cual es importante usar un vocabulario controlado para definirlo explícitamente. El sistema de palabras de Ontología Génica (OG) plantea que se puede definir a la función génica usando tres dominios: **componente celular** (componentes subcelulares donde actúa ese gen), **función molecular** (actividades bioquímicas del producto génico) y **proceso biológico** (objetivos de las actividades del producto génico) (Rhee y Mutwil, 2014).

El 40% de los genes de *Arabidopsis thaliana* y el 1% de *Oryza sativa* (arroz) que codifican proteínas tienen algún aspecto de sus funciones anotadas en base a evidencia experimental (Figura 1.3 A). Aunque solamente conocemos la función biológica completa (con sus tres dominios asignados) del 5% de los genes de *Arabidopsis* mediante evidencia experimental (Figura 1.3 B). Es difícil determinar el número de genes caracterizados experimentalmente en bases de datos públicas para cualquier especie de planta que no sea *Arabidopsis* y arroz, lo que resulta en un factor limitante a la hora de entender como están organizados, funcionan y cómo han evolucionado los procesos biológicos en plantas.

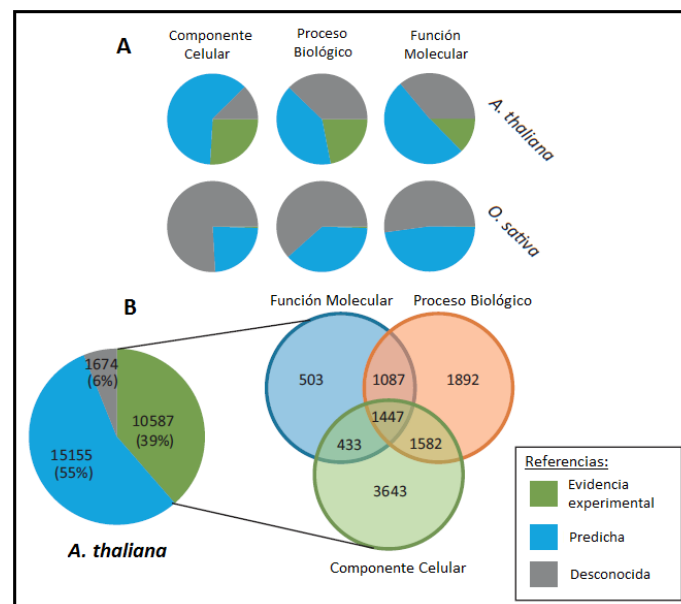


Figura 1.3: Estado de la caracterización funcional de los genes de *Arabidopsis* y de *Oryza sativa*.

A) Cada gráfico circular muestra la proporción de genes que están anotados según OG: función molecular, proceso biológico y componente celular, basados en evidencia experimental (verde), predicciones computacionales (azul) y no caracterizadas o no anotadas (gris). **B)** Anotación completa para *A. thaliana*. El gráfico circular muestra el número y proporción de genes anotados para al menos un dominio OG. El digrama de Venn muestra el número de genes anotados para cada dominio de OG basado en evidencia experimental.

Figura adaptada de Rhee y Mutwil (2014).

Los métodos *in silico* hacen uso de las grandes cantidades de información generadas a través de las tecnologías -ómicas (Rhee y Mutwil, 2014). La información -ómica utilizada para inferir función génica puede ayudar a explicar la función de productos génicos tanto por medida directa como por programas de inferencia. Generalmente un tipo particular de información -ómica es útil para determinar un dominio particular de OG. Por ejemplo, la información de los péptidos secuenciados de un compartimiento subcelular aislado es útil para asignar productos génicos a componentes celulares pero es menos útil para asignar procesos biológicos. Además, la similitud de secuencias entre proteínas permite inferir función molecular (Tian y Skolnick, 2003). Finalmente, analizar los interactomas de alto rendimiento puede ayudar a inferir procesos biológicos ya que proteínas que interactúan físicamente tienden a estar involucradas en los mismos procesos biológicos (Vazquez, 2003; Rhee y Mutwil, 2014).

Información genómica: Los avances en la secuenciación y en el ensamble de genomas ha permitido obtener la secuencia de los genomas de 40 especies de plantas y casi 7000 especies de otros reinos (Pagani y col., 2012; Schatz y col., 2012). La información genómica puede emplearse para inferir función molecular y procesos biológicos. Generalmente una identidad de secuencia mayor al 60% puede predecir función enzimática con al menos un 90% de exactitud (Tian y Skolnick, 2003). Un error común que resulta de la inferencia basada en secuencia es que una alta similitud de secuencia no siempre garantiza la misma función (Rost, 2002). Puede citarse como ejemplo el caso del precursor de endoquitinasa ácida WIN6.2b que posee una secuencia idéntica a la proteína DNA Topoisomerasa II en un 94%, siendo la función de la primera hidrolizar los enlaces $\beta 1 \rightarrow 4$ de N-acetil-D-glucosamina de los polímeros de quitina, mientras que la función de la segunda es ruptura, separación y religación del ADN doble hebra de manera ATP-dependiente (Rost, 2002). Tampoco una baja similitud de secuencia imposibilita una función similar (Galperín, 1998). Como por ejemplo el caso de la enzima SOD de *E. coli* y la de humano, presentan un plegamiento estructural diferente pero llevan a cabo la misma función. Además, una gran proporción de los genomas de plantas no poseen similitud de secuencias con ningún gen caracterizado, lo que hace inaplicable la inferencia por similitud de secuencia en estos casos.

Información transcriptómica: la información transcriptómica captura cambios en los niveles de expresión génica de todos los genes de un organismo en un momento determinado y representa una fuente de datos que crece rápidamente. Los análisis de co-expresión se basan en la observación de que genes funcionalmente relacionados frecuentemente poseen perfiles de expresión similar en diferentes experimentos y se ha vuelto una herramienta muy poderosa

para la genética reversa. Generalmente se utiliza para inferir procesos biológicos, aunque recientemente también se ha comenzado a utilizar para inferir componentes celulares. Los análisis de co-expresión se han utilizado exitosamente para estudiar muchos procesos en plantas que incluyen biosíntesis de pared celular secundaria, biosíntesis de ácidos grasos y metabolismo especializado (Persson y col., 2005; Han y col., 2012; Maeda y col., 2011).

Información interactiva: Generalmente, la interacción de dos proteínas implica que actúan en el mismo proceso biológico y en el mismo componente celular. Aunque existe una gran cantidad de información reportada para Arabidopsis sobre interacciones proteína-proteína, solamente el 2% de su interactoma ha sido confirmado (Stark y col., 2011). La información sobre interacciones proteína-proteína frecuentemente tiene falsos positivos (interacciones espúreas) y falsos negativos (pérdida de interacciones relevantes) aproximadamente en un 50%. Se ha sugerido validar la información sobre estas interacciones con al menos dos estudios independientes de manera de aumentar la confianza y la cobertura de estas interacciones.

Para caracterizar experimentalmente la función de una PFD, habitualmente se emplean técnicas de genética clásica directa y reversa. Con la creciente disponibilidad de las secuencias génicas de Arabidopsis se han vuelto posibles los *screenings* mediante genética reversa, permitiendo un análisis directo de mutantes para genes específicos, seleccionados por su potencial impacto en una función biológica de interés (Bolle y col., 2011).

La principal herramienta para analizar la función de un gen es caracterizando los cambios fenotípicos asociados a la inactivación total del gen, es decir mediante mutación por pérdida de función. Esta pérdida de función se logra mediante mutaciones puntuales o inserciones o deleciones pequeñas, o bien otra alternativa son las mutaciones insercionales mediante un segmento de ADN que se integra en el genoma de la planta (ADN de transferencia, ADN-T). Sin embargo, esta técnica tiene la limitación de que no sirve para identificar genes con función redundante o que generan un fenotipo letal. Para estos casos o cuando no se dispone de la mutante insercional pueden generarse líneas con niveles reducidos de expresión mediante silenciamiento génico. Estas líneas mostrarán un patrón de fenotipos que dependen de la actividad remanente del gen en estudio (Bolle y col., 2011).

Otra alternativa es la técnica de mutación por ganancia de función la cual puede llevar a la activación constitutiva de un gen o a la alteración de los niveles o patrones de expresión del gen.

1.6 Genes elegidos para su estudio

Para poder asignar un rol determinado a una ERO específica en señalización del estrés se debe poder confinar su generación en un único compartimiento intracelular, en un tiempo corto y con una intensidad del estrés severa pero no excesiva para evitar daños colaterales. Mediante un tratamiento con MV en luz, es posible generar anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$) en forma continua en cloroplastos.

Previamente en el laboratorio se ha analizado en forma global el transcriptoma de *Arabidopsis* utilizando chips de Affymetrix (Gene Chip), detectando los cambios de expresión génica luego de someter plántulas a estrés oxidativo mediante la aplicación del herbicida MV durante 2 h (Scarpeci y col., 2008). La aplicación del herbicida durante un tiempo corto favorece la detección de genes de respuesta temprana, los cuales se espera que codifiquen para proteínas regulatorias o de señalización tales como proteínquinasas o proteínfosfatasas y FT.

Luego de evaluar la expresión de más de 22.000 genes se identificaron entre otros, 30 genes que codifican para FT, 23 que codifican para señalización y 68 de función no asignada, de los cuales se seleccionaron tres para caracterizar en este trabajo de tesis doctoral: **At5g44910**, **At2g33710** y **At1g07050**. Los dos primeros resultaron inducidos mientras que el último resultó reprimido luego del tratamiento aplicado (Scarpeci y col., 2008).

El gen **At5g44910** codifica para una proteína similar a las proteínas de Resistencia (R) de plantas, ya que contiene un dominio TIR (*Toll- and Interleukin-1 like Receptors*), pero carece de los dominios de unión a nucleótido (NB) y el dominio de repeticiones ricas en Leucina (LRR), característicos de las proteínas R. Esta proteína pertenece a la familia de proteínas TIR-X (TX), que presenta un dominio TIR y un dominio X. Los resultados obtenidos para la caracterización funcional de este gen se presentan en el Capítulo I de esta Tesis.

El gen **At2g33710** codifica para un Factor de Transcripción (FT) que pertenece a la superfamilia APETALA2 (AP2)/Factor de Respuesta a Etileno (ERF), exclusiva de plantas. Los resultados obtenidos para la caracterización funcional de este gen se presentan en el Capítulo II de esta Tesis.

El gen **At1g07050** codifica para una proteína que pertenece a la familia de proteínas con motivo CCT (CMF, del inglés "*CCT Motif Factor*"). El dominio CCT (CONSTANS, CO-like, and TOC1) es un dominio básico de 43 AA altamente conservado en proteínas de plantas y se encuentra cercano al extremo C-terminal. Los resultados obtenidos para la caracterización funcional de este gen se presentan en el Capítulo III de esta Tesis.

1.7 Modelo de trabajo: *Arabidopsis thaliana*

A. thaliana es una planta pequeña angiosperma, perteneciente a la familia de las crucíferas; es ampliamente utilizada como organismo modelo en biología molecular y celular debido a que: su ciclo de vida es corto, toma de 6 a 8 semanas desde la germinación hasta la producción de semillas maduras; es una especie autopolinizante, lo que simplifica los análisis genéticos (Flavell y col., 2005, Bevan y col., 2004). Pero existen dos contribuciones muy importantes que han convertido a esta crucífera en el modelo de elección: el desarrollo de un sistema de transformación eficiente (técnica de “*floral dip*”, Clough y Bent, 1998) y la secuenciación completa de su genoma que se terminó en el año 2000 (*Arabidopsis Genome Initiative*, 2000). Junto a esto se han desarrollado gran cantidad de herramientas: bases de datos de secuencias nucleotídicas y de AA, colecciones de mutantes, programas para análisis bioinformáticos, entre otras, las cuales están disponibles para toda la comunidad científica lo que permite que la caracterización funcional de genes en *Arabidopsis* sea usada como base para luego extrapolar lo estudiado a otras plantas de interés agronómico.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general:

- ✓ Caracterizar genes que codifican para proteínas de función desconocida involucradas en la respuesta a estrés oxidativo en plantas

2.2 Objetivos específicos:

- ✓ Modificar los niveles de expresión "*in planta*" de al menos tres proteínas a caracterizar utilizando técnicas de genética reversa
- ✓ Caracterizar las líneas obtenidas teniendo en cuenta aspectos morfológicos, bioquímicos y fisiológicos a lo largo del ciclo de vida de las plantas
- ✓ Analizar los efectos de la aplicación de estrés abiótico en la fisiología de las plantas modificadas genéticamente
- ✓ Integrar los datos generados y relacionarlos con las observaciones realizadas respecto a la resistencia diferencial de las plantas a los estreses aplicados

Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal utilizado

Como control de todos los experimentos y para la generación de líneas sobreexpresantes y silenciadas se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) ecotipo Col-0 las cuales fueron provistas por el *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC, www.arabidopsis.org). Para el aislamiento de las líneas *knock-out* homocigotas se emplearon semillas de las líneas SALK_140249 y SALK_000861 que poseen una inserción de ADN-T en los genes *At1g07050* y *At5g44910* respectivamente (<http://signal.salk.edu/>).

3.2 Esterilización de semillas

Las semillas fueron puestas en tubos eppendorf, se les agregó 300 μL de etanol 80% v/v, se homogeneizaron y luego se dejaron decantar. Luego de descartar el sobrenadante (SN), se agregó 300 μL de NaClO 5,5 g/L y se agitó durante 10 min. Posteriormente se las lavó con 300 μL de H₂O destilada estéril 4 veces. Finalmente, las semillas se resuspendieron en 300 μL de H₂O destilada estéril y se esparcieron en papel secante estéril para su secado. El procedimiento se realizó en flujo laminar.

3.3 Sincronización de la germinación

Para la sincronización de la germinación, las semillas se mantuvieron durante 3 días a 4°C en oscuridad.

3.4 Crecimiento de plantas en tierra

Las plantas de *Arabidopsis* fueron crecidas en potes de plástico que contenían tierra Growth Mix MultiPro e iluminadas con una intensidad de 120-150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bajo un régimen de día largo (16 h de luz/8 h de oscuridad). Las plantas se crecieron a una temperatura de 22°C, humedad relativa de 65-75% y se regaron 3 veces por semana.

3.5 Crecimiento de plantas en medio definido

Las semillas de *Arabidopsis* esterilizadas fueron sembradas en placas de petri conteniendo 15 mL de medio agar 0,8% p/v con 0.5 X de sales de Murashige & Skoog (MS, Sigma). A este medio se le agregó sacarosa 1% p/v, antibióticos, herbicidas u otros compuestos en los casos en que fue necesario.

3.6 Métodos generales para el clonado de fragmentos de ADN y análisis de recombinantes

3.6.1 Cepas bacterianas utilizadas

En la realización de los clonados y subclonados se utilizó la cepa *Escherichia coli* (*E. coli*) TOP10 [Genotipo: F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* *endA1* *nupG*]. Para la transformación de plantas se utilizó la cepa *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) GV3101 pMP90. Para la expresión de proteínas se utilizó la cepa *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus-RIL strain (Novagen).

3.6.2 Plámidos utilizados

Plásmido	Características relevantes
pCR TM -Blunt (Invitrogen)	3512 pb, origen de replicación pUC, Promotor Lac, ORF LacZ-alfa, ORF para el gen letal <i>ccdB</i> , resistencia a Kanamicina (Kan ^R) y Zeocina. Linealizado con extremos romos
pBINAR	12.000 pb. Vector binario que permite la transformación de plantas mediada por <i>A. tumefaciens</i> . CaMV (Virus del Mosaico del Coliflor) 35S, sitio de múltiple clonado y <i>nptII</i> (Kan ^R en plantas). Por fuera de la región ADN-T posee Kan ^R en bacterias.
pBI101.1	12.200 pb. Vector binario derivado de pBIN19. Contiene en la región del ADN-T: el sitio de múltiple clonado del pUC19, seguido del gen <i>uidA</i> que codifica para la enzima β -glucuronidasa (GUS); <i>nptII</i> (Kan ^R en plantas). Por fuera de la región ADN-T posee Kan ^R en bacterias y el ori bacteriano RK2.
pCHF3	10.501 pb. Vector binario que permite la transformación de plantas mediada por <i>A. tumefaciens</i> , contiene en la región del ADN-T: CaMV35S, sitio de múltiple clonado y <i>nptII</i> (Kan ^R en plantas). Por fuera de la región ADN-T posee Espectinomicina ^R en bacterias.
CS52	11.206 pb. Vector binario derivado de pCHF3 con el gen <i>gfp</i> que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) luego del sitio de múltiple clonado.
pET-28-a	5369 pb. Vector de expresión que posee una cola de histidinas (His) en su extremo N-terminal con una configuración His•Tag [®] /trombina/T7•Tag [®] y una cola de His opcional en su extremo C-terminal. Origen de replicación f1 y pBR322, promotor T7, terminador T7, secuencia codificante lacI y Kan ^R .

3.6.3 Extracción de ADN plasmídico

Para la extracción de ADN plasmídico a partir de células de *E. coli*, 1,5 mL de cultivo de células crecidas durante la noche a 37°C en medio Luria-Bertani (LB, BD Difco) con el antibiótico correspondiente se centrifugaron a temperatura ambiente durante 3 min a 2.700 g y se descartó el SN. Las células se resuspendieron en 100 µL de lisógeno 1 (Tris-HCl 25 mM pH 8; EDTA 10 mM pH 8). Luego se agregó 200 µL de lisógeno 2 (NaOH 0,05N; SDS 1% p/v) preparado en el momento, se mezcló por inversión y se dejó reposar a temperatura ambiente hasta que la solución quedó translúcida. Se agregó 150 µL de lisógeno 3 (KAc 3M pH 4,8) y se homogenizó suavemente, se centrifugó 5 min a máxima velocidad para eliminar restos celulares y se transfirió el SN a otro tubo. Luego se agregó 2 volúmenes de etanol absoluto, se homogenizó por inversión y se dejó 30 min en hielo, se centrifugó 15 min a máxima velocidad a 4°C y se descartó el SN. Por último, se realizó un lavado con etanol 70% v/v con posterior centrifugación de 5 min a máxima velocidad, se retiró el SN, se dejó secar y se resuspendió en 30 µL de una solución de RNasa A 100 µg/mL.

Para la preparación de ADN plasmídico para secuenciación, luego de su obtención el ADN fue precipitado mediante el agregado de 7,5 µL de NaCl 4 M y 37,5 µL de Polietilenglicol 8.000 13% p/v e incubado en hielo durante 30 min. Luego de centrifugar a máxima velocidad durante 30 min a 4°C se eliminó cuidadosamente el SN y finalmente el ADN precipitado se resuspendió en 20 µL de H₂O milliQ (Biopore) estéril.

3.6.4 Electroforesis en geles de agarosa

La separación de fragmentos de ADN fue realizada mediante electroforesis en geles de agarosa 1% p/v en buffer TAE 1 X (Tris-HCl 0,04 M pH 8; ácido acético 0,02 M; EDTA 0,001 M). Las muestras fueron sembradas con buffer de siembra 10 X (azul de bromofenol 0,25% p/v, xylene cyanol 0,25% p/v, glicerol 30% v/v en H₂O). La electroforesis se llevó a cabo en buffer TAE 1 X a una corriente constante de 100 mA. Para la visualización de los fragmentos, los geles se incubaron luego de la corrida en una solución del colorante Gel Green (GenBiotech) 5% v/v durante 30 min con agitación luego de lo cual se observaron en un transiluminador. Para estimar los tamaños de los fragmentos se usó One Kb ladder (Invitrogen) como marcador de peso molecular.

3.6.5 Secuenciación de ADN

Los plásmidos y fragmentos de ADN aislados fueron enviados a secuenciar al *DNA Sequencing Facility* de la Universidad de Maine, USA (<http://www2.umaine.edu/dnaseq/index.htm>).

3.6.6 Digestión con enzimas de restricción

Las reacciones de restricción se llevaron a cabo de acuerdo a los protocolos de los fabricantes para cada enzima utilizada (Roche-Promega-Invitrogen) en un volumen final de 20 μ l.

3.6.7 Purificación de fragmentos de ADN

Para la purificación de fragmentos de ADN cortados con enzimas de restricción y de fragmentos amplificados por PCR se utilizó el kit de purificación Illustra GFX (GE Healthcare).

3.6.8 Ligación de fragmentos de ADN

Las reacciones de ligación se realizaron utilizando la enzima T4 ADN ligasa (Promega) durante toda la noche a 16°C en un volumen final de 10 μ L, en el buffer y las condiciones indicadas por el fabricante.

3.6.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de amplificación se realizaron con las enzimas Pfu (Promega), Pfx (Invitrogen) o Taq polimerasa (Invitrogen), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

3.6.10 Cebadores utilizados

Se diseñaron cebadores para realizar los clonados correspondientes a los genes: AtTX24 (At5g44910), FITNESS (At1g07050) y ERF112 (At2g33710) que se detallan en la Tabla Suplementaria 3.1. También se diseñaron cebadores para cuantificar mediante PCR en tiempo real niveles de transcritos seleccionados los cuales se detallan en la Tabla Suplementaria 3.2 (Ver sección 9. Materiales Suplementarios).

3.6.11 Subclonado en vector comercial

Para los subclonados de los productos de extremos romos de PCR se utilizó el vector pCRTM-Blunt (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

3.6.12 Extracción de ARN de Arabidopsis

Para la extracción de ARN total, el material vegetal fue cosechado e inmediatamente congelado en N₂ líquido. El material fue molido finamente en mortero en presencia de N₂ líquido. A 100 mg de polvo vegetal se le adicionó 1 mL de TRIZOL (Invitrogen), se aplicó vortex 30 s y se incubó a temperatura ambiente 5 min. Se centrifugó a 12.000 g durante 10 min a 4°C. Al SN obtenido se le agregó 400 μ L de cloroformo, se aplicó vortex durante 15 s luego de lo cual se incubó a temperatura ambiente 5 min. Para separar las fases, se centrifugó a 12.000 g durante 15 min a 4°C conservándose finalmente la fase acuosa. El ARN se precipitó con el

agregado de 0,6 volúmenes de isopropanol y 0,1 volúmenes de NaAc 3 M. Se incubó 30 min en hielo y se centrifugó a 12.000 *g* durante 10 min a 4°C. Se descartó el SN y se lavó dos veces el precipitado con 300 µL de etanol 70% v/v centrifugando a 12.000 *g* durante 5 min a 4°C. Luego se secó el precipitado a temperatura ambiente durante 10 min y se resuspendió en 50 µL de DEPC-H₂O H₂O milliQ (Biopore) estéril.

La integridad del ARN extraído se analizó en geles de agarosa y se midió su concentración mediante medidas de absorbancia a 230, 260 y 280 nm con espectrofotómetro V-630 Spectrophotometer (Jasco).

3.6.13 Síntesis de la hebra de ADNc

Previo a la síntesis de ADN complementario (ADNc), 2 µg del ARN total extraído se trataron con la enzima DNAsa (Promega). La síntesis de ADNc se realizó utilizando la enzima SuperScript III (Invitrogen) en presencia de RNasin (Promega). Todos los pasos se hicieron de acuerdo a las condiciones recomendadas por los fabricantes.

3.6.14 Extracción de ADN de Arabidopsis

Para extraer ADN genómico (ADNg) de Arabidopsis se pulverizaron en un mortero 200 mg de tejido foliar en presencia de N₂ líquido y se le agregaron 400 µL de buffer de extracción (Tris HCl 200 mM pH 7,5; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM y SDS 0,5% v/v). Se aplicó vortex durante 5 s y se incubó en hielo aproximadamente 1 h luego de lo cual se centrifugó a máxima velocidad 2 min a 4°C. Se transfirieron 300 µL del SN a un tubo nuevo y se agregó 300 µL de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se incubó 2 min a temperatura ambiente para precipitar el ADN. Luego se centrifugó 5 min a máxima velocidad a 4°C y se descartó el SN. El pellet se lavó con 400 µL de etanol 70 % v/v y se centrifugó 2 min a máxima velocidad. Se descartó el SN. Este paso de lavado se repitió una vez más. El pellet obtenido se secó al aire y finalmente se resuspendió en 100 µL de una solución de RNasa A 100 µg/mL dejándolo a 4°C toda la noche. Al día siguiente se centrifugó a máxima velocidad durante 2 min a temperatura ambiente luego de lo cual se transfirieron 90 µL a un tubo nuevo conservándose finalmente a -20°C.

3.6.15 Preparación de células competentes de *E. coli*

Para preparar células competentes se inocularon 10 mL de medio LB con 100 µL de un cultivo de *E. coli* TOP10 saturado. Las células se crecieron a 37°C con agitación hasta densidad óptica medida a 600 nm (DO_{600nm}) = 0,6 luego de lo cual se transfirieron a tubos eppendorfs estériles y se centrifugaron a 7.000 *g* durante 5 min a 4°C. El pellet resultante se lavó utilizando

500 μ L de solución 1 (MOPS 10 mM pH 7; KCl 10 mM). Finalmente, las células se resuspendieron en 500 μ L de solución 2 (MOPS 100 mM pH 6,5; CaCl₂ 50 mM; KCl 10 mM) y se incubaron durante 15 min en hielo. Luego de centrifugar a 7.000 *g* durante 5 min a 4°C las células competentes obtenidas se resuspendieron en 100 μ l de solución 2.

3.6.16 Preparación de células electrocompetentes de *A. tumefaciens*

Se repicó una colonia de la cepa la cepa *A. tumefaciens* GV3101 en 5 ml de LB suplementado con los antibióticos rifampicina 50 μ g/ml y gentamicina 25 μ g/ml. Se creció durante 48 h a 28°C con agitación. Este cultivo saturado se utilizó para inocular 100 ml de LB suplementado con los antibióticos correspondientes el cual se creció hasta alcanzar una DO_{600nm}=0.6. Luego se fraccionó el cultivo en 2 tubos de 50 ml en condiciones de esterilidad, se incubaron 20 min en hielo y se centrifugaron 20 min a 7.000 *g* a 4°C descartándose finalmente el SN. Las células obtenidas se lavaron resuspendiéndolas suavemente en 10 ml de H₂O helada estéril. Se centrifugó 10 min a 7.000 *g* a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se realizaron 3 lavados más. Finalmente, las células se resuspendieron en 1 ml de glicerol 10% v/v estéril frío y se alicuotaron en tubos estériles 100 μ l por tubo. Se enfriaron inmediatamente en N₂ líquido y se almacenaron a -80°C.

3.6.17 Transformación de células procariotas

Las células de *E. coli* TOP10 fueron transformadas mediante el método químico que utiliza CaCl₂. Las células de *A. tumefaciens* GV3101 pMP90 fueron transformadas mediante electroporación.

3.6.17.1 Método químico

Se partió de un tubo de células competentes de *E. coli* (sección 3.6.15). Se agregó 5 μ l de una mezcla de ligación o 1 μ l de plásmido circularizado y se incubó 30 min en hielo. Luego se aplicó un shock térmico de 42 s a 42°C luego de lo cual se agregó 300 μ L de medio LB y se incubó 1 h a 37°C. Luego se centrifugó durante 2 min a 3.000 *g* a 4°C, se resuspendió en 100 μ L de medio LB y se sembró en placas de Petri conteniendo 15 mL de medio LB agar 1,5% p/v con el antibiótico de selección correspondiente. Las placas fueron incubadas a 37°C durante toda la noche.

3.6.17.2 Electroporación

Se colocaron 100 μ L de la suspensión de células competentes y 2 μ L de la solución plasmídica (aproximadamente 1 μ g de plásmido) en una cubeta de electroporación de 0,1 cm de paso. Las condiciones de electroporación utilizadas fueron: 25 μ F, 1,8 kV y 200 Ohms en un

electroporador Gene Pulser (BioRad). Luego de la descarga eléctrica el contenido de la cubeta se transfirió a un tubo conteniendo 1 ml de medio LB el cual se incubó 1 h a 28°C con agitación constante. Se sembraron 100 µL de la suspensión de células en placas de Petri conteniendo 15 mL de medio LB agar 1,5% p/v con los antibióticos correspondientes, las placas fueron incubadas a 28°C durante 48 h.

3.6.18 Transformación estable de Arabidopsis

La transformación estable de Arabidopsis se realizó utilizando la técnica *floral dip* (Clough & Bent, 1998). Se sembraron y se crecieron plantas de Arabidopsis como se describe en la sección 3.4 hasta que presentaron flores para realizar la transformación.

Se inocularon 2 mL de medio LB con los antibióticos correspondientes con una colonia aislada de *A. tumefaciens* GV3101 pMP90 transformado con el plásmido de interés. Las células se crecieron durante la noche a 28°C con agitación, al día siguiente se inocularon 400 µL del cultivo en 100 mL de LB con los antibióticos correspondientes y se dejaron crecer durante la noche a 28°C hasta una $DO_{600nm} > 2$. El cultivo obtenido se centrifugó a 7.000 g durante 10 min a 4°C. El pellet de células se resuspendió en 25 mL de una solución de sacarosa 5% p/v y silwet 0,02% v/v y se usó para sumergir las inflorescencias de Arabidopsis durante 30 s. Luego de esto, las plantas se dejaron en posición horizontal dentro de una bandeja cubierta con film durante toda la noche en oscuridad. Al día siguiente se retiró el film y se colocaron las plantas en posición vertical y en luz. Las semillas se recogieron al final del ciclo de vida de las plantas.

3.6.19 Selección de líneas transformantes estables

Las semillas provenientes de las plantas transformadas fueron esterilizadas (sección 3.2) y sembradas en medio sólido MS 0,5X agar 0,8% p/v con sacarosa 1% p/v y kanamicina 50 µg/ml, como agente de selección.

3.6.20 Mutagénesis sitio dirigida y PCR constructiva para la generación de líneas silenciadas utilizando la técnica de micro ARN artificiales (amiARN)

Se utilizó la técnica de PCR constructiva para realizar una mutagénesis sobre el precursor del miR319 de *A. thaliana* de modo de modificar la secuencia que codifica para el miARN y el miARN*, cada uno de 21 pb de longitud (Schwaby col., 2006). Para esto, se llevaron a cabo dos etapas de PCR, la primera consistió en introducir las mutaciones, y la segunda en reconstruir el precursor completo (Figura 3.1).

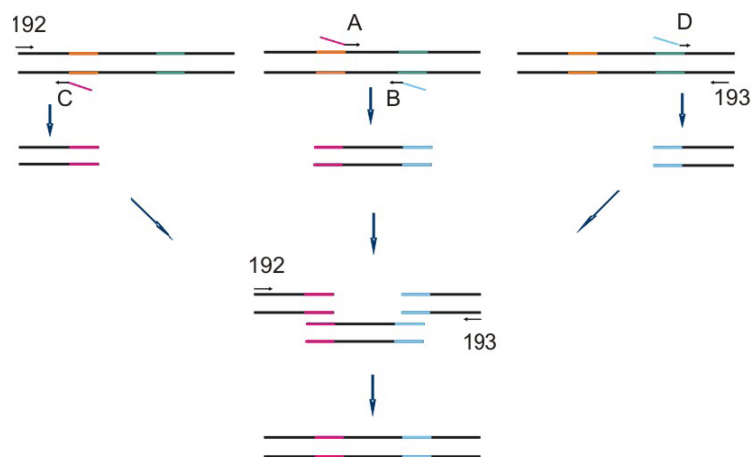


Figura 3.1: Preparación de amiARNs por PCR constructiva.

Esquema que representa las etapas de la mutagénesis sobre el precursor del miR319 para obtener un precursor de amiARN funcional. Las regiones que codifican para el amiARN* y el amiARN aparecen en color. Se detalla la utilización de los diferentes cebadores. Tomado de la tesina de la Lic. Valeria Crosa (2009).

La secuencia de los cebadores utilizados para las reacciones de PCR constructiva se especifican en la siguiente Tabla :

Nombre	Secuencia (5' - 3')
192	CATTTCAATTTGGAGAGAACACG
193	CGAAACCGATGATACGAACG
A	GTCCGAACATGTCGATGAATTTACAGGTCGTGATATGA
B	GTGCGAACTTGTCCATGAATATCAAAGAGAATCAATGAT
C	AATTCATCGACATGTTCCGGACCTACATATATATTCCTA
D	TATTCATGGACAAGTTCGCACCTCTCTTTGTATTCC

La primera parte de la PCR se llevó a cabo en tres tubos separados a los que se agregó: dNTPs 0,4 mM cada uno; Buffer Pfu con $MgCl_2$ 1 X; 0,75 U Pfu polimerasa (Promega); vector NB47 (contiene la secuencia del miARN319 de *A. thaliana*) 0,5 μ g; cebadores 0,4 μ M cada uno; y H_2O milliQ (Biopore) estéril para completar un volumen de 25 μ L. Los cebadores utilizados en este paso fueron: A + B en el tubo 1; 192 + C en el tubo 2; y 193 + D en el tubo 3. Se incluyó además un control negativo con una de las combinaciones de cebadores en ausencia del vector NB47. Luego de la reacción de amplificación se sembraron 3 μ L de cada tubo en un gel

de agarosa al 2% p/v teñido con Gel Green, junto con un marcador de peso molecular y el correspondiente control negativo de amplificación, para comprobar que los fragmentos tuvieran el tamaño deseado y no se generaran productos inespecíficos.

La segunda parte de la PCR ocurrió en un tubo de reacción conteniendo: dNTPs 0,4 mM cada uno; Buffer Pfu con $MgCl_2$ 1x; 0,75 U Pfu polimerasa (Promega); 1 μ L de cada una de las reacciones de la etapa 1, excepto en el control negativo; cebadores 192 y 193 0,4 μ M cada uno; H_2O para completar un volumen final de 25 μ L. El producto de esta etapa corresponde al precursor completo y una secuencia flanqueante a ambos lados correspondiente al vector molde, que contienen los sitios para las enzimas BamHI y PstI, por lo que el tamaño del producto final es de 286 pb.

El termociclado de las mezclas de reacción se llevó a cabo según el siguiente programa:

Etapa	Temperatura ($^{\circ}C$)	Tiempo (s)	N $^{\circ}$ de ciclos
Desnaturalización inicial	95	60	1
Desnaturalización	95	30	
Hibridación	55	30	35
Extensión	68	40	
Extensión final	68	60	1

El producto de PCR se clonó en el vector pCRTM-Blunt. Uno de estos clones se envió a secuenciar a fin de comprobar que las mutaciones introducidas eran las deseadas.

Para la transformación de Arabidopsis se subclonó el amiARN en el vector binario pCHF3 (Jarvis y col., 1998). Para ello, el fragmento obtenido por digestión del vector intermediario pCRTM-Blunt con las enzimas de restricción BamHI y PstI se purificó a partir de un gel de agarosa y se utilizó para su clonado en el vector pCHF3, previamente cortado con las mismas enzimas.

3.7 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Se diluyó 10 veces el ADNc sintetizado y se utilizaron 2,5 μ L como molde en la reacción de qPCR, en un volumen final de 10 μ L (mezcla de cebadores 1 mM, $MgCl_2$ 36 mM, dNTPs 0,2 mM, Platinum Taq (Invitrogen) 1 U, Buffer Platinum Taq 1X, SYBR green Roche 1 X).

El protocolo de amplificación fue: 95°C x 1 min, (95°C x 15 s, 60°C x 30 s, 72°C x 40 s) x 40 repeticiones. El protocolo de la curva de disociación para analizar los productos amplificados fue: 95°C x 15 s, 60°C x 15 s, gradiente 60°C – 95°C durante 20 min, 95°C x 15 s.

3.8 Análisis de proteínas

3.8.1. Preparación de extractos vegetales

Para la preparación de extractos vegetales en condiciones nativas, 20 mg de tejido vegetal y se homogenizaron dentro de un tubo eppendorf con un micropilón y se le agregaron 120 µL de buffer de extracción (K₃PO₄ 50 mM pH 7,8, glicerol 20% v/v y polivinil-pirrolidona 2% p/v). Luego se centrifugó a máxima velocidad a 4°C durante 10 min y se conservó el sobrenadante.

Para la preparación de extractos vegetales en condiciones desnaturizantes, se utilizó el buffer de extracción Tris-HCl 100 mM pH 8, glicerol 20% v/v, MgCl₂ 10 mM, EDTA 1 mM pH 8, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM y β-mercaptoetanol 14 mM.

3.8.2 Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas solubles se determinó mediante el ensayo de unión al colorante azul brillante de Coomassie G250 (Bradford, 1976), utilizando albúmina sérica bovina ($\epsilon_{280} = 0,667 \text{ mg/mL}$) como proteína patrón.

3.8.3 Electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Para la electroforesis en condiciones desnaturizantes, el extracto proteico se mezcló con buffer de siembra 4 X (Tris-HCl 250 mM pH 6,8, ditioneitol (DTT) 500 mM, β-mercaptoetanol 5% v/v, SDS 10% p/v, azul de bromofenol 0,5% p/v, glicerol 20% v/v) y se hirvió durante 5 min para desnaturizar la muestra. El gel de concentración se preparó con acrilamida 5% p/v y el gel de separación con acrilamida 12-15% p/v (Ausubel y col., 1987). La electroforesis se desarrolló a una intensidad constante de 20 mA en buffer Laemmli (Tris-HCl 0,3% p/v, glicina 1,44% p/v, SDS 0,1% p/v) en un equipo Mini-PROTEAN Tetra Cell (BIO-RAD). El gel se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250 0,05% p/v, metanol 50% v/v; ácido acético 10% v/v durante 1 h, y se destiñó en H₂O caliente durante 30 min.

3.8.4 Transferencia e inmunodetección de proteínas en membranas de nitrocelulosa

Las proteínas separadas electroforéticamente en geles de poli(acrilamida) fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Hybond-C, Amersham) usando un Mini Trans-

Blotcell (BioRad) a una intensidad constante de 100 mA durante 60 min en buffer de transferencia (Tris-HCl 2,4 g/L, glicina 11,2 g/L, metanol 20% v/v, SDS 0,3 g/L) a 4°C.

Para realizar la inmunodetección, la membrana fue bloqueada con una solución de PBS 1X (NaCl 100mM, Na₂HPO₄ 80mM, NaH₂PO₄ 20mM) y 5% p/v de leche en polvo descremada comercial durante 1 h a toda la noche. Luego se incubó la membrana durante 1 h con el antisuero correspondiente diluido en solución PBS-leche. Luego se realizaron 3 lavados con solución PBS-leche y se incubó la membrana durante 1 h con anticuerpos anti-IgG de conejo (Sigma) diluidos 1/3000 en solución PBS-leche. Luego se repitieron los 3 lavados con solución PBS-leche y se lavó durante 15 min con buffer fosfatasa (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM). Posteriormente se reveló mediante incubación en oscuridad hasta el desarrollo de color en una solución de buffer fosfatasa con el agregado de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato 0,0075% p/v y azul de nitrotetrazolio (NBT) 0,02% p/v.

3.9 Obtención de anticuerpos policlonales

En esta sección se describe la generación en conejo de anticuerpos policlonales contra la proteína codificada por el gen *At1g07050*.

3.9.1 Construcción del vector de expresión

El plásmido que contenía el ADNc del gen *At1g07050* fue cortado con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI, utilizando uno de los sitios de restricción presentes en el vector. Este fragmento fue luego purificado y ligado en el vector pET28a utilizando los mismos sitios. El vector generado se almacenó en células de *E. coli* TOP 10, y se utilizó para transformar células de *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus-RIL para la expresión de la proteína codificada por el gen *At1g07050*.

3.9.2 Expresión y purificación de la proteína codificada por el gen *At1g07050*

A partir de un cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus-RIL crecido durante la noche a 37°C bajo agitación en medio LB con cloranfenicol 30 µg/mL y kanamicina 50 µg/mL se realizó un inóculo de 500 µL en 50 mL de medio LB con cloranfenicol 30 µg/mL y kanamicina 50 µg/mL, se creció a 37°C bajo agitación hasta una DO_{600nm} = 0,6, se agregó isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) en concentración final de 0,5 mM y se creció durante la noche a 18°C con agitación. Luego se centrifugó el cultivo 10 min a 7.000 g y se resuspendió el pellet en 5 mL de buffer de lisis [Tris HCl 50 mM pH 8; NaCl 300 mM; SDS 1% v/v; DTT 1 mM]. Luego se procedió a la ruptura de las células mediante ultrasonido (amplitud 25%, 8 ciclos de 5 s de pulso y 1 min entre pulsos) en el equipo Vibra Cell (Sonics & Materials, Inc.).

Luego se incubó 30 min en hielo para precipitar el SDS libre (la concentración residual de SDS fue compatible con la unión a Ni/NTA de alta afinidad) (Schlager y col., 2012).

Se centrifugó 40 min a máxima velocidad a 4°C (eliminándose el SDS como precipitado) y se obtuvieron 3 fracciones: Extracto Total (Total), Sobrenadante (proteínas solubles) y Pellet (proteínas de membrana y cuerpos de inclusión), que se corrieron en un gel desnaturizante de poliacrilamida como se indica en la sección 3.8.3.

La proteína de interés fue purificada mediante cromatografía de afinidad en una columna de Ni/NTA agarosa (Qiagen, Germantown, USA), se resuspendió en buffer de siembra 1X [Tris-HCl 50 mM pH 6,8, DTT 100 mM, β -mercaptoetanol 1% v/v, SDS 2% p/v, azul de bromofenol 0,1% p/v, glicerol 4% v/v], se hirvió durante 5 min y se sembró en un SDS-PAGE (sección 3.8.3). Luego de la electroforesis el gel se tiñó (sección 3.8.3) y se cortó la banda correspondiente a la proteína de interés, se congeló en N₂ líquido y se mortereó, el polvo obtenido se resuspendió en 500 μ L de solución PBS estéril y 750 μ L de adyuvante incompleto de Freund (Sigma).

3.9.3 Protocolo de inmunización

Los anticuerpos policlonales se obtuvieron por inmunización de un conejo (a cargo del servicio de bioterio de la FCByF UNR). El día 1 se inoculó con 200 μ g de proteína disuelta en buffer PBS, los días 21 y 51 se inoculó con 200 μ g de proteína disuelta en adyuvante incompleto de Freund. Diez días después de la última inoculación se extrajo sangre del conejo, se incubó a 37°C durante 2 h y se centrifugó 15 min a 4.000 *g* en una centrifuga Rolco CM2070 para recuperar el antisuero.

3.9.4 Evaluación de los anticuerpos obtenidos

Para evaluar la sensibilidad y especificidad de los anticuerpos obtenidos se probaron distintas diluciones del antisuero y diferentes concentraciones de proteína recombinante FITNESS en cada una de las extracciones de sangre empleando la técnica de Western blot (sección 3.8.4).

3.10 Determinación de actividades enzimáticas

3.10.1 Catalasa (CAT)

La obtención del extracto vegetal se realizó como se describe en la sección 3.8.1. La actividad CAT se determinó siguiendo espectrofotométricamente el consumo de H₂O₂ a 25°C a 240 nm ($\epsilon = 34 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). El medio de reacción contenía K₃PO₄ 25 mM pH 7 y H₂O₂ 25 mM variando la cantidad de extracto entre 20–200 μ L. La reacción se inició con el agregado de

H₂O₂. La actividad específica se expresó como μmol de H₂O₂ consumidos por min por mg de proteínas totales.

3.10.2 Glutación reductasa (GR)

La obtención del extracto vegetal se realizó como se describe en la sección 3.10.1. Se determinó la actividad GR espectrofotométricamente a 25°C siguiendo la oxidación de NADPH a 340 nm ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). El medio de reacción contenía K₃PO₄ 100 mM pH 7,8; EDTA 2 mM; NADPH 100 μM ; GSSG 1 mM, variando la cantidad de extracto entre 20–200 μL . La reacción se inició con el agregado de GSSG. La actividad específica se expresó como μmol de NADPH oxidado por min por mg de proteínas totales.

3.10.3 Superóxido dismutasa (SOD)

El extracto se preparó con aproximadamente 50 mg de polvo vegetal en 150 μl de buffer de extracción (K₃PO₄ 50 mM pH 7,5; EDTA 1 mM; NaCl 50 mM; ácido ascórbico 1 mM; PMSF 1 mM). El volumen de buffer se ajustó según la masa pesada de polvo vegetal. Luego se sembró igual volumen de extracto.

La actividad de SOD se determinó en geles de poliacrilamida cuya concentración final fue de 12 % p/v para el gel de separación y de 5% p/v para el gel de concentración y en condiciones nativas. Antes de sembrar las muestras en el gel, se realizó una pre-corrída de 30 min con buffer Davis (Tris 3,02 g/L; glicina 14,4 g/L; ácido ascórbico 2 mM) a 15 mA y 4°C.

Una vez que el frente de corrída salió del gel, se continuó la electroforesis durante 30 min más. Luego de la separación electroforética de las proteínas, el gel se lavó durante 15 min con una solución Tris-HCl 25 mM pH 8 y luego se incubó en oscuridad durante 30 min con una solución Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM, NBT 180 μM y riboflavina 120 μM . Los geles fueron revelados por exposición a la luz emitida por dos tubos fluorescentes de 15 W (Beauchamp y Fridovich, 1971).

3.10.4 Ascorbato peroxidasa (APX)

La obtención del extracto vegetal se realizó como se describe en la sección 3.10.1. La actividad APX fue determinada espectrofotométricamente (UV-2450, Shimadzu) a 25°C siguiendo la oxidación del ASC a DHA ($\epsilon_{290} = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), en el siguiente medio: K₃PO₄ 50 mM pH 7; EDTA 1 mM, H₂O₂ 0,1 mM, ASC 0,5 mM, variando la cantidad de extracto entre 80–160 μL . La reacción se inició con el agregado de H₂O₂. La actividad específica fue expresada como μmol de ASC oxidado por minuto por mg de proteína (Sen Gupta y col, 1993).

3.11 Determinación de parámetros fotosintéticos

Las mediciones se realizaron sobre plantas adultas mantenidas previamente durante 30 min en oscuridad utilizando un fluorómetro de pulso modulado (Qubit Systems Inc., Kingston, Ontario) conectado a una computadora portátil usando un programa para la adquisición de datos (Logger Pro), registrándose F_0 (Fluorescencia mínima en hojas adaptadas a la oscuridad), F' (Fluorescencia mínima en hojas adaptadas a la luz actínica), F_m (Fluorescencia máxima en hojas adaptadas a la oscuridad), F'_m (Fluorescencia máxima en hojas adaptadas a la luz actínica). Esto se realizó con pulsos cortos de luz blanca saturante ($3.000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e iluminación con luz actínica de aproximadamente 100, 300, 500 y $700 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Con estos datos se calcularon: 1) la eficiencia operativa del fotosistema II (ϕPSII), que es una medida de la eficiencia con que la energía lumínica absorbida es transmitida a través de la cadena transportadora de electrones fotosintética y está directamente relacionada con la tasa de asimilación de CO_2 en la hoja; 2) la eficiencia cuántica potencial del fotosistema II (F_v/F_m), la cual evidencia procesos de estrés que alteran la eficiencia en la transferencia de electrones a través de la cadena transportadora de electrones fotosintética y disminuciones en este valor se asocian con daño foto-oxidativo del PSII; 3) la eficiencia cuántica efectiva del PSII (F'_v/F'_m), la cual provee una estimación de la eficiencia máxima fotoquímica del PSII a una intensidad de luz dada, indicando la eficiencia operativa del PSII si todos los centros del PSII estuviesen abiertos; 4) el factor de eficiencia del fotosistema II (qP), el cual está relacionado de manera no lineal con la proporción de centros del PSII abiertos; y 5) la extinción no fotoquímica de la fluorescencia (NPQ), que está relacionada con la disipación térmica de la energía absorbida (Baker y Rosenqvist, 2004).

Las ecuaciones utilizadas para el cálculo de los parámetros fotosintéticos se detallan a continuación:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$$

$$\phi\text{PSII} = (F'_m - F')/F'_m$$

$$F'_v/F'_m = (F'_m - F'_0)/F'_m$$

$$qP = (F'_m - F')/(F'_m - F'_0)$$

$$\text{NPQ} = (F_m - F'_m)/F'_m$$

3.12 Determinación de pigmentos fotosintéticos

Se pesaron 20 mg de polvo vegetal y se extrajeron con 250 μl etanol (Merck) 80% v/v en buffer MES 10 mM pH 5.9. Se agitó con vortex y se calentó a 80°C durante 30 min. Luego se centrifugó 10 min a 4.500 g para separar las fases, la fase acuosa (S1) se trasvasó a un tubo

nuevo y se colocó en hielo. El precipitado se extrajo nuevamente con 150 μl etanol 80% v/v en buffer MES 10 mM pH 5.9. Se agitó con vortex y se calentó a 80°C durante 30 min. Luego se centrifugó 10 min a 4.500 g para separar las fases, la fase acuosa (S2) se juntó con la fase S1 y se colocó en hielo. El precipitado se extrajo nuevamente con 250 μl etanol 50% v/v en buffer MES 10 mM pH 5.9. Se agitó con vortex y se calentó a 80°C durante 30 min. Luego se centrifugó 10 min a 4.500 g para separar las fases, la fase acuosa (S3) se juntó con S1 y S2. Se homogeneizó y se determinaron los niveles de clorofila (chl) a y chl b en microplaca. En cada pocillo se colocaron 50 μl de extracto etanólico y 120 μl etanol 98% v/v, se mezcló y se midió absorbancia en un lector de microplacas (Biotek) a 645 y 665 nm. Las fórmulas empleadas para el cálculo fueron: $\text{Chl } a \text{ } (\mu\text{g/pocillo}) = 5.48 * A_{665} - 2.16 * A_{645}$ y $\text{Chl } b \text{ } (\mu\text{g/pocillo}) = 9.67 * A_{645} - 3.04 * A_{665}$. Finalmente los resultados se expresaron como μg de chl/mg de peso fresco.

Además, se utilizó otro método para la determinación de pigmentos, que permitió cuantificar, no sólo los niveles de chl a y b, sino también los niveles de carotenoides (x+c). Para ello se cortaron discos de hojas de plantas adultas y se introdujeron en tubos eppendorf que contenían 300 μL de etanol 96% v/v. Se incubó durante la noche en oscuridad a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 470 nm, 648 nm, y 664 nm de las soluciones de etanol en un espectrofotómetro V-630 Spectrophotometer (Jasco) y se calcularon los contenidos de clorofilas a, b y de carotenoides utilizando las siguientes fórmulas (Lichtenthaler, 1987) y luego se expresaron los resultados como mg/cm^2 .

$$\text{Chl } a = 13,36 * A_{664} - 5,19 * A_{648}$$

$$\text{Chl } b = 27,43 * A_{648} - 8,12 * A_{664}$$

$$\text{Chl } (a+b) = 5,24 * A_{664} + 22,24 * A_{648}$$

$$x+c = (1000 * A_{470} - 2,13 * \text{chl } a - 97,64 * \text{chl } b) / 209$$

3.13 Determinación de metabolitos

3.13.1 Métodos espectrofotométricos

Para la determinación del osmolito protector Pro se utilizó parte del extracto etanólico que se extrajo según sección 3.12. El método se basa en que a pH bajo la ninhidrina reacciona específicamente con Pro, generando un producto color rosado. Se colocaron en un tubo 100 μl de extracto etanólico y 100 μl de reactivo ninhidrina 1% p/v (preparado en ácido acético 60% v/v). Se calentó a 95°C durante 20 min, se enfrió y se centrifugó 1 min a 15.000 g . Se dispensaron 150 μl en la microplaca y se midió absorbancia a 520 nm en un lector de

microplacas (Biotek). La medida de absorbancia se realizó inmediatamente ya que el producto de reacción es inestable y necesita ser protegido de la luz (Bates y col., 1973).

Los niveles de glioxilato se determinaron empleando un método modificado del protocolo descrito por Häusler y col. (1996). Alícuotas de 30 mg de polvo vegetal fueron homogeneizadas con 500 μ L de HCl 100 mM y fenilhidrazina 0.1% v/v y fueron incubadas 5 min a 80°C. Luego de enfriar las muestras en hielo, se centrifugaron 2 min a 10.000 g y 200 μ L del sobrenadante fueron mezclados con 750 μ L de HCl 18.5% v/v y 50 μ L de $K_3Fe(CN)_6$ 4% (p/v). La mezcla fue centrifugada 2 min a 10.000 g , y finalmente se midió la absorbancia del sobrenadante a 520 nm a los 8 min exactos del agregado de $K_3Fe(CN)_6$. En las muestras control se omitió el agregado de $K_3Fe(CN)_6$.

3.13.2 Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

Para determinar los perfiles metabólicos se utilizó cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Para ello, se extrajeron 100 mg de polvo vegetal con 300 μ L de metanol (Merck), se homogeneizó con vortex y se dejó en hielo hasta procesar todas las muestras. Se agregaron 30 μ L de Ribitol 0,2 mg/ml (estándar interno). Se incubó a 70°C durante 15 min con agitación. Luego se agregaron 200 μ L de cloroformo (Merck), se homogeneizó con vortex y se agregaron 400 μ L de H_2O . Luego de homogeneizar con vortex se centrifugó 15 min a máxima velocidad a 4°C. La fase superior se alicuotó en dos tubos con 100 μ L cada uno que se secaron durante 3 h en SpeedVac Concentrator SVC100H Savant. Luego se guardaron a -80°C hasta la corrida en el equipo.

Esta metodología requiere derivatizar las muestras extraídas antes de la corrida. Para esto se agregó 40 μ L de metoxiamina 20 mg/ml (Sigma) disuelta en piridina y se incubó 2 h a 37°C, agitando cada 5 min. Finalmente se agregó 70 μ L de N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (Sigma) y se incubó 30 min a 37°C, agitando cada 5 min. Se centrifugó 1 min a 15.000 g y las muestras derivatizadas se transfirieron a microviales y fueron inyectadas en un GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu) utilizando los parámetros de corrida como en Zanor y col. (2009). Luego de la corrida los metabolitos se identificaron empleando el software MASSLAB (ThermoQuest, Manchester, UK). La concentración de cada metabolito se determinó como cantidades relativas al nivel presente en el control.

Para la cuantificación de los niveles de AS, se determinó su concentración absoluta por comparación con una curva de calibración construida con soluciones estándares de distintas concentraciones, incluyendo el estándar interno ribitol (Schauer y col., 2005).

3.14 Evaluación fenotípica ante la aplicación de diferentes condiciones de estrés abiótico

3.14.1 Estrés salino en tierra

Para el tratamiento de estrés salino en plantas adultas, se crecieron plantas de las líneas en estudio y la línea control *wild type* (WT) en tierra proveniente del mismo lote y a los 20 días se las dividió en 4 grupos de 4 plantas por línea (12 plantas por grupo). A un grupo se lo comenzó a regar con una solución de NaCl 250 mM, a otro grupo con una solución de NaCl 500 mM, al grupo control de osmolaridad se lo regó con una solución de Manitol 250mM y al grupo de plantas control se las regó con agua. El riego se realizó 3 veces por semana con 5 ml por planta durante 2 semanas y se monitoreó el estado de las plantas durante y luego del tratamiento.

3.14.2 Estrés salino en medio líquido

Se crecieron plantas de las líneas en estudio y la línea control WT en medio MS 0,5X agar 0,8% p/v hasta la edad de 10 días. Alcanzada la edad deseada se las transplantó al final del día a placas de 6 pocillos con medio líquido. Las condiciones estudiadas fueron: MS 0,5X (control), MS 0,5X NaCl 200 mM, MS 0,5X Manitol 400 mM (control de osmolaridad). Se incubaron en estas condiciones durante 4 días en condiciones normales de luz y temperatura.

3.14.3 Estrés oxidativo

Para evaluar estrés oxidativo se realizó un tratamiento con el herbicida MV, el cual es propagador de anión superóxido en cloroplastos. Se crecieron plantas en tierra durante 19 días y se las roció con soluciones de MV de concentraciones 0-10-50-100 μ M y luego se evaluó la sobrevivencia de las plantas.

3.15 Detección de H₂O₂ intracelular por tinción con DAB

Para la detección de H₂O₂ se cortaron 2 hojas de la roseta de plantas adultas crecidas en tierra, se sumergieron en una solución de 3,3-diaminobencidina (DAB, Sigma) 1 mg/mL pH 3,8, se infiltraron por vacío en 3 ciclos de 10 s y se incubaron toda la noche en oscuridad. Al día siguiente se retiró la solución de DAB y se agregó etanol 96% v/v para extraer la clorofila. Cuando la clorofila fue totalmente extraída se fotografió el tejido (Thordal-Christensen y col., 1997). El H₂O₂ se evidencia como un precipitado marrón ya que el DAB es capaz de reaccionar con el H₂O₂ presente en la hoja quedando en estado oxidado y una vez oxidado forma unos radicales libres que reaccionan entre sí para formar polímeros insolubles de color marrón oscuro.

3.16 Detección de $O_2^{\cdot -}$ intracelular por tinción con NBT

Con el objeto de realizar un análisis cualitativo de los niveles de $O_2^{\cdot -}$ se realizó una tinción con NBT. Se cortaron 2 hojas de la roseta de plantas adultas crecidas en tierra, se sumergieron en una solución de 0,1 mg/ml de NBT en buffer HEPES 25 mM pH 7,6, se infiltraron por vacío en 3 ciclos de 10 s y se incubaron 2 h en oscuridad. Posteriormente se retiró la solución de NBT y se agregó etanol 96% v/v para extraer la clorofila. La presencia de $O_2^{\cdot -}$ que se manifiesta por el color azul oscuro de los cristales de formazan en el lugar de reacción (Maly y col., 1989).

3.17 Análisis histoquímico de la actividad GUS

La actividad GUS se localizó en Arabidopsis mediante tinción de los tejidos con ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-glucurónico 0,5 mg/mL (X-Gluc; Gold Biotechnology, St Louis, MO, USA) en buffer X-Gluc (Na_2HPO_4 50 mM pH 7,2; EDTA 10 mM; $K_3Fe(CN)_6$ 0,33 mg/mL; Tween 20 0,001% v/v). Los tejidos fueron infiltrados por vacío en 3 ciclos de 10 s y se incubó la reacción a 37°C durante toda la noche, al otro día la clorofila fue removida por lavados con etanol. Las fotografías se tomaron con un microscopio binocular Leica MZ16F.

3.18 Microscopía Confocal de Fluorescencia

La observación de las proteínas de fusión a la proteína GFP se realizó en plántulas de 10 días mediante microscopio confocal de barrido Eclipse TE - 2000 - E2 (Nikon). A fin de mejorar la visualización, se realizó una tinción de las paredes celulares con Ioduro de Propidio (PI). Este colorante se intercala en las paredes de las células vegetales y se observa como fluorescencia roja [λ_{exc} : 535 nm y una λ_{em} : 617 nm]. Para ello, se incubaron las plántulas durante 2 min en una dilución 1/100 de una solución de PI 1 mg/ml.

Debido a que las dos proteínas evaluadas son de expresión nuclear, se llevó a cabo una tinción con el colorante Hoechst, que tiñe específicamente núcleos celulares, a fin de determinar si los mismos colocalizan con la señal detectada para GFP. Este colorante se intercala en el ADN de las células vegetales y se observa como fluorescencia azul [λ_{exc} : 350 nm y una λ_{em} : 461 nm]. Plántulas de 10 días se incubaron durante 20 min en una dilución 1/1000 en buffer PBS y tween 0,1% de una solución de Hoechst 20 mM.

Con el objetivo de realizar un examen cualitativo de la formación de ERO, se empleó la sonda diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (H_2DCFDA , Sigma-Aldrich) que permite detectar por fluorescencia H_2O_2 . Discos de hojas de las distintas líneas en estudio, fueron incubados con una solución de 10 μ M H_2DCFDA en HEPES 10 mM pH 7,3. Las muestras fueron montadas sobre un portaobjeto de vidrio y examinadas en un microscopio confocal de barrido Eclipse TE

- 2000 - E2 (Nikon) usando una λ_{em} : 522 nm. Las imágenes fueron analizadas con el programa EZ-CI Free Viewer (Nikon).

3.19 Determinación del área de células epidérmicas

Se tomaron moldes negativos de la epidermis de la cara abaxial de la hoja con el material de impresión para dientes Polisilaxona (Zhermack) el cual se utiliza junto a su catalizador en partes iguales. Los mismos se mezclaron en una superficie de preparado y con la ayuda de un palillo se untó en la hoja, se dejó secar y se despegó con cuidado. Una vez que se obtuvieron estos moldes negativos se hicieron replicas positivas con esmalte de uña y se colocaron en portaobjetos para observar en microscopio.

Las áreas de las células epidérmicas fueron medidas mediante el software de análisis de imagen Image-Pro Plus versión 6.0.

3.20 Análisis Filogenéticos

Para la construcción de los árboles filogenéticos de las proteínas TX, ERF grupo X y CMF de Arabidopsis se alinearon las secuencias de las proteínas correspondientes en cada caso utilizando ClustalW y los análisis filogenéticos se realizaron empleando ClustalX2.1 (Larkin y col., 2007). El árbol filogenético fue inferido usando el método de *neighbor-joining*. Se determinaron filogenias sin raíz usando el método de matriz de distancias, con topología de árbol apoyada por un *bootstrapping* de 1.000 réplicas. Luego se empleó TreeView 1.6.6 para la visualización del árbol (la escala significa 0.1 sustituciones nucleotídicas/sitio) (Page y col., 1996).

Las secuencias aminoacídicas que se alinearon para la construcción del árbol de las proteínas AtTX fueron las codificadas por los siguientes genes: *At1g47370 (AtTX1)*; *At1g51280 (AtTX2)*; *At1g52900 (AtTX3)*; *At1g57670 (AtTX5)*; *At1g57830 (AtTX6)*; *At1g57850 (AtTX7)*; *At1g60320 (AtTX8)*; *At1g61105 (AtTX9)*; *At1g65390 (AtTX10)*; *At2g03030 (AtTX11)*; *At2g03300 (AtTX12)*; *At2g20145 (AtTX13)*; *At2g32140 (AtTX14)*; *At4g11340 (AtTX15)*; *At4g19920 (AtTX17)*; *At4g23510 (AtTX20)*; *At5g44900 (AtTX23)*; *At5g44910 (AtTX24)*; *At5g44920 (AtTX25)*; *At5g45000 (AtTX26)*; *At5g45070 (AtTX27)*; *At5g45080 (AtTX28)*; *At5g45090 (AtTX29)*; *At5g45220 (AtTX30)*. Las secuencias de las proteínas codificadas por los genes *At1g56470 (AtTX4)*; *At4g11345 (AtTX16)*; *At4g19923 (AtTX18)*; *At4g19926 (AtTX19)*; *At4g23515 (AtTX21)*; *At4g23516 (AtTX22)* no fueron incluidas en el alineamiento por no encontrarse en las bases de datos de TAIR y NCBI.

Las secuencias aminoacídicas que se alinearon para la construcción del árbol AtERF grupo X fueron: *AtERF108 (RAPD2.6; At1g43160)*, *AtERF109 (RRTF1; At4g34410)*, *AtERF110*

(At5g50080), AtERF111 (At5g64750), AtERF112 (At2g33710), AtERF113 (At5g13330), AtERF114 (At5g61890), AtERF115 (At5g07310).

Las secuencias aminoacídicas que se alinearon para la construcción del árbol AtCMF fueron las codificadas por los siguientes genes: At1g04500 (AtCMF1) , At1g05290 (AtCMF2), At1g07050 (AtCMF3), At1g63820 (AtCMF4), At2g32310 (AtCMF5), At2g33350 (AtCMF6), At2g46670 (AtCMF7), At3g12890 (AtCMF8), At4g25990 (AtCMF9), At4g27900 (AtCMF10), At5g14370 (AtCMF11), At5g41380 (AtCMF12), At5g53420 (AtCMF13), At1g57180 (AtCMF14) y At5g59990 (AtCMF15).

3.21 Análisis bioinformáticos

En esta sección se describen las herramientas bioinformáticas utilizadas.

Para la búsqueda de secuencias se utilizaron los sitios: Arabidopsis Information Resource (TAIR, <https://www.arabidopsis.org/>) y National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Los análisis de expresión de ARNm de *Arabidopsis thaliana*, bajo diferentes condiciones de estrés, en diferentes estadios de crecimiento y en diferentes tejidos se realizaron utilizando el programa Genevestigator (<https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp>) (Zimmermann y col., 2005; Hruz y col., 2008) y el Arabidopsis eFP Browser 2.0 (http://bar.utoronto.ca/efp2/Arabidopsis/Arabidopsis_eFPBrowser2.html).

Para la búsqueda de elementos regulatorios dentro de las regiones promotoras se utilizó el programa PLACE -- Plant cis-acting regulatory DNA elements (Higo y col., 1999).

Para la predicción de la localización subcelular de las proteínas en estudio se utilizó Wolf Sort (<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>).

Para diseñar los cebadores utilizados para la construcción de líneas con expresión disminuida se utilizó el portal <http://wmd3.weigelworld.org>.

Resultados y Discusión

Capítulo I:
Análisis funcional de la proteína
AtTX24

4. CAPITULO I: ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA ATX24

4.1 Introducción

La inmunidad innata es el mecanismo de defensa primario de las plantas que las protege contra una variedad de estreses bióticos (Eitas y Dangl, 2010). El sistema inmune basal de la planta depende de la inmunidad innata de cada célula y de señales sistémicas que se originan en los sitios de infección. El sistema inmune incluye dos tipos de sistemas, uno que usa receptores de patrones de reconocimiento transmembrana llamados PRRs y responden a patrones moleculares asociados a microbios o patógenos (MAMPS o PAMPS) tales como la flagelina y el segundo, que actúa dentro de la célula y utiliza a las proteínas polimórficas NB-LRR codificadas por los genes *R* (Jones y Dangl, 2006). Las proteínas *R* presentan un dominio NB y un dominio LRR (Soosaar y col., 2005) y muestran diversidad estructural en su extremo N-terminal, donde pueden incluir un dominio *coiled-coil* (CC) o un dominio TIR. El dominio TIR está involucrado en la activación de mecanismos de defensa (Jebanathirajah y col., 2002) y podría contribuir a la especificidad del reconocimiento de patógenos (Luck y col., 2000). El dominio TIR es un dominio proteico de 200 AA aproximadamente presente en proteínas multidominio e incluye tres regiones altamente conservadas (TIR1, TIR2 y TIR3) identificadas por Meyers y col. (2002). Posteriormente se identificó una cuarta región menos conservada, denominada TIR4 que contiene triptófanos ubicados en posiciones similares a los triptófanos altamente conservados del motivo TIR3.

El genoma de *Arabidopsis* codifica para 94 proteínas TIR-NB-LRR (TNL) (Meyers y col., 2003). Muchas proteínas TNL son solubles y se ha reportado localización nuclear para al menos 3 presentes en distintos organismos: RRS1-R de *Arabidopsis* (Deslandes y col., 2003), MLA10 de *Hordeum vulgare* (cebada), y N de *Nicotiana* (Burch-Smith y col., 2007a). Otras, tales como RPP1A de *Arabidopsis*, se asocian a membranas (Weaver y col., 2006). *Oryza sativa* (arroz) no posee proteínas TNL, en cambio presenta más de 400 proteínas CC-NB-LRR (Zhou y col., 2004).

En plantas se identificaron dos familias de proteínas adicionales que contienen dominio TIR, TIR-NB (TN) y TIR-*unkown/random* (TX), que son diferentes de sus proteínas *R* homólogas más extensas TNL (Meyers y col., 2002). Las proteínas TN contienen dominios TIR y NB pero carecen del dominio LRR, mientras que las proteínas TX carecen tanto del dominio NB como del LRR, pero poseen un dominio pequeño y variable en el extremo C-terminal (Meyers y col., 2002). En *Arabidopsis* existen 21 genes que codifican para proteínas TN y 30 genes que codifican para proteínas TX (27 genes y 3 pseudogenes, Meyers y col., 2003). Dentro de los genes TN de *Arabidopsis*, está el gen *Resistant to P. Syringae 4* (*RPS4*, *At5g45250*), para el cual

se ha demostrado que cuando se trunca, se activa el proceso de muerte celular en ausencia de efectores patógenos (Burch-Smith y col., 2007b).

El dominio X de las proteínas TX puede tener hasta 232 AA, comprende más de 13 tipos de secuencias no relacionadas y aún no está claro el significado de esta diversidad. La expresión, prevalencia y diversidad de los genes TX sugiere que los mismos codifican para proteínas funcionales y que no provendrían de la delección de genes que codifican para proteínas R (Meyers y col., 2002). Respecto a la caracterización funcional de los miembros de la familia TX, sólo tres poseen una función reportada en Arabidopsis: *AtTX21*, *AtTX14* y *AtTX12*. La sobreexpresión de *At4g23515* (*AtTX21*) en Arabidopsis provoca una disminución de los síntomas de enfermedad, con menores títulos bacterianos en relación a la línea control WT, cuando se lo infecta con el patógeno virulento de plantas *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 (Nandety y col., 2013). Por otro lado, Kato y col. (2014) caracterizaron funcionalmente la proteína *AtTX14* (*At2g32140*). Las plantas que sobreexpresan este gen desarrollan un fenotipo de enanismo y muestran una expresión aumentada de sus genes de defensa. Este fenotipo de enanismo es dependiente de *enhanced disease susceptibility 1* (*EDS1*) y *phytoalexin deficient 4* (*PAD4*), y parcialmente dependiente de *salicylic acid induction deficient 2* ó *SID2*. En general, el fenotipo de crecimiento defectuoso ocasionado por la activación de respuestas de defensa es suprimido bajo condiciones de alta temperatura. Sin embargo, las plantas transgénicas que sobreexpresan *AtTX14* desarrollan un fenotipo de enanismo mucho mas fuerte a 28°C que a 22°C aunque, los genes relacionados a defensa se activan a ambas temperaturas. El fenotipo de enanismo se suprime cuando se sobreexpresa *AtTX14* en líneas mutantes en las vías de señalización mediado por AS. Estos hallazgos sugieren que *AtTX14* codifica para una proteína que produce la activación constitutiva del sistema de defensa relacionado a AS, que genera el fenotipo de enanismo de las plantas analizadas. Recientemente, Song (2016) reportó que la sobreexpresión de *AtTX12* induce defectos de crecimiento y la expresión de genes relacionados a defensa en forma parcialmente independiente de *EDS1* en Arabidopsis. Por otro lado, Nandety y col. (2013) generaron líneas sobreexpresantes para 10 genes de la familia TX: *AtTX9*, *AtTX6*, *AtTX7*, *AtTX8*, *AtTX10*, *AtTX14*, *AtTX16*, *AtTX26*, *AtTX21* y *AtTX24*. Las líneas generadas se monitorizaron fenotípicamente a lo largo de su desarrollo y se analizó también su respuesta a diversos patógenos de plantas. No se detectaron diferencias fenotípicas respecto a las plantas control para ninguna de las líneas generadas, excepto para las líneas sobreexpresantes del gen *AtTX21*, donde se observó el fenotipo ya mencionado de tolerancia al patógeno *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000.

Según los datos reportados hasta el momento, las proteínas TX participarían en las respuestas de defensa basal.

4.2 AtTX24 posee un dominio TIR y un dominio X

El gen *At5g44910* codifica para una proteína de 241 AA (MM 27.51 kDa) y pI 6.14 clasificada por Meyers y col. (2002) como AtTX24 la cual pertenece a la familia de proteínas TX, ya que presenta un dominio TIR y un dominio X. Los AA más abundantes presentes en la secuencia proteica son valina y leucina (10% cada uno), aunque también tiene varios residuos de serina (7,1%), treonina (3,7%) y tirosina (3,3%) distribuidos a lo largo de toda la proteína. El dominio TIR presente en el extremo N-terminal de AtTX24 es de 139 AA y está localizado entre los residuos 9 y 148 y contiene los tres dominios altamente conservados, TIR1, 2 y 3 como así también el cuarto dominio, TIR4 (Figura 4.1 A). Hacia el extremo C-terminal posee un dominio X y dos regiones putativas transmembrana entre los residuos 187 y 207 (Figura 4.1 B). Por lo tanto, la proteína AtTX24 podría estar asociada a membranas.

En *Arabidopsis* los homólogos más cercanos son las proteínas AtTX13, AtTX3 y AtTX9 (Figura 4.1 C) todas de función aún desconocida. El homólogo más cercano de función conocida es una proteína TNL, llamada RPS4, con un 39% de AA idénticos. RPS4 forma un complejo receptor con la proteína RRS1-R, proteína NL con un dominio C-terminal WRKY de unión a ADN. Este complejo detecta los efectores bacterianos AvrRps4 y PopP2 activando la defensa. Ambas proteínas bacterianas interactúan con el dominio WRKY de RRS1, y PopP2 acetila lisinas para bloquear la unión al ADN (Sarris y col., 2015).

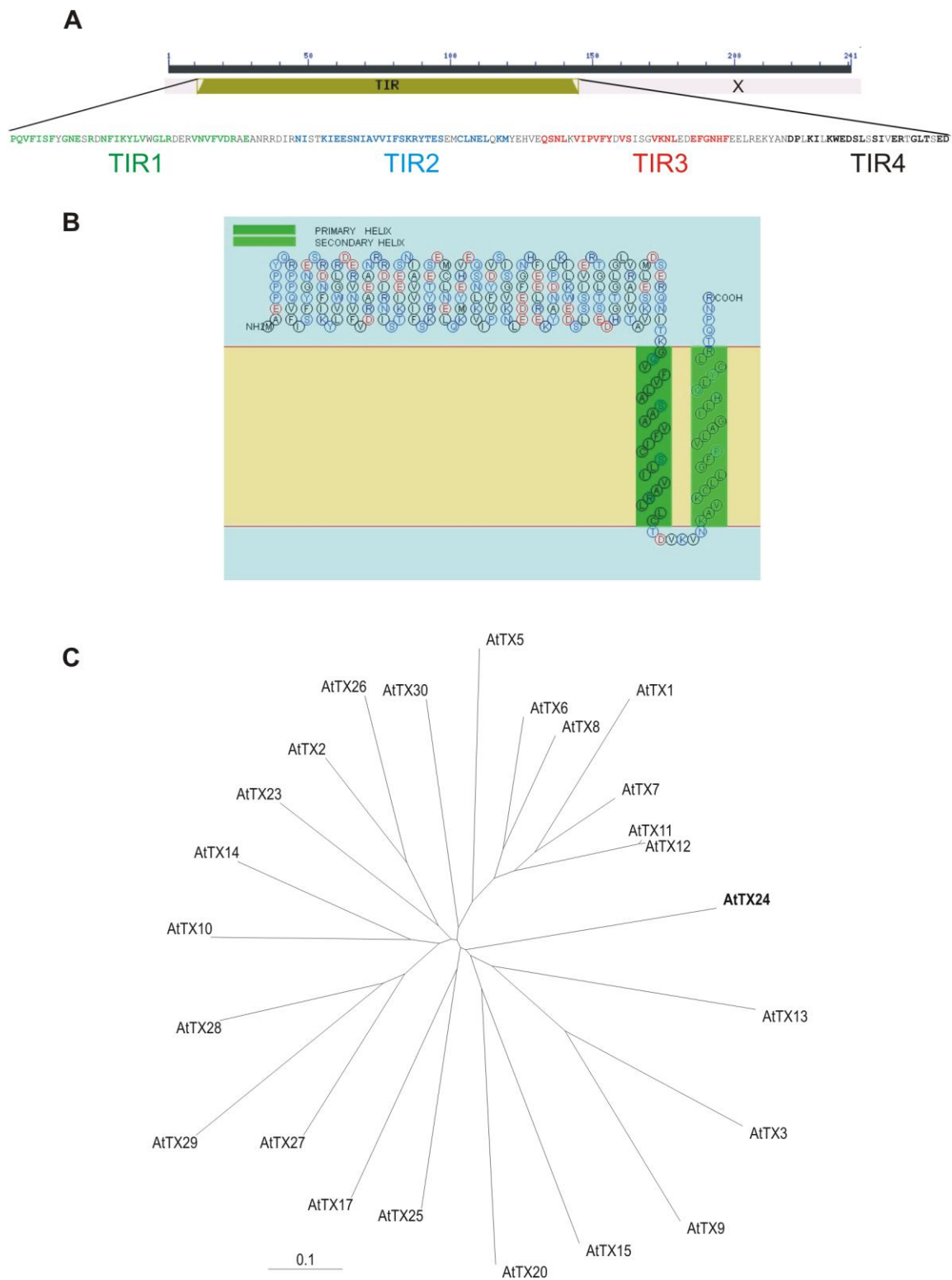


Figura 4.1: Análisis del gen *AtTX24*.

A: Vista esquemática de la proteína *AtTX24* que muestra la posición y los AA del dominio TIR. **B:** La proteína *AtTX24* posee un dominio de anclaje a membrana en el extremo C-terminal predicho por el software SOSUI (Hirokawa y col., 1998). **C:** Árbol filogenético de las proteínas TX de *Arabidopsis*, realizado según se describe en la sección 3.20 de Materiales y Métodos .

4.3. Análisis de la expresión de AtTX24 en Arabidopsis

En experimentos previos nuestro grupo observó que los niveles de expresión de AtTX24 aumentan ~3 veces en condiciones de estrés oxidativo generado por MV en cloroplastos (Scarpeci y col., 2008). Además, haciendo una búsqueda en los datos de expresión presentes en las bases públicas (*The Bio-Analytic Resource for Plant Biology* (BAR), <http://bar.utoronto.ca> y Genevestigator www.genevestigator.com) se observó que este gen se induce en condiciones de estrés salino. Debido a que no existen reportes en la literatura de la participación de este gen en procesos de estrés abiótico, se lo seleccionó para analizar el posible rol de la proteína que codifica en dichos procesos. Primeramente, se analizó la secuencia 5' corriente arriba del sitio de inicio de la traducción del gen AtTX24, de 915 pb de longitud, en busca de elementos regulatorios relacionados con estrés abiótico utilizando el software PLACE (Higo y col., 1999). En el análisis se incluyeron los motivos ABRE (ACGTG) relacionados a la respuesta a ABA, DRE (ACCGACCA), elemento relacionado a estrés por frío (TGGTTT), MYB (CAACCA), elemento relacionado a auxinas y AS (TGACG), elemento DOF (TAAAG) relacionado a variados procesos fisiológicos, como respuestas al estrés, a la luz y a fitohormonas. Como puede verse en la Tabla 4.1 se pudieron identificar los motivos DOF, WRKY (W-BOX), MYC y MYB entre los cuales los dos primeros son los que mayor número de motivos putativos presentan, lo que sugiere que este tipo de FT podría regular la expresión de AtTX24.

Elemento cis putativo	Cantidad de repeticiones	Secuencia 5'→3'
DOF	26	AAAG
W-BOX (NTERF3)	10	TGACY
WRKY (71OS)	10	TGAC
MYC	8	CANNTG
W-BOX (ATNPR1)	6	TTGAC
W-BOX (HVIS01)	4	TGACT
MYB (1AT)	3	WAACCA

Tabla 4.1: Elementos regulatorios putativos presentes en la región *promAtTX24*.

Los análisis *in silico* de la expresión del gen *AtTX24* indican que se expresa en estadios tempranos de la plántula en cotiledones y raíces, y posteriormente en hojas de la roseta (Figura 4.2 A). Para corroborar estos datos, se generaron líneas transgénicas de *Arabidopsis*, las cuales denominamos *promAtTX24::GUS*, que contienen la fusión transcripcional del gen marcador GUS bajo el control de un fragmento de 915 pb ubicado corriente arriba del marco abierto de lectura de *AtTX24* hasta antes del ATG inicial del gen adyacente.

Luego de obtener líneas transgénicas independientes, se seleccionaron y analizaron 8 líneas a lo largo del desarrollo y se observó expresión en raíces de plántulas, hidátodos y sistema vascular de la hoja (Figura 4.2 B y C). Los niveles de expresión en hojas completamente expandidas fueron bajos en la lámina pero altos en las regiones vasculares (Figura 4.2 C). No se evidenció tinción en hipocótilos, tallos, hojas caulinas, flores y silicuas (Figura 4.2, D y E).

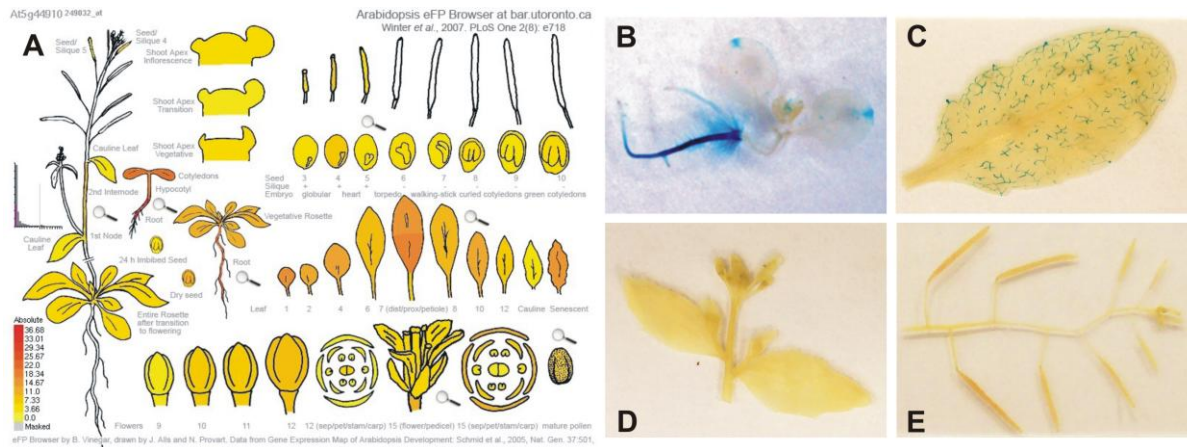


Figura 4.2: Patrón de expresión del gen *AtTX24::GUS*.

A: Niveles de expresión del gen *AtTX24* en los distintos órganos de la planta analizados *in silico* mediante la herramienta bioinformática BAR. Se observa que este gen se expresa en raíces, cotiledones y hojas de la roseta. **B-E:** Se observa el patrón de expresión del gen *AtTX24* en líneas de *Arabidopsis* transgénicas que contienen la fusión transcripcional del gen marcador *GUS* bajo el control de la región promotora de *AtTX24*. **B:** plántula de 5 días. **C:** hoja de roseta de planta de 5 semanas. **D:** hojas caulinas, flores y tallos de planta de 6 semanas. **E:** tallos y silicuas de planta de 6 semanas. Escalas= 1 mm (B); 2 mm (C, D y E).

4.4 Análisis de co-expresión de *AtTX24*

Los análisis de co-expresión permiten identificar genes que participan en las mismas vías regulatorias o metabólicas, o bien, que son co-regulados. Para realizar este análisis se utilizó la base de datos Genevestigator y se identificaron genes co-expresados positiva o

negativamente con *AtTX24* en diferentes condiciones, que incluyen perturbaciones ambientales respecto a la condición control de crecimiento.

En la Tabla 4.2 se observan los genes que se co-expresan positivamente con *AtTX24*, dentro de ellos se identificaron un gran número de proteinquinasas y genes relacionados con la defensa a patógenos de la planta, como por ejemplo MLO12, FRK1, WRKY17 y IOS1.

Coexpresión positiva		
Gen	Score	Descripción
<i>At5g39020</i>	0.61	Receptor proteinquinasa tipo malectina, que posee actividad serina/treonina quinasa
<i>At2g36690</i>	0.57	Proteína que pertenece a la superfamilia de 2-oxoglutarato (2OG) y oxigenasas Fe(II)-dependiente, que posee actividad oxidorreductasa
<i>At2g17740</i>	0.57	Proteína de la familia con dominios C1 ricos en Cisteína/Histidina
<i>At5g24230</i>	0.56	Proteína relacionada a lipasas de clase 3, que posee actividad lipasa de triglicéridos
<i>At2g39200</i>	0.54	MLO12 (<i>MILDEW RESISTANCE LOCUS O 12</i>) miembro de una gran familia de proteínas con siete dominios transmembrana específicas de plantas, homólogas a las codificadas en arroz en el locus <i>mildew resistance locus</i> o proteína (MLO). Arabidopsis contiene 15 genes que codifican para proteína MLO que se localizan en la membrana plasmática.
<i>At1g51850</i>	0.54	Proteína de la familia de proteinquinasas con repeticiones ricas en leucina
<i>At1g51790</i>	0.54	Proteína de la familia de proteinquinasas con repeticiones ricas en leucina
<i>At2g19190</i>	0.53	FRK1 (<i>FLG22-INDUCED RECEPTOR-LIKE KINASE 1</i>) Receptor tipo proteinquinasa, involucrado en la señalización de la defensa temprana.
<i>At3g55150</i>	0.53	Proteína de la familia génica EXO70, supuestas subunidades exocistos (transporte de vesículas)
<i>At1g18390</i>	0.53	Proteína de la superfamilia de las proteinquinasas
<i>At5g45480</i>	0.52	Proteína de función desconocida (DUF594)
<i>At1g51620</i>	0.52	Proteína de la superfamilia de las proteinquinasas
<i>At5g45510</i>	0.52	EXO70H1 (<i>EXOCYST SUBUNIT EXO70 FAMILY PROTEIN H1</i>) Proteína de la familia con repeticiones ricas en leucina (LRR)
<i>At5g48430</i>	0.52	Proteína de la familia de aspartil proteasas
<i>At1g26420</i>	0.51	Proteína de la familia Berberina de unión a FAD
<i>At2g24570</i>	0.51	WRKY17 (<i>WRKY DNA-BINDING PROTEIN 17</i>) pertenece a la familia de FT WRKY, es un regulador negativo de la resistencia basal a <i>Pseudomonas syringae</i>

At4g01750	0.5	RGXT2 (<i>RHAMNOGALACTURONAN XYLOSYLTRANSFERASE 2</i>) Codifica una proteína con actividad xilosiltransferasa dependiente de UDP-xilosa, que transfiere xilosa en L-fucosa y (menos eficientemente) L-arabinosa.
At3g02240	0.5	RGF7 (<i>ROOT MERISTEM GROWTH FACTOR 7</i>) Codifica para un factor de crecimiento del meristema de la raíz (GRF)
At1g51800	0.5	IOS1 (<i>IMPAIRED OOMYCETE SUSCEPTIBILITY 1</i>) Codifica para un miembro putativo de la familia de proteínas LRR-RLK.
At5g03700	0.49	Proteína lectina de unión a D-manosa
At1g61360	0.49	Proteína de la familia de lectinas proteinquinasas del locus S
At5g25440	0.49	Proteína de la superfamilia de las proteinquinasas
At1g49000	0.49	Proteína de función desconocida
At5g45440	0.49	Proteína de la superfamilia de hidrolasas nucleósidos trifosfato

Tabla 4.2: Genes que se co-expresan positivamente con AtTX24.

Esta tabla fue construida a partir de datos suministrados por el software GENEVESTIGATOR (@NEBION / ETH Zurich, 2008), con su herramienta para analizar la co-expresión positiva de genes durante diferentes perturbaciones ambientales. Los datos obtenidos corresponden a Octubre de 2016.

En la Tabla 4.3 se observan los genes que se co-expresan negativamente con AtTX24, donde se destacan: dos genes que codifican para proteínas oxidorreductasas de unión a NADP (At5g58490 y At5g39940), *ASPARTIC PROTEASE IN GUARD CELL 1 (ASPG1)* que participa en procesos relacionados a respuesta a sequía a través de la señalización por ABA en células de la guarda y *ELECTRON TRANSFER FLAVOPROTEIN BETA (ETF BETA)*.

Coexpresión negativa		
Gen	Score	Descripción
At5g44570	-0.49	Proteína de función desconocida
At5g40250	-0.46	Proteína de la superfamilia caja U/RING
At5g39730	-0.43	Proteína de la familia tipo AIG2 (<i>avirulence induced gene</i>)
At5g47760	-0.43	Proteína serina/treonina quinasa
At5g37360	-0.43	Proteína de función desconocida
At5g51140	-0.41	Proteína de la familia de Pseudouridin sintasas
At5g35490	-0.41	MRU1 (<i>mto 1 responding up</i>). <i>mto1-1</i> acumula metionina soluble.
At5g37290	-0.4	Proteína de la superfamilia con repeticiones ARM

At5g58490	-0.4	Proteína de la superfamilia con plegamiento Rossmann de unión a NAD(P)
At5g42370	-0.4	Proteína de la superfamilia metalofosfoesterasas tipo Calcineurina
At5g43430	-0.39	ETFBETA
At5g38360	-0.39	Proteína de la superfamilia de hidrolasas alfa/beta
At5g47280	-0.38	ADR1-like 3 (ADR1-L3)
At5g35480	-0.38	Proteína de función desconocida
At4g18270	-0.37	Codifica una proteína similar a la traslocasa bacteriana I (mra Y). Se expresa durante el desarrollo del botón floral.
At5g39940	-0.37	Proteína de la familia de oxidoreductasas de unión a FAD/NAD(P)
At5g43822	-0.36	Proteína de la superfamilia de proteínas con repeticiones de Pentatricopéptidos
At4g09810	-0.36	Proteína de la familia de transportadores de azúcar-nucleótidos UDP-RHA/UDP-GAL TRANSPORTER 5
At5g51080	-0.36	Proteína de la familia RNasa H
At1g08040	-0.36	Proteína de función desconocida (DUF707)
At3g18490	-0.36	ASPG1
At2g16800	-0.35	Proteína de la familia de proteínas transportadoras de alta afinidad a níquel
At5g43440	-0.35	Codifica una proteína cuya secuencia es similar a una ACC oxidasa
At1g77060	-0.35	Proteína de la familia de las fosfoenolpiruvato carboxilasa
At5g50565	-0.35	Proteína de función desconocida

Tabla 4.3: Genes que se co-expresan negativamente con AtTX24.

Esta tabla fue construida a partir de datos suministrados por el software GENEVESTIGATOR (© NEBION / ETH Zurich, 2008), con su herramienta para analizar la co-expresión negativa de genes durante diferentes perturbaciones ambientales. Los datos obtenidos corresponden a Octubre de 2016.

4.5. Efectos fenotípicos de la expresión alterada de AtTX24 en líneas de Arabidopsis

4.5.1 Análisis de la ausencia del gen AtTX24

4.5.1.1 Selección de una línea mutante homocigota attx24

Semillas de la línea SALK_000861 fueron usadas para identificar líneas mutantes homocigotas para el gen AtTX24, las cuales se genotificaron mediante la técnica de PCR utilizando ADNg y ADNc. Para ello, se diseñaron los cebadores AtTX24 fw y AtTX24 rev (que permitieron la amplificación del gen completo), el cebador RP (que hibrida cercano al lugar de inserción del ADN-T) y el cebador LB (que hibrida en la región izquierda del ADN-T). De esta manera se espera obtener, para una línea mutante homocigota: ninguna amplificación para el

gen endógeno y amplificación para el par de cebadores RP/LB. Los tamaños esperados de amplificación son: gen *AtTX24* 882 pb, gen *pp2a* (control positivo) 355 pb, ADNc *AtTX24* 726pb, ADNc *pp2a* 142 pb. El producto amplificado entre los cebadores RP y LB es de 200pb. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa 1.5% p/v teñidos post-corrida con el colorante Gel Green. En la Figura 4.3 B se observa que, en la línea *attx24*, sólo se obtuvo amplificación con los cebadores RP/LB, y no se obtuvo amplificación para el gen completo.

Adicionalmente, se demostró la ausencia del transcrito de *AtTX24* mediante PCR semicuantitativa (RT-PCR) en hojas completamente expandidas de plantas *attx24* homocigotas (Figura 4.3 B).

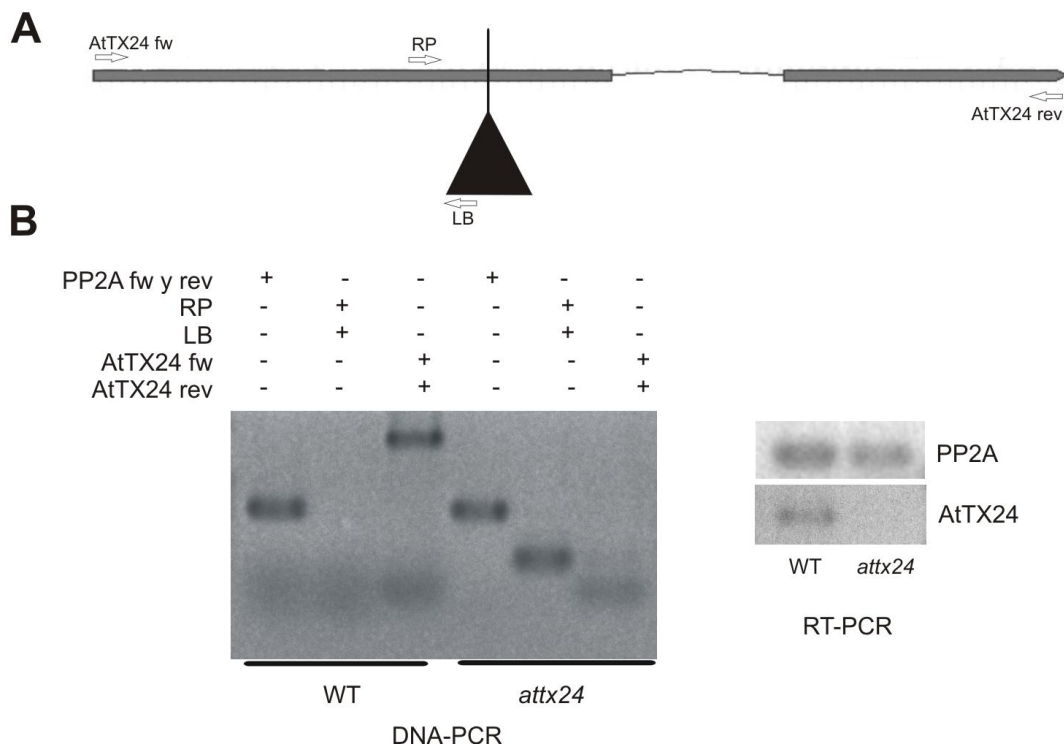


Figura 4.3: Caracterización molecular de la línea mutante *attx24*

A: Representación esquemática de la línea mutante por inserción de ADN-T utilizada en este trabajo. **B:** A la izquierda la ausencia del fragmento amplificado en la mutante *attx24* y la presencia del fragmento amplificado usando los cebadores RP/LB que corroboran la presencia del ADN-T. A la derecha, se observa la ausencia del transcrito *AtTX24* en la mutante aislada mediante RT-PCR. El ADNg y el ARN total se obtuvieron de hojas de roseta de plantas de 3 semanas.

4.5.1.2 Análisis fenotípico de la línea *attx24* en condiciones normales de crecimiento

La línea mutante *attx24* se caracterizó fenotípicamente a lo largo de su desarrollo en condiciones normales de luz y temperatura observándose que presenta una mayor producción de raíces (Figura 4.4 A) y, aunque no se observan diferencias en la arquitectura y área de la roseta (Figura 4.4 B), los tallos resultaron ser de mayor longitud (Figura 4.4 C).

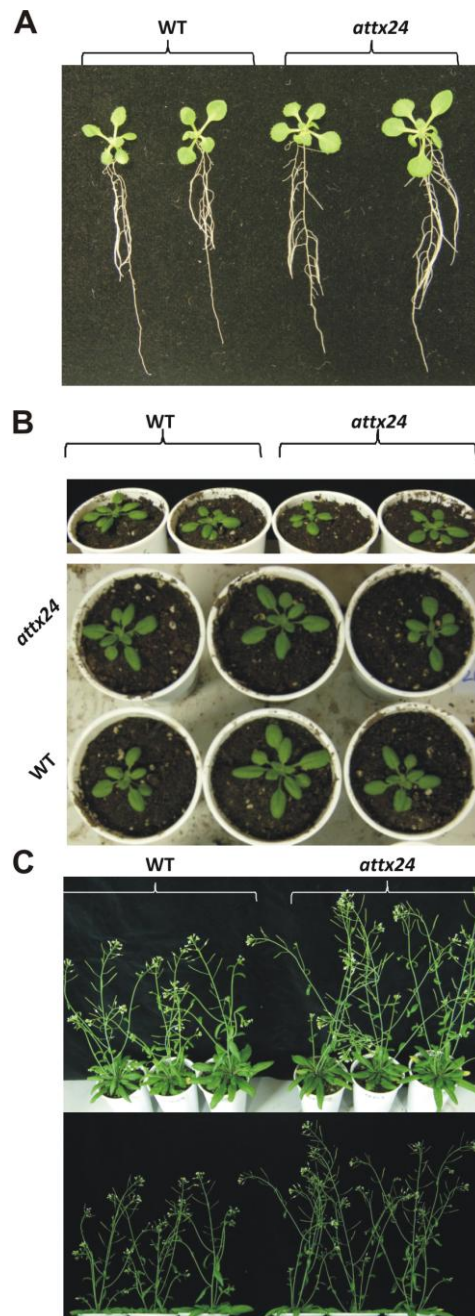


Figura 4.4: Caracterización del fenotipo de la línea mutante *attx24* a lo largo de su desarrollo en condiciones normales de luz y temperatura.

A: plantas de 14 días, B: plantas de 21 días, C: plantas de 40 días de edad.

Por otro lado, se cuantificaron los niveles de pigmentos en plantas adultas de 6 semanas de edad, observándose que las mutantes *attx24* presentan un nivel significativamente menor de chl a y carotenoides que la línea control WT (Figura 4.5).

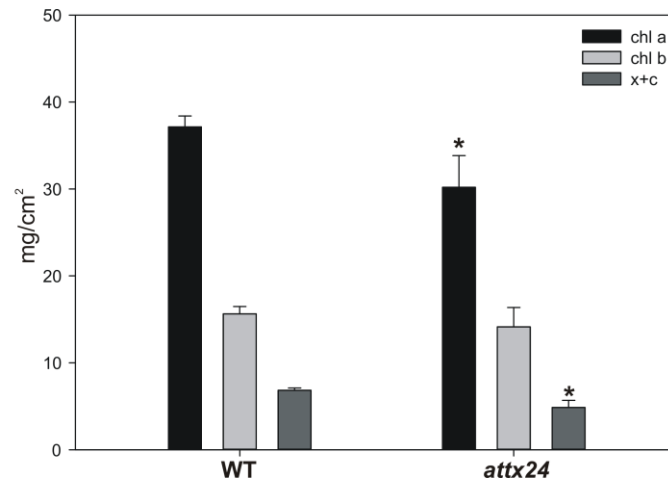


Figura 4.5: Cuantificación de pigmentos fotosintéticos.

Niveles de pigmentos fotosintéticos (chl a, b y x+c) cuantificados en plantas de 6 semanas de edad crecidas en condiciones normales de luz y temperatura. El asterisco (*) indica diferencias significativas respecto del control de acuerdo al test t de Student con una $P < 0,05$. El experimento tuvo un $n \geq 4$.

Con el propósito de evaluar si existe algún desbalance de ERO en las plantas *attx24*, se evaluó la presencia de H_2O_2 mediante tinción con DAB a lo largo del ciclo de vida de las plantas. En la Figura 4.6 se puede observar que, durante condiciones de crecimiento normales de luz y temperatura, la línea *attx24* presenta menores niveles de H_2O_2 respecto a la línea control, principalmente en el estadio de plántulas de 11 días de edad.

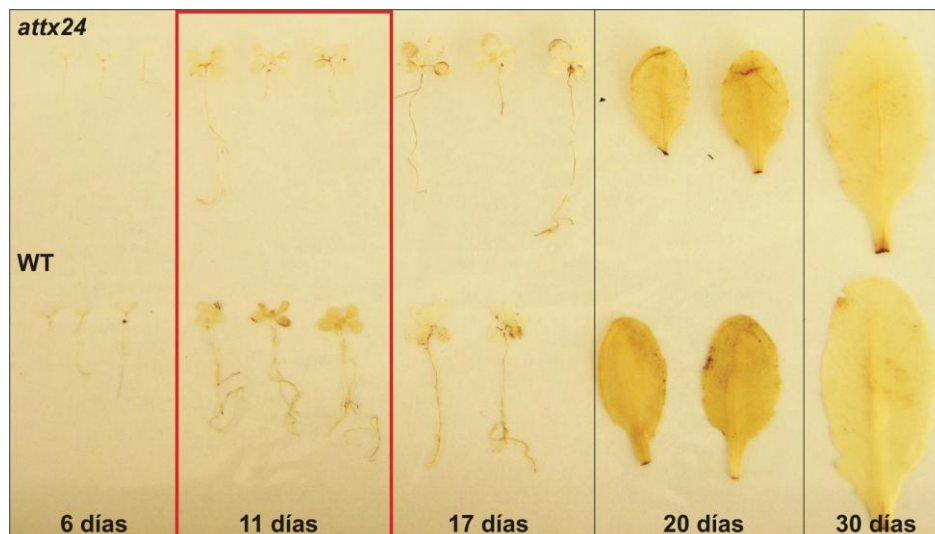


Figura 4.6: Evaluación de la presencia de H_2O_2 a lo largo del ciclo de vida de la planta.

4.5.1.3 Análisis fenotípico de la línea *attx24* en condiciones de estrés abiótico

Se aplicó estrés salino y osmótico en las plantas transgénicas *promAtTX24::GUS* y se evaluaron los niveles de la actividad del gen reportero respecto de la condición control. En ambos casos se observó un aumento de la actividad transcripcional del gen ya que se observó una coloración GUS más intensa en raíces e hidátodos (Figura 4.7).

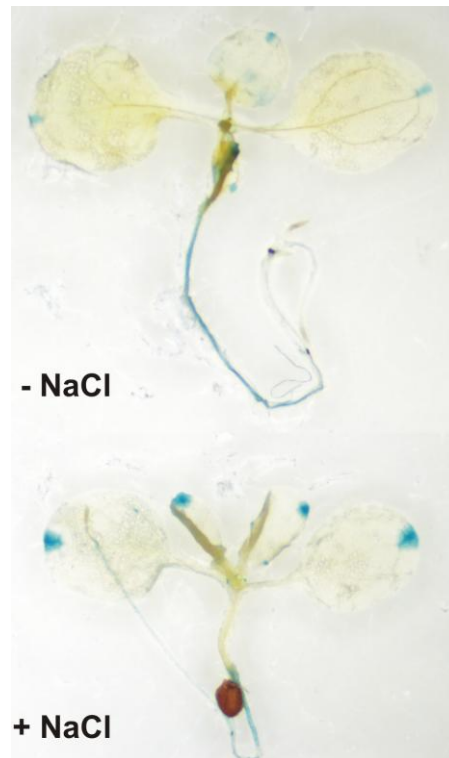


Figura 4.7: Análisis de la expresión del *promAtTX24:GUS* luego de la aplicación de estrés salino.

Se observa que el gen *AtTX24* se induce en el tratamiento realizado con NaCl 200 mM en MS 0,5X durante 2 h. La condición control fue MS 0,5X sin agregado de NaCl.

Debido a esto se evaluó la respuesta de la línea mutante *attx24* a salinidad utilizando dos tipos de ensayos. Por un lado, plantas adultas crecidas en tierra fueron tratadas con NaCl 250 mM y 500 mM agregado como se detalla en la sección 3.14 de Materiales y Métodos y, por otro lado, se evaluaron plántulas incubadas en medio líquido definido al cual se le agregó NaCl 200 mM.

Como puede observarse en la Figura 4.8, la línea *attx24* no mostró diferencias significativas respecto de la línea WT en los tratamientos realizados.

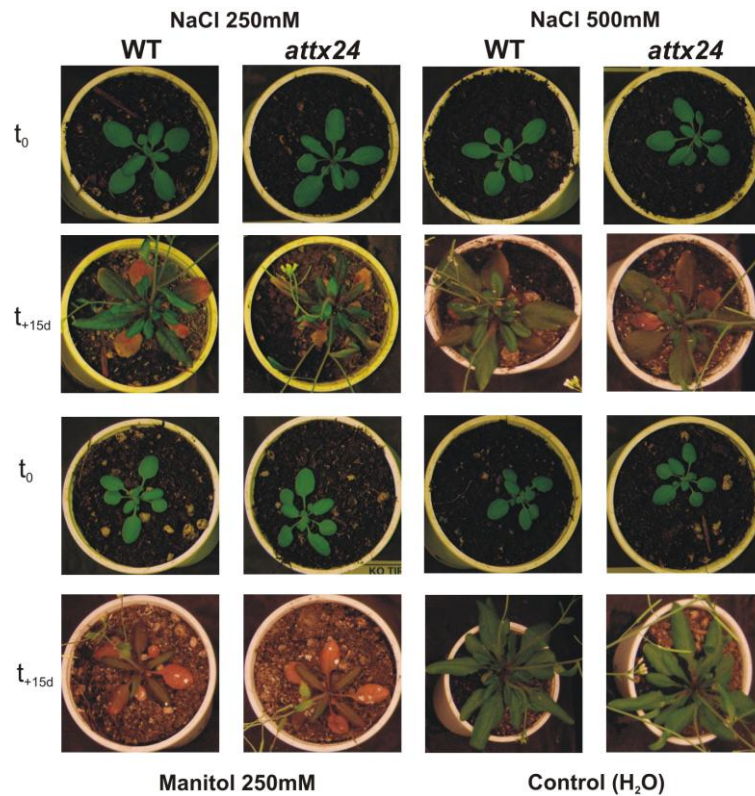


Figura 4.8: Estrés salino en plantas adultas de *Arabidopsis* de la línea *attx24*.

Plantas adultas se regaron con soluciones salinas (NaCl 250 mM, NaCl 500 mM, Manitol 250 mM) y agua como control durante 15 días. Se observa que este tratamiento no genera diferencias significativas entre la línea mutante *attx24* y la línea control WT.

Analizar la respuesta a la salinidad mediante la adición de sal al agua de riego representa una condición en la que es difícil evaluar con certeza cuánto NaCl es accesible a la raíz de la planta, por lo que se decidió analizar qué sucede en medio líquido, donde toda la raíz de la planta queda en contacto directo con el medio salino líquido, con una concentración de NaCl constante y conocida. Para este ensayo se utilizaron plántulas de 10 días.

Como puede observarse en la Figura 4.9, a los 4 días de tratamiento se observa que en la condición MS 0,5X NaCl 200 mM la línea *attx24* presenta mejor sobrevivencia al estrés salino ya que en las mismas condiciones la línea control WT presenta todas sus hojas blanquecinas. Esto evidencia que, en las condiciones ensayadas, la línea *attx24* es más tolerante al estrés salino que las plantas control WT.

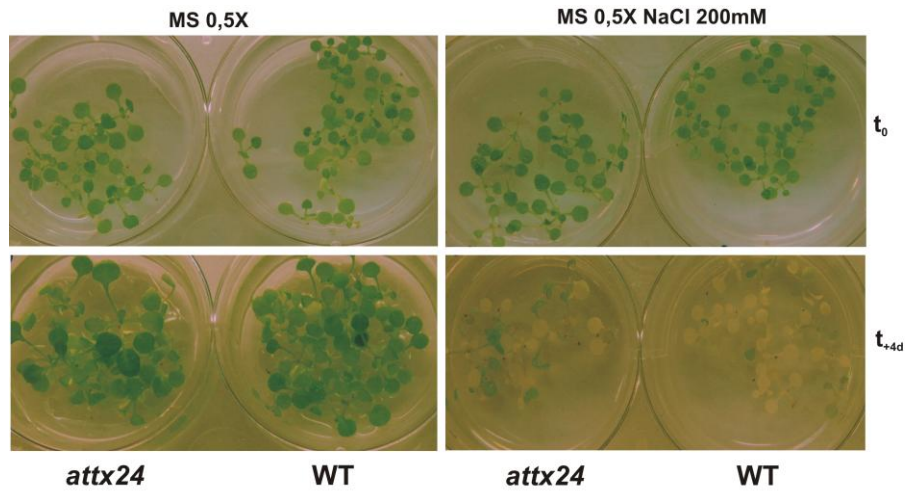


Figura 4.9: Estrés salino en plántulas de *Arabidopsis* de la línea *attx24*.

Se incubaron plántulas de 10 días en medio líquido solo (control) y con agregado de NaCl 200 mM durante 4 días.

Dadas las diferencias observadas entre líneas se evaluaron distintos parámetros relacionados al estrés, por ejemplo niveles de pigmentos fotosintéticos, niveles del osmolito protector Pro (Bates y col., 1973), los niveles de H_2O_2 mediante tinción con DAB y la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y GR a tiempo 0 h, 2,5 h y 25 h de iniciado el tratamiento. Estos tiempos se eligieron ya que se decidió evaluar si este gen participa en procesos tempranos de señalización y de esta forma contribuir al fenotipo observado de tolerancia al estrés salino luego del tratamiento de 4 días. Sin embargo, tanto los niveles de pigmentos fotosintéticos (chl a y b) como los niveles de Pro, a los distintos tiempos evaluados luego de iniciado el estrés salino, no difieren significativamente entre las líneas en estudio (Figura 4.10 y 4.11).

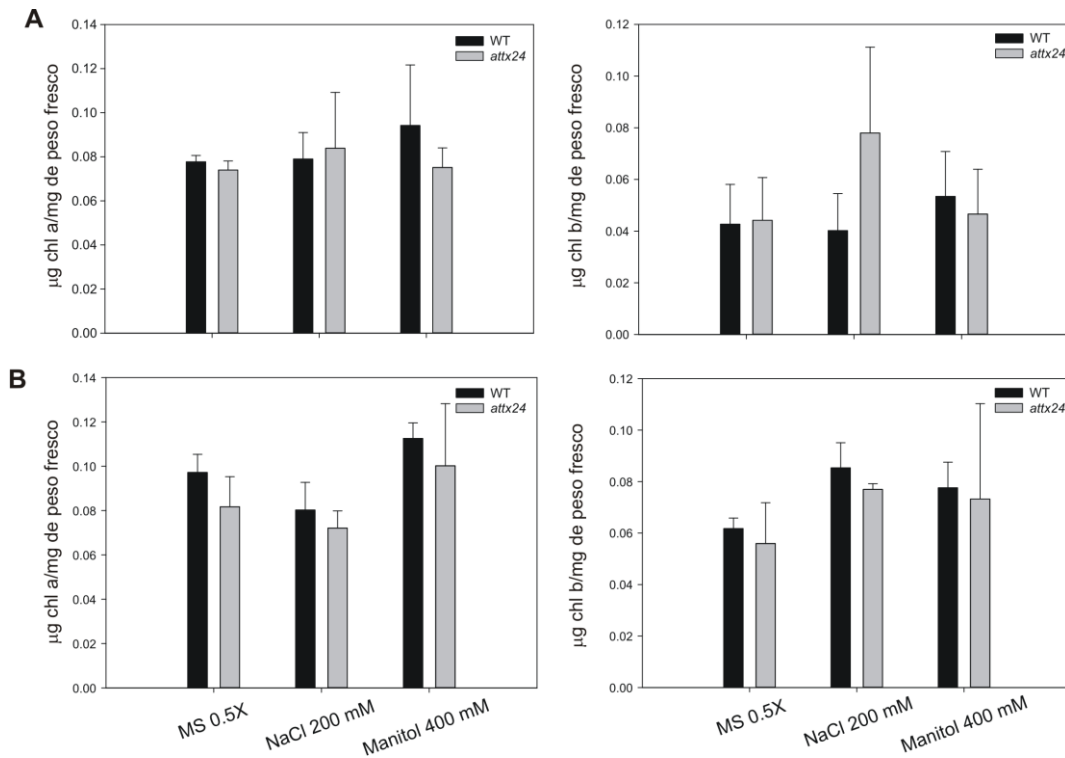


Figura 4.10: Contenido de clorofilas a y b en estrés salino.

Se determinó el contenido de chl a y b en extractos de hojas de plantas incubadas 2,5h (A) y 25h (B) en MS 0,5X, MS 0,5X NaCl 200 mM y MS 0,5X Manitol 400 mM. Se expresó como el valor promedio \pm SE de 4 réplicas biológicas. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Microsoft Excel usando el test t de Student, no se observan diferencias significativas entre líneas.

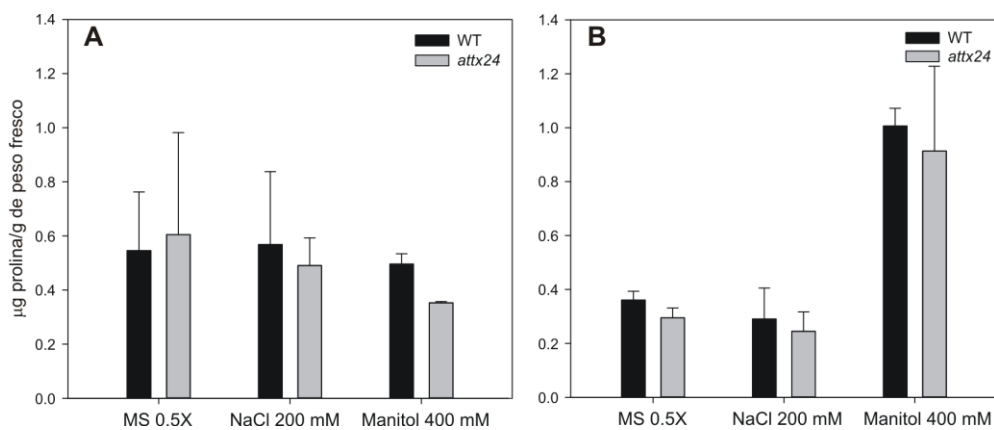


Figura 4.11: Contenido de Pro libre en estrés salino.

Se determinó el contenido de prolina en extractos de hojas de plántulas incubadas 2,5h (A) y 25h (B) en MS 0,5X, MS 0,5X NaCl 200 mM y MS 0,5X Manitol 400 mM. Se expresó como el valor promedio \pm SE de 4 réplicas biológicas. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Microsoft Excel usando el test t de Student, no se observan diferencias significativas entre líneas.

Respecto a las actividades enzimáticas CAT y GR se observó que, independientemente de la aplicación de estrés salino u osmótico, las actividades CAT (Figura 4.12 A y B) y GR (Figura 4.12 C y D) son significativamente menores en la línea mutante *atx24* que en la línea control WT. Esto podría deberse a que la línea *atx24* presenta una menor producción de ERO que la línea control, como se observó en la Figura 4.6, y se activarían menos sus barreras de defensa enzimáticas.

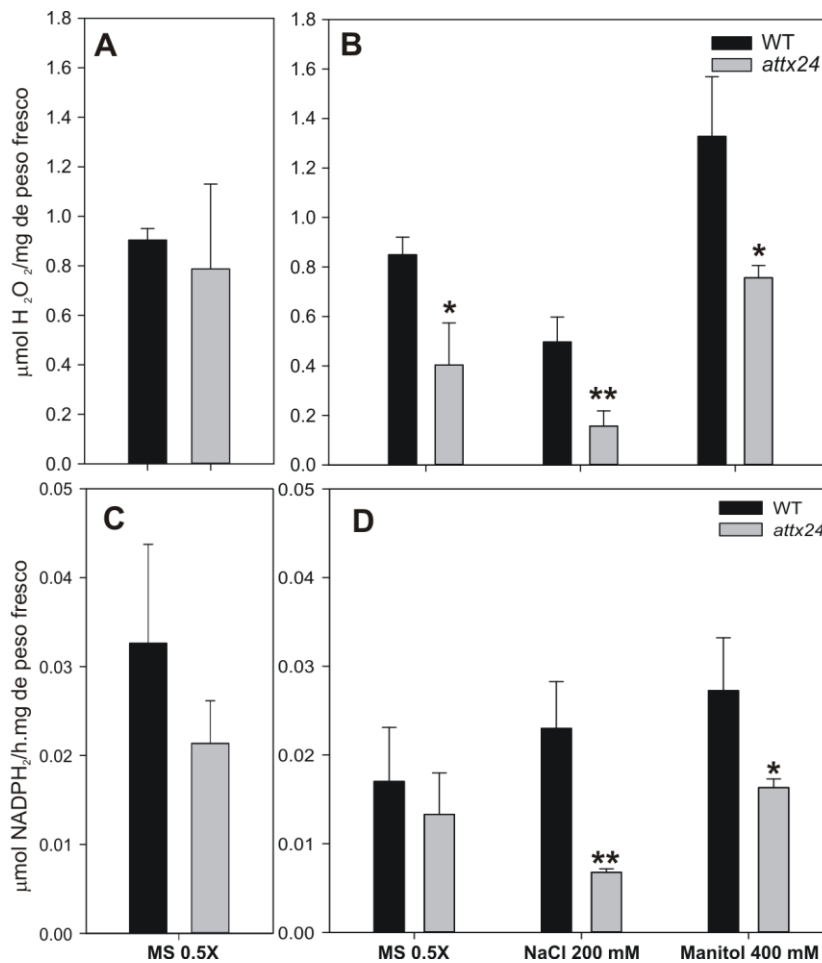


Figura 4.12: Análisis de actividad de enzimas antioxidantes en las líneas WT y *atx24*.

A y B: Actividad CAT; **C y D:** Actividad GR. Se midieron en extractos de hojas de plántulas incubadas 0 h (**A y C**), y 25h (**B y D**) en MS 0,5X; MS 0,5X NaCl 200 mM y MS 0,5X Manitol 400 mM. Se expresó como el valor promedio \pm SE de 3 réplicas biológicas. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Microsoft Excel usando el test t de Student, las diferencias estadísticamente significativas $P < 0.05$ se indican con *, $P < 0.01$ se indican con **.

Para evaluar estrés oxidativo se realizó un tratamiento con el herbicida MV, el cual es propagador de anión superóxido en cloroplastos. Como puede verse en la Figura 4.13, la línea *atx24* es más tolerante a MV en concentraciones de 10 y 100 μM , ya que estas plantas presentaron menos afecciones que la línea control luego del tratamiento. En MV 10 μM , la línea control WT presenta mayores signos de muerte en las hojas que la línea mutante. En MV 100 μM se observa que el centro de las plantas mutantes permanece verde, mientras que la línea control WT se ve completamente muerta a los 3 días del tratamiento.

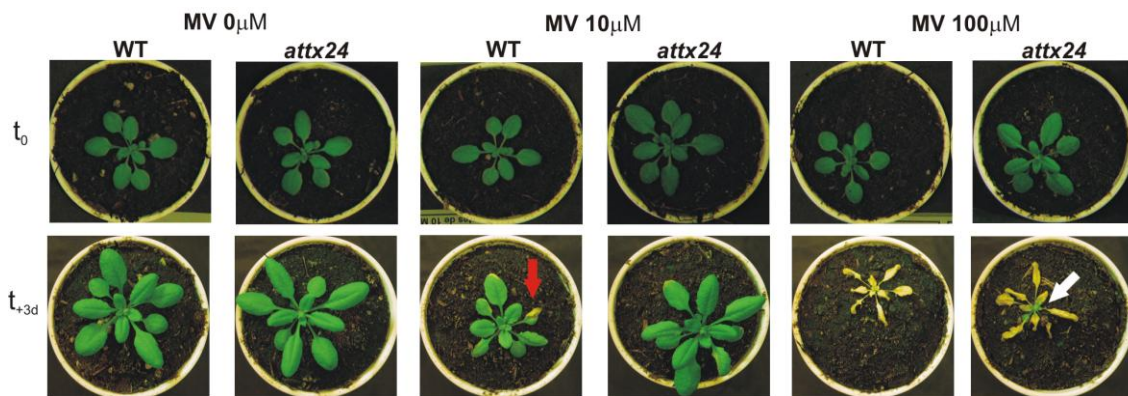


Figura 4.13: Estrés oxidativo empleando MV en Arabidopsis.

Plantas de 4 semanas de edad fueron rociadas con MV (10 y 100 μM en 0.1 % Tween-20) y expuestas a la luz. Luego de 3 días en condiciones normales de luz y temperatura se observa que la línea mutante *atx24* es más tolerante que la línea control WT, tanto a 10 μM (lesiones indicadas con flecha roja) como a 100 μM , ya que su centro permanece verde (indicado con flecha blanca).

Dadas las diferencias evidenciadas en el tratamiento con MV 100 μM se decidió evaluar la presencia de H_2O_2 mediante tinción con DAB en condiciones basales y luego de la aplicación de MV 100 μM . Se tomó una hoja por planta tratada y sin tratar (condiciones basales) para realizar la tinción.

En la Figura 4.14 se observa que en condiciones basales los niveles de H_2O_2 son comparables entre las líneas en estudio. Luego de 24 h del tratamiento con MV 100 μM , la línea *atx24* presenta menores niveles de H_2O_2 que la línea control WT. Esto refuerza lo observado en el experimento realizado a distintas concentraciones de MV para la línea *atx24*, ya que una mayor tolerancia podría estar asociada a una menor producción de ERO.

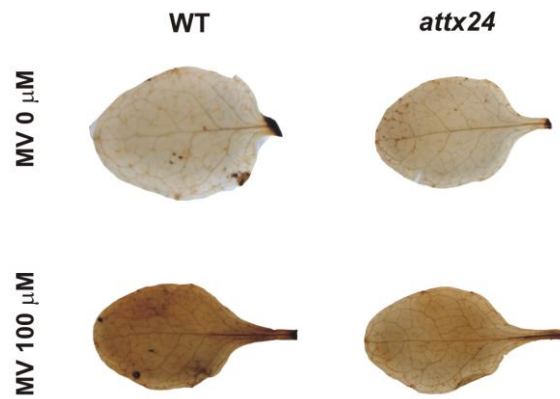


Figura 4.14: Evaluación de presencia de H_2O_2 mediante tinción con DAB.

Luego de 24 h de rociar con MV, se tomaron dos hojas por planta por línea para evaluar la presencia de H_2O_2 mediante tinción con DAB, en condiciones basales (MV 0 μ M) y en presencia de MV 100 μ M.

4.5.2 Análisis de la sobreexpresión del gen *AtTX24*

4.5.2.1 Generación de líneas sobreexpresantes *AtTX24_{ox}*

Se diseñaron cebadores específicos para el gen *AtTX24* (*AtTX24* fw y *AtTX24* rev) y se amplificó el mismo a partir de ADNc y se lo introdujo en el vector binario pBINAR el cual posee el promotor 35S del CaMV que permite la expresión constitutiva del ADNc utilizado (Skirycz y col., 2006). Luego se transformaron plantas de *Arabidopsis* con esta construcción. Se seleccionaron cuatro líneas transgénicas independientes T3: *AtTX24_{ox1}*, *AtTX24_{ox2}*, *AtTX24_{ox3}* y *AtTX24_{ox7}* que sobreexpresan *AtTX24* en los niveles que pueden observarse en la Figura 4.15, evaluados mediante RT-PCR.

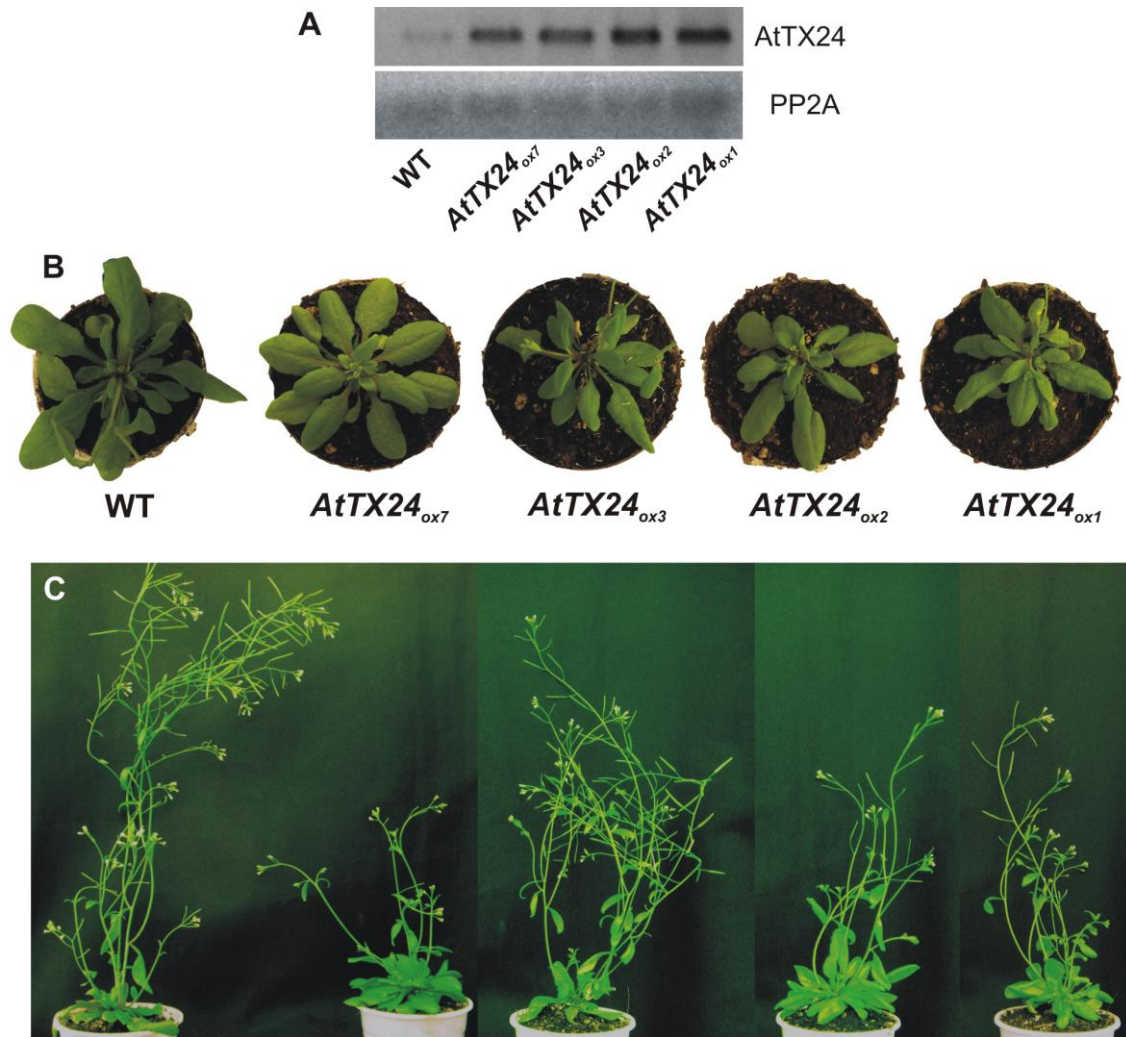


Figura 4.15: Líneas que sobreexpresan *AtTX24* en *Arabidopsis*.

A: Se observan niveles aumentados de expresión del transcrito *AtTX24*, en las líneas sobreexpresantes seleccionadas, mediante RT-PCR. El ARN total se obtuvo de hojas de roseta de plantas de 4 semanas crecidas en condiciones normales de luz y temperatura. **B:** Fotos de las líneas seleccionadas a las 5 semanas y **C:** Plantas de 6 semanas de edad, crecidas en condiciones normales de luz y temperatura.

Las plantas *AtTX24_{ox}* presentan mayor número de hojas y las mismas permanecen verdes por más tiempo que en la línea control WT (Figura 4.15 C). Estas líneas no fueron caracterizadas fenotípicamente de manera exhaustiva por cuestiones de tiempo, aunque sí se determinaron los niveles de pigmentos para tres de ellas, y se observó que presentan mayores niveles de pigmentos, principalmente chl a y x+c (Figura 4.16).

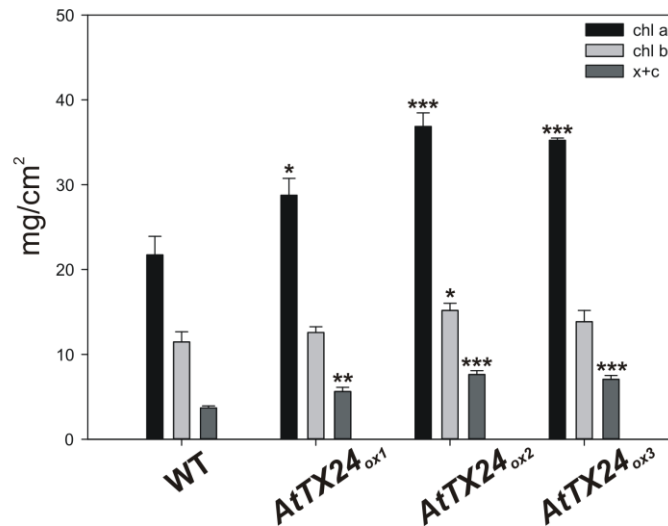


Figura 4.16: Cuantificación de pigmentos fotosintéticos.

Niveles de pigmentos fotosintéticos (clorofilas a, b y carotenoides) cuantificados en plantas de 6 semanas de edad. El asterisco (*) indica diferencias significativas respecto del control de acuerdo al test t de Student con una $P < 0,05$. El experimento tuvo un $n \geq 4$.

4.6 Discusión:

El gen *At5g44910* (*AtTX24*) codifica para una proteína con un dominio TIR y pertenece a la familia de genes con motivo TX. Generalmente, el dominio TIR presente en las proteínas R, está involucrado en interacciones proteína-proteína y funciona en la transferencia de las señales de defensa en las vías de señalización del estrés (Belkhadir y col., 2004). La proteína presenta residuos de serina (7,1%), treonina (3,7%) y tirosina (3,3%), los cuales son posibles sustratos de quinasas, sugiriendo que la fosforilación puede afectar su actividad. De hecho, la base de datos de experimentos de fosfoproteómica (PhosPhAt 4.0, Durek y col., 2010) reporta que la proteína *AtTX24* posee un residuo de tirosina, en la posición 128, que es fosforilado en condiciones de privación de nitrógeno. Además, varios genes que codifican para proteinquinasas resultaron co-expresados positivamente con *AtTX24*. Las proteinquinasas generalmente están involucradas en cascadas de transducción de señales, lo que refuerza la hipótesis de que *AtTX24* podría formar parte de una cascada de señalización en condiciones de estrés.

La información de los análisis de co-expresión permite inferir que los genes que se co-expresan pueden ser co-regulados por los mismos FT que se unen a sitios comunes de sus secuencias promotoras. Dentro de los genes que se co-expresan negativamente con *AtTX24* se identificaron dos genes que codifican para proteínas oxidoreductasas de unión a NADP

(At5g58490 y At5g39940), *ASPG1* cuya sobreexpresión actúa por un mecanismo ABA-dependiente sobre las células de la guarda evitando el estrés hídrico (Yao y col., 2012) y ETFBETA, que codifica para una flavoproteína que transfiere electrones ETF beta, una subunidad del complejo flavoproteína mitocondrial de transferencia electrónica (ETF alfa es At1g50940) en Arabidopsis. La mutación en el gen ETF beta resulta en senescencia acelerada y muerte prematura en experimentos de oscuridad extendida. Se postula que ETF beta estaría involucrado en el catabolismo del aminoácido leucina y de la chl durante la privación de carbohidratos inducida por oscuridad (Ishizaki y col., 2006).

En Arabidopsis, los genes TX y TN se inducen en condiciones de estrés biótico y los patrones de expresión de varios genes TX y TN son consistentes con sus roles en vías de defensa de las plantas o corriente abajo de las mismas. Por lo tanto, se cree que podrían desempeñar un rol en la defensa de las plantas contra patógenos (Nandety y col., 2013). *AtTX24* también se co-expresa con un gran número de genes relacionados con la defensa a patógenos de la planta, como por ejemplo MLO12, FRK1, WRKY17 y IOS1, lo que sugiere una posible función en estrés biótico. Sin embargo, en este trabajo se analizó el posible rol de *AtTX24* en situaciones de estrés abiótico, ya que se observó inducción de sus transcritos cuando se sometieron plántulas de Arabidopsis a estrés oxidativo en tiempos cortos (Scarpeci y col., 2008) y en estrés salino (Genevestigator). La línea mutante *attx24* presenta mayor tolerancia al estrés salino y al estrés oxidativo. Respecto al estrés salino, la tolerancia observada no pudo relacionarse con una acumulación diferencial del metabolito Pro al menos a los tiempos analizados (2,5 h y 25 h) aunque, la fuerte expresión del gen *AtTX24* en raíces (Figura 4.2 B) sugiere que podría participar en procesos relacionados a estrés ambiental a ese nivel, lo que estaría de acuerdo con su participación en el estrés salino.

En el estrés salino se distinguen dos efectos en las células, un efecto osmótico y un efecto iónico o de toxicidad por iones. La señal primaria está causada por la privación de agua lo que origina estrés hiperosmótico, el cual es generalmente llamado estrés osmótico porque la condición hipoosmótica no representa un problema para la planta (Zhu, 2016). Una característica importante de la salinidad es que la señal hiperosmótica causa la acumulación de la fitohormona ABA, que desencadena muchas respuestas adaptativas en plantas (Zhu, 2002 y 2016). Además de esta señal primaria, se pueden distinguir señales secundarias, generadas por la presencia de muy poca agua o mucha sal. Los efectos secundarios del estrés salino incluyen estrés oxidativo; daño a componentes celulares como lípidos de membranas, proteínas y ácidos nucleicos; y disfunción metabólica. Respecto al estrés oxidativo la línea mutante mostró menores señales de daño luego de la aplicación de MV lo que concuerda con la menor

acumulación de H₂O₂ observada luego de este tratamiento. Esto podría indicar que en la línea mutante *attx24* se generan menos o se detoxifican más eficientemente las ERO generadas durante el estrés aplicado.

Con los datos obtenidos hasta aquí, se propone que *AtTX24* además de su posible rol durante estrés biótico participa en procesos de señalización relacionados a estrés abiótico, específicamente aquellos que tienen un componente salino y oxidativo. El fenómeno de tolerancia cruzada a estreses ambientales se observa frecuentemente en plantas, donde la exposición a un tipo de estrés confiere un aumento general en la resistencia a una gama de diferentes estreses (Pastori y Foyer, 2002; Suzuki y col., 2012). La tolerancia cruzada ocurre debido a la co-activación sinérgica de las vías de respuesta a estrés no específicas que cruzan los límites del estrés biótico-abiótico (Bostock, 2005). El fenómeno de tolerancia cruzada está ligado frecuentemente a una producción aumentada de ERO tales como H₂O₂, señalización oxidativa y su asociación a la regulación de la expresión génica a través del centro de actividad de la señalización redox. Es ampliamente aceptado que el H₂O₂ y otras ERO son moléculas importantes en las respuestas al estrés biótico y abiótico, frecuentemente porque sirven como mensajeros para la activación de los genes de defensa (Foyer y Noctor, 2009, 2012).

Capítulo II:

Análisis funcional de la proteína

AtERF112

5. CAPITULO II: ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA ATERF112

5.1 Introducción:

La mayoría de las respuestas génicas al estrés está controlada a nivel transcripcional por la acción de proteínas especializadas o FT. En *Arabidopsis* han sido identificados más de 1800 FT (*Arabidopsis Genome Initiative*, 2000; Riechmann y col., 2000; Gong y col., 2004) dentro de los cuales se incluyen a 147 miembros que pertenecen a la superfamilia de AP2/ERF (Nakano y col., 2006) y tienen un rol esencial en la adaptación a estreses bióticos y abióticos (Mizoi y col., 2012). Estos FT son específicos de plantas e incluyen a 200 miembros en *Populus spp.* (Zhuang y col., 2008); 291 miembros en *Brassica spp.* (Song y col., 2013); 108 miembros en *Citrus spp.* (Ito y col., 2014); 149 miembros en *Vitis spp.* (Licausi y col., 2010); 155 miembros en *Solanum spp.* (Charfeddine y col., 2015); y 180 miembros en *Oryza spp.* (Nakano y col., 2006; Sharoni y col., 2011; Müller y col., 2015).

La superfamilia AP2/ERF se define así por presentar el dominio llamado AP2/ERF, que tiene de 60 a 70 AA y está involucrado en la unión al ADN. Este dominio se identificó por primera vez en el gen homeótico de *Arabidopsis* APETALA 2 (Jofuku y col., 1994), y un dominio similar se identificó posteriormente en proteínas de unión a elementos de respuesta a etileno o EREBP de Tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Ohme-Takagi y Shinshi, 1995).

Los miembros de la superfamilia AP2/ERF pueden dividirse en 3 grupos en base a su estructura global (Riechmann y col., 2000). Los miembros de la familia AP2 (14 miembros en *Arabidopsis*) contienen dos dominios AP2/ERF, los miembros de la familia RAV (6 miembros) poseen un dominio AP2/ERF y un dominio de unión a ADN adicional denominado B3, mientras que el resto de las proteínas (125) contienen un único dominio AP2/ERF (Sakuma y col., 2002; Riechmann y col., 2000). Estos 125 miembros se dividen a su vez en 3 grupos: la subfamilia DREB (*dehydration response element binding*, 56 miembros; grupo A), la subfamilia ERF (65 miembros; grupo B) y otros (4 miembros).

Los factores ERF han sido extensamente reportados como participantes de la respuesta a patógenos por unión a secuencias que contienen el motivo AGCCGCC (la caja GCC), que es un elemento de respuesta a etileno (Solano y col., 1998; Berrocal-Lobo y col., 2002; Lorenzo y col., 2002). Sin embargo, investigaciones recientes han mostrado que varios ERF también se unen a los elementos de respuesta a sequía (DRE), siendo uno de sus roles más importantes como reguladores de la adaptación de las plantas a condiciones de estrés abiótico (Mizoi y col., 2012; Cheng y col., 2013).

La expresión de los ERF está regulada por múltiples factores tales como etileno, frío, sequía, salinidad, heridas y patógenos (Fujimoto y col., 2000). En *Arabidopsis*, muchos de los genes ERF están involucrados en respuestas a estrés abiótico. Por ejemplo, los *AtERF1-5* se inducen por sequía, salinidad y frío (Fujimoto y col., 2000). *AtERF7* se ha reportado como uno de los reguladores del tamaño de estomas y de las respuestas a estrés por sequía, alta salinidad, frío y ABA mediante vías de señalización ABA-dependientes (Song y col., 2005; Zhu y col., 2010). Sin embargo, la mayoría de los genes de la familia ERF aún no han sido caracterizados y aunque se cree que estos genes podrían tener roles importantes en muchos aspectos fisiológicos de las plantas, se requiere de un desafío experimental importante para determinar la función biológica específica de cada uno de ellos (Nakano y col., 2006). En este trabajo de tesis se inició la caracterización funcional del gen *At2g33710* (*AtERF112*), que codifica para un FT de la familia AP2/ERF, el cual resultó inducido transcripcionalmente 5,71 veces en condiciones de estrés oxidativo (Scarpeci y col., 2008).

5.2 *AtERF112* pertenece a la superfamilia de FT AP2/ERF

La secuencia nucleotídica que codifica para la proteína AtERF112 tiene 2225 pb, organizados en una región 5'UTR de 81 pb (Figura 5.1 A, gris claro), dos exones (657 pb codificantes; Figura 5.1 A, gris oscuro), un intrón de 725 pb (Figura 5.1 A, líneas) y una región 3'UTR de 762 pb (Figura 5.1 A, gris claro) según datos predichos por el *Arabidopsis Information Resource* (TAIR, www.arabidopsis.org). La característica de poseer intrones es algo fuera de lo común dentro de la familia ERF, ya que la mayoría de sus miembros se caracteriza por no poseerlos (Nakano y col., 2006). Este gen se encuentra ubicado en el cromosoma dos y codifica para una proteína de 218 AA (MM 24.3 kDa) y pI 8.43, con un dominio AP2 localizado entre los residuos de 69 a 128 presente hacia el extremo N-terminal de la proteína (Figura 5.1 B).

AtERF112 pertenece al grupo X de la familia ERF definido por Nakano y col. (2006), el cual incluye 8 genes (*AtERF108-115*). Los genes de este grupo se caracterizan por presentar, además del dominio AP2, un motivo conservado CMX-1 también en la región N-terminal, a excepción de *AtERF112* que no lo posee. En la Figura 5.1 C se observa el arreglo de dominios que presenta cada miembro del grupo.

Las secuencias aminoacídicas de los miembros del grupo X fueron analizadas utilizando el programa ClustalW, lo que permitió determinar que los homólogos más cercanos a *AtERF112* son las proteínas *AtERF113* (RAP2.6L, con un 43,20% de homología de secuencia), *AtERF114* (*ERF BUD ENHANCER (EBE)*, con un 41,57% de homología de secuencia) y *AtERF108* (RAP2.6, con un 41,32% de homología de secuencia) lo cual se evidencia en el árbol

filogenético construido con dichas proteínas (Figura 5.1 C). En cuanto a los homólogos en otras especies, se ha reportado que *AtERF112* posee tres genes homólogos en Arroz (grupo Xc): *OsERF#105* (*Os05g36100*), *OsERF#106* (*Os08g42550*) y *OsERF#107* (*Os02g32140*) (Nakano y col., 2006), siendo todos de función aún desconocida.

Todos los genes pertenecientes al grupo X, a excepción de *AtERF112*, han sido caracterizados funcionalmente:

- ✓ **AtERF108** (*At1g43160*) llamado RAP2.6 y **AtERF113** (*At5g13330*) llamado RAP2.6L son transactivadores que participan en procesos de desarrollo de plantas así como en señalización de estrés biótico y abiótico (Krishnaswamy y col., 2011).
- ✓ **AtERF109** (*At4g34410*) llamado RRTF1 media la comunicación entre la señalización por JA y la biosíntesis de auxinas para regular la formación de raíces laterales en Arabidopsis. Las mutantes *aterf109* poseen menores raíces laterales bajo tratamiento con metil jasmonato respecto a WT, mientras que la sobreexpresión de *AtERF109* causa un fenotipo de raíces que se asemeja a mutantes que sobreproducen auxinas (Matsuo y Oelmüller, 2015). *AtERF109* se une directamente a cajas GCC en los promotores de *ASA1* y *YUC2*, que codifican para dos enzimas claves en la biosíntesis de auxinas. Existiría un mecanismo molecular que relaciona JA y auxinas durante la formación de raíces laterales inducido por JA (Cai y col., 2014).
- ✓ **AtERF110** (*At5g50080*) está involucrado con el tiempo de floración. Mutantes en este gen poseen un fenotipo similar a mutantes en *ctr1* (*CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1*) (Zhu y col, 2013).
- ✓ **AtERF111** (*At5g64750*) llamado *ABR1* fue identificado como un represor de la respuesta a ABA, ya que la disrupción del gen *ABR1* lleva a una respuesta de hipersensibilidad a ABA en la germinación de semillas y ensayo de crecimiento de raíces (Pandey y col., 2005).
- ✓ **AtERF114** (*At5g61890*) llamado *EBE*, es altamente expresado en células en proliferación, se induce por decapitación de meristema, la alteración de los niveles basales de expresión causa cambios en la arquitectura de la planta de forma tal que cuando *EBE* se sobreexpresa se produce un mayor número de ramificaciones en las inflorescencias (Mehrnia y col, 2013).

- ✓ **AtERF115** (*At5g07310*) actúa limitando la velocidad de división celular del centro quiescente en la raíz, activando la hormona peptídica PSK5 (Heyman y col, 2013).

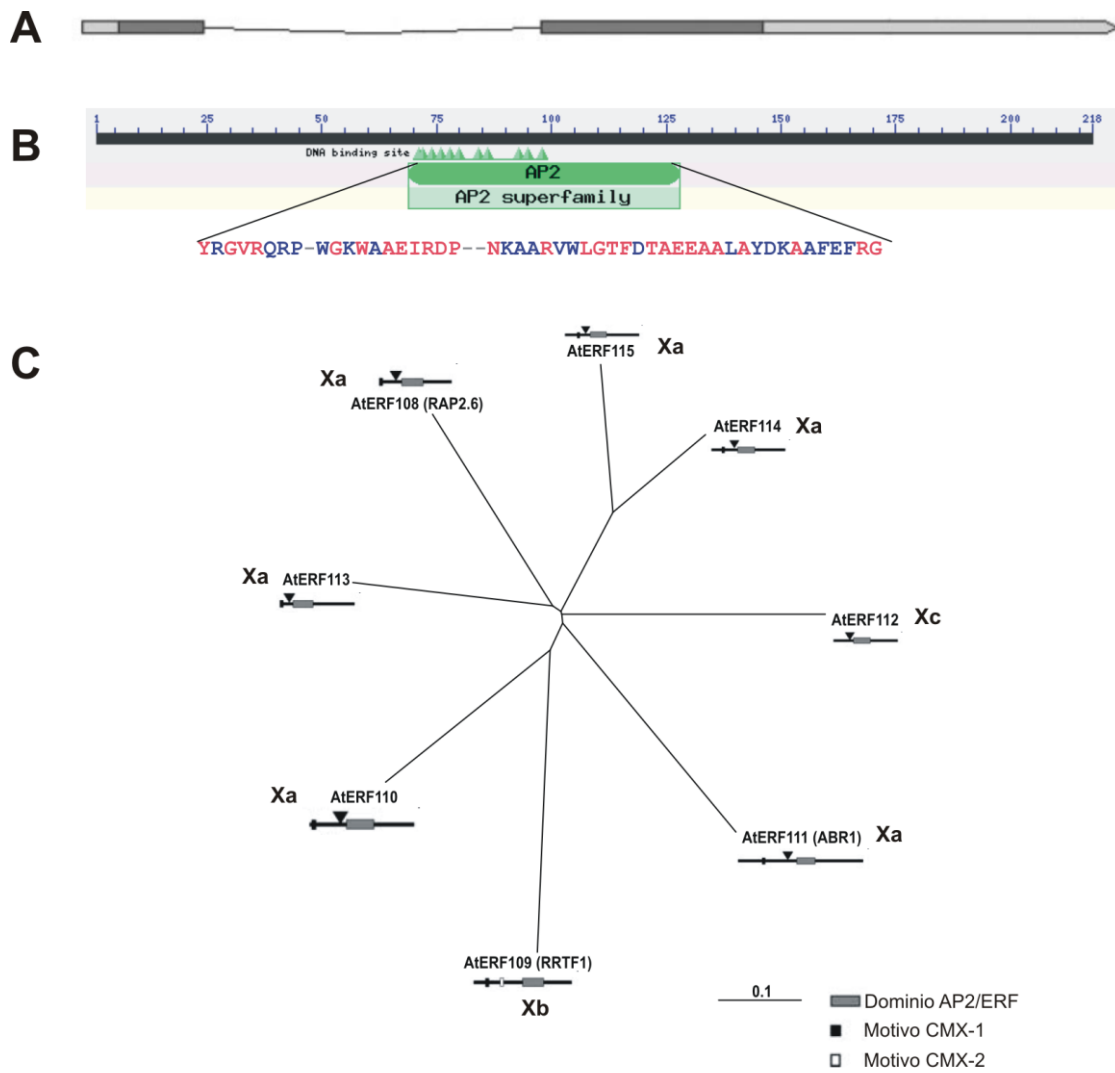


Figura 5.1: Análisis genético de AtERF112.

A: Vista esquemática del gen *AtERF112/At2g33710* que muestra en gris claro los elementos 5'UTR y 3'UTR, en gris oscuro los exones y en línea el intrón. **B:** La proteína AtERF112 posee un dominio AP2/ERF hacia la región N-terminal y en letras rojas se visualizan los residuos conservados del dominio. A y B adaptado de TAIR y NCBI. **C:** Árbol filogenético de las proteínas AtERF del grupo X de Arabidopsis realizado según se describe en la sección 3.20 de Materiales y Métodos. El triángulo negro indica la posición del intrón. La secuencia del motivo conservado CMX-1 es MVSALTQVISN y la del motivo CMX-2 es LPPLDAGPCPLCGVTGCYGC. *Imagen adaptada de Nakano y col. (2006).*

Respecto a la caracterización estructural de la proteína AtERF112 se realizaron predicciones de estructura secundaria utilizando el programa SOPMA (Geourjon y Deléage, 1995) que permite calcular qué porcentaje de hélices alfa, láminas beta, giros y *random coil* posee la proteína. En la Figura 5.2 se observa que la proteína en estudio posee un 26% de hélices alfa, un 11% de láminas beta, un 5% de giros y un 58% *random coil* (Artimo y col., 2012). Además, se analizó la secuencia de la proteína AtERF112 en el sitio SOSUI para predecir regiones transmembrana y no se detectó ninguna, lo que sugiere que sería una proteína soluble.

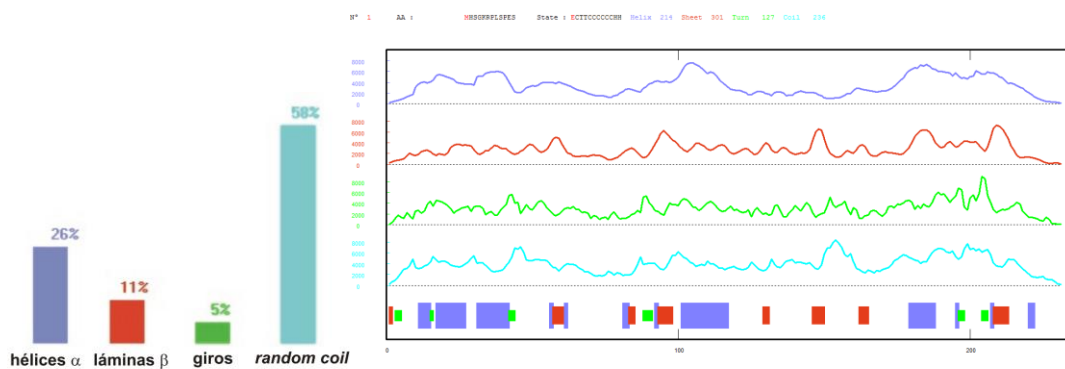


Figura 5.2: Predicción de estructura secundaria de AtERF112.

Resultados de la predicción de la estructura secundaria de la proteína AtERF112 empleando el software SOPMA (*Significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments*) (Geourjon y Deléage, 1995).

5.3 Localización subcelular de la proteína AtERF112

Análisis computacionales con WoLF PSORT (Horton y col., 2007) para predecir la localización subcelular de AtERF112 proponen localización nuclear. A fin de validar esta predicción, se analizó la localización subcelular de *AtERF112* mediante expresión estable en *Arabidopsis* usando la proteína GFP bajo el control del promotor 35S del CaMV. En la Figura 5.3 se observa que la proteína de fusión AtERF112::GFP se acumula predominantemente en el compartimento nuclear de las células, mientras que la proteína GFP libre se localiza en citoplasma y núcleo (Haseloff y col., 1999).

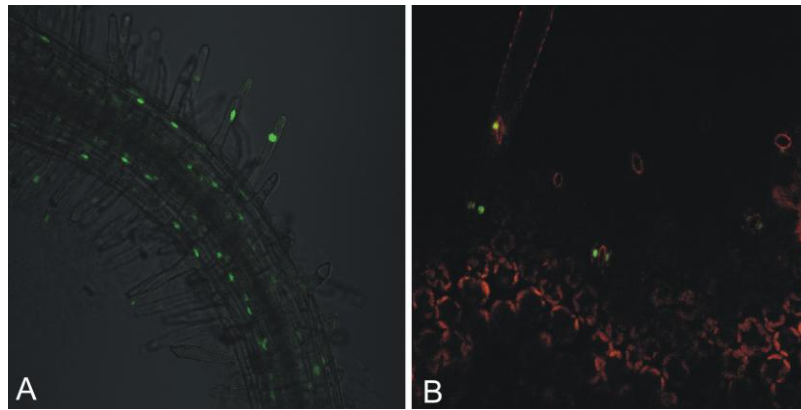


Figura 5.3: Localización subcelular de la proteína de fusión AtERF112::GFP.

El producto del gen *AtERF112* fusionado a la proteína GFP se localiza en núcleo, tanto en células de la raíz como en células oclusivas de estomas. Imágenes obtenidas mediante Microscopía Confocal utilizando plántulas de 10 días de edad crecidas en medio de cultivo estéril **A:** raíz; **B:** hoja.

5.4 Análisis de la región promotora de *AtERF112* y de su patrón de expresión en *Arabidopsis*

5.4.1 Estudios predictivos de elementos regulatorios

La región regulatoria 5' corriente arriba del gen *AtERF112* es de 3000 pb. Para analizar los elementos regulatorios en la región promotora proximal se seleccionó una secuencia de 1086 pb de longitud y se analizó utilizando el software PLACE (Higo y col., 1999) en busca de elementos regulatorios relacionados con estrés abiótico, encontrándose varias repeticiones de sitios de unión consenso correspondiente a los FT de las familias DOF, WRKY y MYC, lo que sugiere una posible regulación de *AtERF112* por estas proteínas (Tabla 5.1).

Elemento <i>cis</i> putativo	Cantidad de repeticiones	Secuencia 5' → 3'
DOF	16	AAAG
WRKY (710S)	12	TGAC
MYC	10	CANNTG
W-BOX (NTERF3)	9	TGACY
W-BOX (ATNPR1)	5	TTGAC
W-BOX (HVIS01)	5	TGACT

Tabla 5.1: Elementos regulatorios putativos presentes en la región *promAtERF112* de 1086 pb de longitud encontrados utilizando el Software PLACE.

5.4.2 Generación de líneas transgénicas que expresan el gen reportero *GUS* bajo la dirección del fragmento promotor

Para monitorear el patrón de expresión del gen *AtERF112*, se generaron líneas transgénicas de *Arabidopsis* que contienen la fusión transcripcional del gen reportero *GUS* bajo el control de la secuencia regulatoria de *AtERF112* localizada corriente arriba del marco abierto de lectura a la que se denominó *promAtERF112::GUS*. En principio, se seleccionaron tres regiones de distinto tamaño para monitorear la expresión de *AtERF112* “*in planta*”. Las regiones de 1486 y 1086 pb no pudieron ser clonadas durante este trabajo pero se logró incluir en la construcción una región de 250 pb, que incluye a la región reportada de 81 pb como 5'UTR.

Se seleccionaron y analizaron para actividad *GUS* más de 5 líneas transformantes independientes que contenían la construcción *promAtERF112::GUS*. El análisis de las líneas reveló una alta expresión *GUS* en cotiledones (Figura 5.4 A), hidátodos (Figura 5.4 A), sistema vascular (Figura 5.4 B), flores (Figura 5.4 C), anteras, estigma (Figura 5.4 D) y polen (Figura 5.4 E y G). Los niveles de expresión en hojas completamente expandidas fueron bajos en la lámina, pero altos en las regiones vasculares (Figura 5.4 B). No se evidenció expresión en raíces, hipocótilos, tallos, hojas caulinas, silicuas y semillas (Figura 5.4, A, C, D y F). Posteriormente, durante el trabajo de tesina del Lic. Diego Mengarelli (2016) se logró clonar la secuencia promotora de 1086 pb, lo que permitió completar el análisis del patrón de expresión en órganos y tejidos de *AtERF112*.

Por último, comparamos el patrón de expresión observado con las líneas *promAtERF112::GUS* con las predicciones reportadas para la expresión del gen en las bases de datos disponibles públicamente. Los datos resultaron concordantes ya que se observa que el gen *AtERF112* presenta baja expresión durante todo el ciclo de vida de la planta, expresándose en raíces, cotiledones, sépalos y en semillas (Figura 5.4 H, BAR).

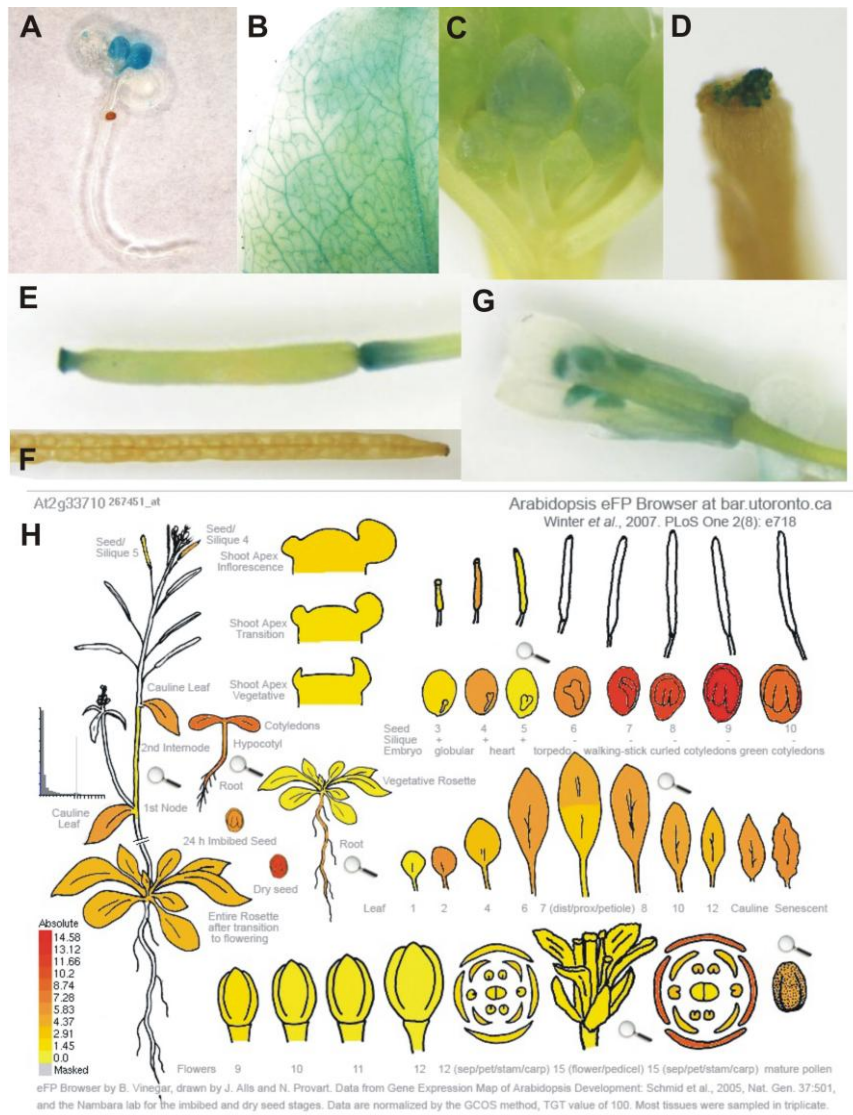


Figura 5.4: Patrón de expresión espacial del *promAtERF112::GUS*.

Se utilizó una región promotora de *AtERF112* de 250 pb para dirigir la expresión de GUS en plantas transgénicas. **A:** plántula de 5 días. **B:** hoja de roseta y **C:** capullo de planta de 5 semanas; **D, E y F:** silicuas de planta de 6 semanas; **G:** flor; **H:** Análisis *in silico* de la expresión de *AtERF112* en el ciclo de vida de la planta. Información extraída de la base de datos BAR.

5.5 Genes que se co-expresan con *AtERF112*

Los análisis de co-expresión permiten identificar genes que participan en las mismas vías regulatorias o metabólicas, o bien, que son co-regulados. Por ello, utilizando la herramienta de co-expresión provista por Geneinvestigator se identificaron genes que se co-expresan positiva o negativamente con *AtERF112* en condiciones de estrés. Dentro de los genes que se co-expresan positivamente, se encuentra *ZAT11* (*At2g37430*), un FT dedos de Zn que regula negativamente la tolerancia a iones Ni y es altamente inducido por H₂O₂ en

procesos de muerte celular programada (Liu y col., 2014); *PP2C2* (*At1g07160*), que pertenece a la familia de las proteínofosfatasa 2C, que están involucradas en la regulación de varias vías de señalización (Schweighofer y col., 2004); *At3g26910* que codifica para una glicoproteína rica en hidroxiprolina; *PER4* (*At1g14540*) una peroxidasa aniónica básica regulada por la longitud del día, con un importante rol en la lignificación de las paredes celulares (Fernández-Pérez y col., 2015), varios genes que codifican para proteinquinasas y dos FT WRKY (Tabla 5.2).

Co-expresión positiva		
Gen	Score	Descripción
At1g07160	0.71	Proteína de la familia de proteínofosfatasa 2C (PP2C)
At2g37430	0.70	ZAT11, proteína de la superfamilia tipo dedos de Zinc C2H2 y C2HC
At5g37490	0.69	Proteína de la superfamilia con repeticiones ARM
At5g65600	0.68	Proteína de la familia de proteínquinasas tipo lectina-Concanavalina A
At3g02800	0.68	AtPFA-DSP3 (<i>Plant and Fungi atypical dual-specificity phosphatase 3</i>) Codifica para una fosfatasa atípica de especificidad dual.
At3g26910	0.68	Proteína de la familia de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina
At1g14540	0.67	PER4, Proteína de la superfamilia de peroxidasa
At1g76070	0.67	Proteína de función desconocida
At2g32030	0.67	Proteína de la superfamilia Acil-CoA N-aciltransferasa (NAT)
At3g25250	0.67	AtOXI1 (<i>Oxidative Signal-Inducible1</i>) o AGC2 (<i>Arabidopsis</i> proteinquina)
At1g30370	0.67	Acilhidrolasa tipo DAD1. Codifica para una fosfolipasa A1 que participa en la viabilidad de la semilla
At2g15480	0.66	UDP-glucosil transferasa 73B5 (UGT73B5)
At2g23270	0.66	Proteína de función desconocida
At1g61560	0.66	Proteína de la familia de proteínas con siete dominios transmembrana específicas de plantas, homólogas a las codificadas en arroz en el locus <i>mildew resistance locus</i> o proteína (MLO).
At2g15490	0.65	UDP-glucosil transferasa 73B4 (UGT73B4)
At5g64905	0.65	Precursor de péptido elicitador 3 (PROPEP3)
At1g62300	0.64	WRKY6, regula la expresión de <i>Phosphate1</i> (Pho1) en respuesta a estrés por bajo fosfato inorgánico (Pi)
At5g64890	0.64	Precursor de péptido elicitador 2 (PROPEP2)
At4g21390	0.64	B120, proteína serina/treonina quinasa
At5g41100	0.64	Proteína de función desconocida
At5g24110	0.63	Proteína de la familia de FT WRKY

At4g28460	0.63	Proteína de función desconocida
At5g38310	0.63	Proteína de función desconocida
At5g41680	0.63	Proteína de la superfamilia de proteinquinasas
At1g79680	0.63	Codifica una molécula señal con dominio doble, quinasa-GC, que podría funcionar en respuestas a estrés biótico que es dependiente de cGMP

Tabla 5.2: Genes que se co-expresan positivamente con AtERF112.

Tabla construida a partir de datos suministrados por el software GENEVESTIGATOR (© NEBION / ETH Zurich, 2008), utilizando la herramienta para analizar la co-expresión positiva de genes durante diferentes perturbaciones. Los datos incluidos corresponden a Octubre de 2016.

Entre los genes co-expresados negativamente se encuentra: *ASPG1* (*At3g18490*) que codifica para una proteína aspartil-proteasa implicada en la respuesta a sequía (Yao y col., 2012); *At2g16800* que codifica para una proteína de transporte de níquel de alta afinidad; *At5g48730* que codifica para una proteína pentatricopéptido cuya mutante es hipersensible a ABA (Yan y col., 2006); CIA2 es un FT que está involucrada en el importe de proteínas al cloroplasto (Sun y col., 2009) e *ISA1* que codifica para una isoamilasa tipo desramificante, enzima que participa en la biosíntesis del almidón (Facon y col., 2013) (Tabla 5.3).

Co-expresión negativa		
Gen	Score	Descripción
At2g16800	-0.5	Proteína de la familia de proteínas transportadoras de alta afinidad a níquel
At2g04280	-0.48	Proteína de función desconocida
At3g18490	-0.47	ASPG1
At2g26730	-0.46	Proteína de la familia de proteinquinasas con repeticiones ricas en leucina
At4g34980	-0.45	Serinproteasa similar a subtilisina
At5g48730	-0.45	Proteína de la superfamilia de proteínas con repeticiones de Pentatricopéptidos
At1g26650	-0.45	Proteína de función desconocida
At3g14860	-0.45	Proteína que contiene el dominio NHL
At3g51950	-0.44	Proteína tipo dedos de zinc C2H2
At1g75420	-0.44	Proteína de la superfamilia UDP-Glicosiltransferasa
At2g05920	-0.43	Proteína de la familia de las Subtilasas
At5g57930	-0.43	APO2 (<i>accumulation of photosystem one 2</i>)
At1g60800	-0.43	Quinasa 3 que interactúa con NSP (NIK3)
At2g28310	-0.43	Proteína de función desconocida

At5g07900	-0.43	Proteína de la familia de factores de terminación transcripcional mitocondriales
At5g52010	-0.42	Proteína tipo dedos de zinc C2H2
At2g45340	-0.42	Proteína de la familia de proteínquinasas con repeticiones ricas en leucina
At5g57180	-0.42	CIA2 FT involucrado en el importe de proteínas al cloroplasto.
At2g39930	-0.42	ISA1 Codifica para la enzima isoamilasa tipo desramificante. Mutaciones en este gen causan la pérdida de actividad isoamilasa y la disrupción de la estructura normal del almidón. Las mutantes presentan un contenido reducido de almidón y amilopectinas y fitoglicógenos anormales estructuralmente. Se ha postulado que AtISA1 interacciona con AtISA2 para formar el complejo Iso1.
At3g16260	-0.42	tRNasa Z
At1g48230	-0.42	Proteína de la familia de transportadores de azúcar-nucleótidos
At2g41950	-0.42	Proteína de función desconocida
At2g45590	-0.42	Proteína de la superfamilia de proteínquinasas
At2g36240	-0.42	Proteína de la superfamilia de proteínas con repeticiones de Pentatricopéptidos
At5g04060	-0.42	Proteína de la superfamilia de metiltransferasas dependiente de S-adenosil-L-metionina

Tabla 5.3: Genes que se co-expresan negativamente con AtERF112.

Tabla construida a partir de datos suministrados por el software GENEVESTIGATOR (© NEBION / ETH Zurich, 2008), utilizando la herramienta para analizar la co-expresión negativa de genes durante diferentes perturbaciones. Los datos incluidos corresponden a Octubre de 2016.

5.6. Análisis fenotípicos de líneas de Arabidopsis con niveles alterados de AtERF112

5.6.1 Análisis de la ausencia del gen AtERF112

Para obtener líneas con niveles disminuidos de AtERF112 se diseñaron amiARN como se describe en la sección 3.6.20 de Materiales y Métodos.

Luego de la transformación se obtuvieron y seleccionaron más de 40 líneas transformantes independientes, que fueron usadas para cuantificar el nivel de expresión del gen en estudio mediante qPCR. Se identificaron y seleccionaron tres líneas que se denominaron: *amiAtERF112₁*, *amiAtERF112₂* y *amiAtERF112₃* y fueron usadas para su caracterización. Como puede verse en la Figura 5.8 se obtuvieron niveles muy bajos de expresión del transcripto correspondiente a AtERF112 en las líneas seleccionadas. La línea *amiAtERF112₁* mostró un 90% de silenciamiento, la línea *amiAtERF112₂* un 95% de silenciamiento y la línea *amiAtERF112₃* un 81% de silenciamiento. Sin embargo, la caracterización fenotípica de estas líneas, durante el desarrollo en condiciones normales de

crecimiento (Figura 5.9) o ante situaciones de estrés ambiental, no revelaron cambios fenotípicos cuando se las comparó con un control WT (Mengarelli, 2016).

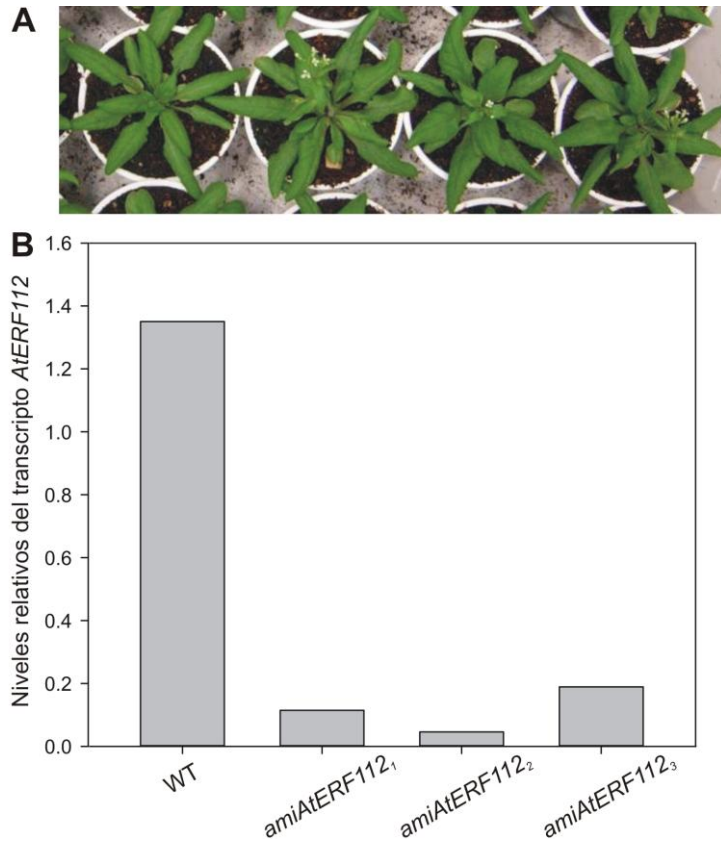


Figura 5.8: Niveles relativos de expresión del gen *AtERF112*.

A: Fenotipo de plantas de las líneas seleccionadas de 4 semanas de edad crecidas en tierra en condiciones normales de luz y temperatura **B:** Niveles de expresión de *AtERF112* medidos por qPCR en las plantas mostradas en **A**.

5.6.2 Análisis de la sobreexpresión del gen *AtERF112*

Al inicio de este trabajo de tesis, el laboratorio contaba con líneas sobreexpresantes del gen *AtERF112* en *Arabidopsis* (*AtERF112_{ox1}*, *AtERF112_{ox2}* y *AtERF112_{ox3}*) por lo que se procedió a la caracterización fenotípica de las mismas.

Como puede observarse en la Figura 5.9 A, las líneas sobreexpresantes presentan alteraciones en su arquitectura. Se observa la formación de un mayor número de hojas e inflorescencias y pérdida de la dominancia apical. Para cuantificar lo observado visualmente, se hizo un recuento del número de inflorescencias que presentaba cada planta a los 41 días de

edad y se observó que las tres líneas sobreexpresantes presentan un número significativamente mayor de inflorescencias que la línea control WT que se desarrollan simultáneamente, originando la pérdida de dominancia apical (Figura 5.9 B).

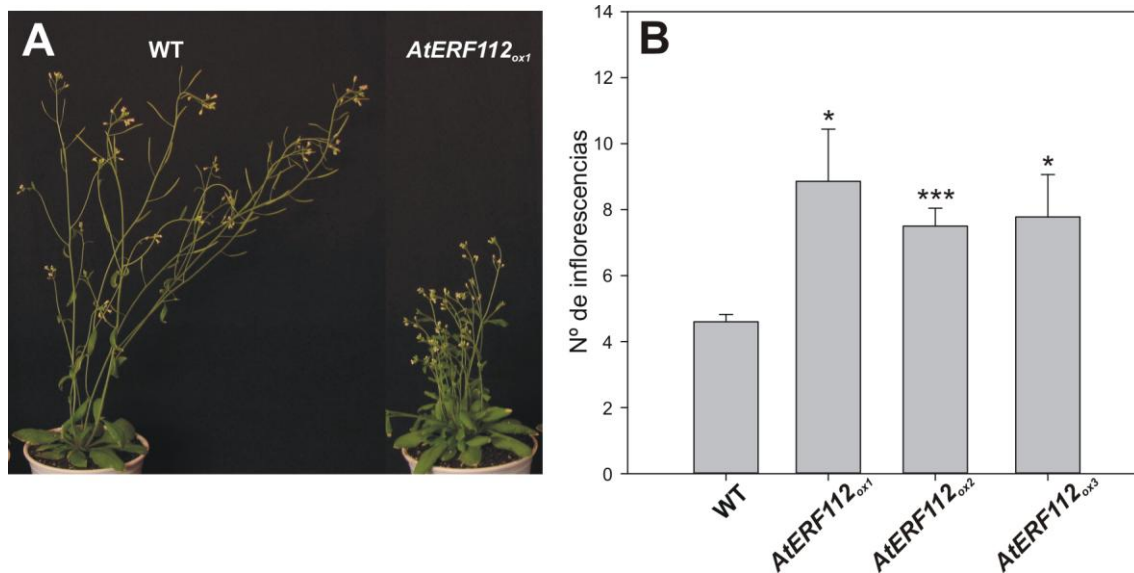


Figura 5.9: Efectos de la sobreexpresión de *AtERF112* en condiciones normales de crecimiento.

A: Se observa la pérdida de dominancia apical en plantas adultas de 41 días de edad de las líneas *AtERF112_{ox1}* y control WT. **B:** Número de inflorescencias totales en plantas de las líneas *AtERF112_{ox}* y WT de 41 días de edad crecidas en condiciones normales. Se expresó como el valor promedio \pm SE de al menos 5 réplicas biológicas. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Microsoft Excel usando el test t de Student, las diferencias estadísticamente significativas $P < 0.05$ se indican con * y $P < 0.001$ se indican con ***.

Además de presentar mayor número de inflorescencias, las líneas sobreexpresantes presentaron silicuas con alteraciones morfológicas por lo que se realizó un análisis semicuantitativo donde se clasificó cada planta en categorías, según si presentaban muchas (>80%), varias (60-80%), algunas (40-60%), pocas (20-40%), ninguna (<20%) silicuas abortadas. Como puede verse en la Figura 5.10, las líneas sobreexpresantes presentan mayor número de frutos abortados que la línea control WT, siendo la línea *AtERF112_{ox3}* la que presenta mayor número de silicuas abortadas. Estos estudios fueron complementados con Mengarelli (2016), donde se monitoreó la formación de las silicuas durante su desarrollo teniendo en cuenta la posición relativa de las silicuas respecto a la primera flor apical, destacándose la presencia de restos de órganos florales en la base de las silicuas de las líneas sobreexpresantes, lo que sugiere defectos en la abscisión de los mismos.

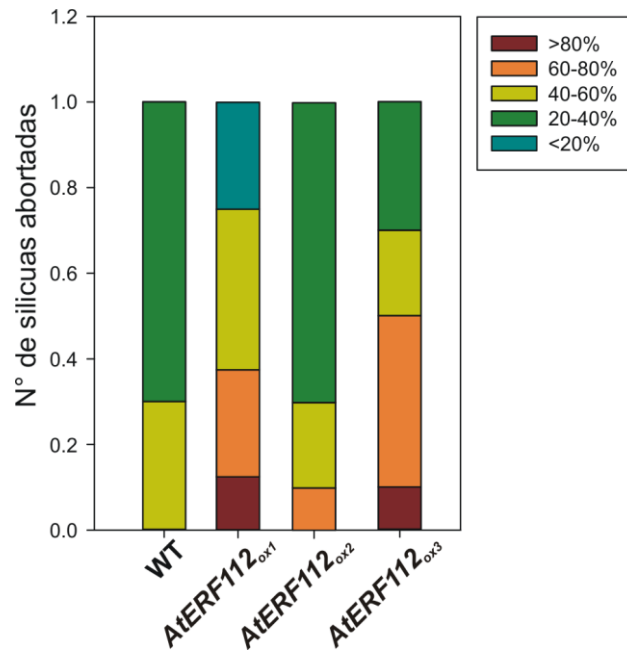


Figura 5.10: Número de silicuas abortadas en líneas de Arabidopsis que sobreexpresan *AtERF112*.

Se determinó semicuantitativamente el número de silicuas normales y silicuas abortadas, en las líneas sobreexpresantes y en la línea control WT de 41 días de edad crecidas en tierra en condiciones normales de luz y temperatura. Se utilizaron las siguientes categorías para la clasificación: muchas (>80%), varias (60-80%), algunas (40-60%), pocas (20-40%), ninguna (<20%) silicuas abortadas.

5.7 Discusión:

En este trabajo de tesis se generaron y seleccionaron líneas silenciadas en el gen *At2g33710* (*AtERF112*) utilizando amiARN las cuales fueron caracterizadas fenotípicamente en el trabajo final de grado del Lic. Diego Mengarelli (2016) del cual fui directora asistente. En cuanto a las líneas sobreexpresantes *AtERF112_{ox}*, que ya estaban disponibles en el laboratorio, se comenzó su caracterización fenotípica durante esta tesis y se completó en el trabajo de tesina del Lic. Mengarelli.

AtERF112 codifica para una proteína de la familia AP2/ERF. Los genes de la familia ERF codifican para una familia de reguladores transcripcionales exclusivos de plantas, que poseen importantes y variadas funciones en la regulación transcripcional de una variedad de procesos biológicos relacionados a crecimiento y desarrollo, así como a respuestas ambientales (Nakano y col., 2006).

Los FT AP2 pueden funcionar como activadores transcripcionales o represores, según presenten o no el motivo conservado EAR (*ethylene-responsive element-binding factors-associated amphillic repression*) (Stockinger y col., 1997; Fujimoto y col., 2000; Ohta y col.,

2001). El gen *AtERF112* no presenta este motivo, y dado que la localización subcelular de la proteína de fusión *AtERF112::GFP* es nuclear, el mismo podría actuar como un activador transcripcional (Figura 5.3).

AtERF112 pertenece al grupo X dentro de la familia ERF. Todos los miembros de este grupo de proteínas ERF de *Arabidopsis*, excepto *AtERF112*, han sido caracterizados funcionalmente y se reportan como FT involucrados en respuestas al estrés. Los más cercanos a *AtERF112*, en cuanto a similitud de secuencia, son las proteínas *AtERF113*, *AtERF114* y *AtERF108*. *AtERF108*, llamado RAP2.6, y *AtERF113*, llamado RAP2.6L, fueron identificados entre los transcritos inducibles por NaCl en microarreglos de plantas transgénicas de *Arabidopsis* que responden a ABA 17 (ABR17). Ambos se expresan en los estadios vegetativos tempranos y durante la floración, aunque varía la magnitud de la expresión. RAP2.6 y RAP2.6L responden a las hormonas del estrés JA, AS, y etileno además de a sal y a sequía. La sobreexpresión de RAP2.6 en *Arabidopsis* resulta en un fenotipo de enanismo con gran número de ramificaciones secundarias y silicuas pequeñas. La sobreexpresión de RAP2.6L mejora el funcionamiento bajo estrés salino y sequía, sin afectar su fenotipo (Krishnaswamy y col., 2011). *AtERF114* (*At5g61890*) llamado *EBE*, es un nuevo regulador transcripcional del crecimiento de células en proliferación y yemas axilares de *Arabidopsis*. Los efectos de *EBE* en la ramificación del tallo resultan de afectar genes involucrados en la regulación del ciclo celular y ruptura de la dormancia (Mehrnia y col., 2013). Las líneas sobreexpresantes de RAP2.6 y de *EBE* reportadas presentan un fenotipo de desarrollo con arquitectura alterada similar al observado para las líneas *AtERF112_{ox}*.

La región promotora de este gen, analizada mediante herramientas bioinformáticas, mostró que posee sitios de unión para FT DOF, WRKY (W-BOX) y MYC, todos ellos factores involucrados en respuestas al estrés. Las proteínas DOF se han asociado a variados roles fisiológicos que incluyen respuestas al estrés (Zhang y col., 1995; Chen y col., 1996; Kang y col., 2003), respuestas a luz (Yanagisawa y Sheen 1998; Yanagisawa 2000; Papi y col., 2002), señalización por fitocromos (Park y col., 2003), respuestas a fitohormonas como auxinas (De Paolis y col., 1996; Kisu y col., 1998) y GA (Washio 2001; Mena y col., 2002) y germinación de las semillas (Papi y col., 2000; Gualberti y col., 2002). La familia de FT WRKY son los FT más frecuentemente inducidos bajo condiciones de estrés, particularmente durante el estrés biótico (Kalde y col. 2003; Eulgem y col. 2000; Dong y col. 2003).

El patrón de expresión tejido-específico de la proteína *AtERF112* es en cotiledones (Figura 5.4 A), hidátodos (Figura 5.4 A), venas (Figura 5.4 B), capullos (Figura 5.4 C), anteras, estigma (Figura 5.4 D) y polen (Figura 5.4 E y G). Las líneas generadas con un promotor de 1086

pb (Mengarelli, 2016) mostraron, al igual que el promotor de 250 pb, expresión en flores (carpelos y polen), en el tejido vascular de plántulas y hojas. Adicionalmente, estas líneas mostraron expresión en hojas caulinas, hipocótilo, raíces, tricomas, en la base de las silicuas y en los haces vasculares que conectan las semillas dentro de las silicuas; tejidos y órganos en los que no se había detectado expresión con el promotor corto. Estos resultados indican que el promotor corto fue informativo sólo parcialmente y su expresión se superpone con los datos obtenidos con el fragmento más largo. Adicionalmente, los datos de expresión obtenidos coinciden con el patrón de expresión predicho *in silico* para *AtERF112* (Figura 5.4, BAR). La expresión de *AtERF112* es ampliamente detectada en diferentes tejidos de la planta, por lo que este gen podría ejercer su rol en distintos órganos de la planta afectando la función de fitohormonas u otras señales de larga distancia no identificadas. Para evaluar esta hipótesis e investigar su rol en el crecimiento y desarrollo de la planta, se observaron los efectos de silenciar y sobreexpresar este gen en Arabidopsis. Las líneas sobreexpresantes presentaron cambios morfológicos tales como aumento de la producción de ramificaciones, aumento del número de hojas y de inflorescencias (Figura 5.9 y 5.10), fenotipo menos erguido, disminución de la dominancia apical y mayor número de frutos abortados (Figura 5.11). Esta desorganización del tallo central indica que podría haber una perturbación en el balance y señalización de fitohormonas ante la sobreexpresión de *AtERF112*. En cambio, las líneas silenciadas no presentaron alteraciones de fenotipo respecto a los controles en condiciones normales ni en condiciones de estrés. Una causa posible de la no observación de un fenotipo diferencial es que puede existir redundancia funcional entre *AtERF112* y otros miembros de la familia ERF, ya que muchos de ellos responden a los mismos estímulos y pueden unirse a los mismos elementos regulatorios (por ejemplo la caja GCC), activando o reprimiendo conjuntos similares de genes.

Se analizó el comportamiento de las líneas *AtERF112* en distintas condiciones de estrés abiótico. Con el único tratamiento que se observaron diferencias de comportamiento entre las líneas fue cuando se aplicó estrés hídrico por falta de riego a plantas de 21 días de edad. Durante y luego del tratamiento se hizo un seguimiento fenotípico y se determinó la liberación de electrolitos para analizar la respuesta al estrés aplicado. Las líneas *AtERF112_{ox}* fueron más susceptibles a la suspensión del riego (Figura 5.13 A y B) y liberaron mayor número de electrolitos a los 9, 11 y 14 días de aplicado el tratamiento, indicando un posible daño de membrana durante la aplicación del estrés. Para evaluar si el fenotipo observado es reversible, luego de 20 días de privación de agua se las regó normalmente y se cuantificó la cantidad de plantas recuperadas. Como se muestra en la Figura 5.12 C las líneas *AtERF112_{ox}* no pudieron

recuperarse, con un porcentaje de mortandad mayor al 70%, en cambio las líneas silenciadas y control WT se recuperaron exitosamente. Adicionalmente, el análisis de la epidermis de las líneas sobreexpresantes, mostró que las mismas presentaron mayor número de estomas que permanecen abiertos durante el estrés hídrico.

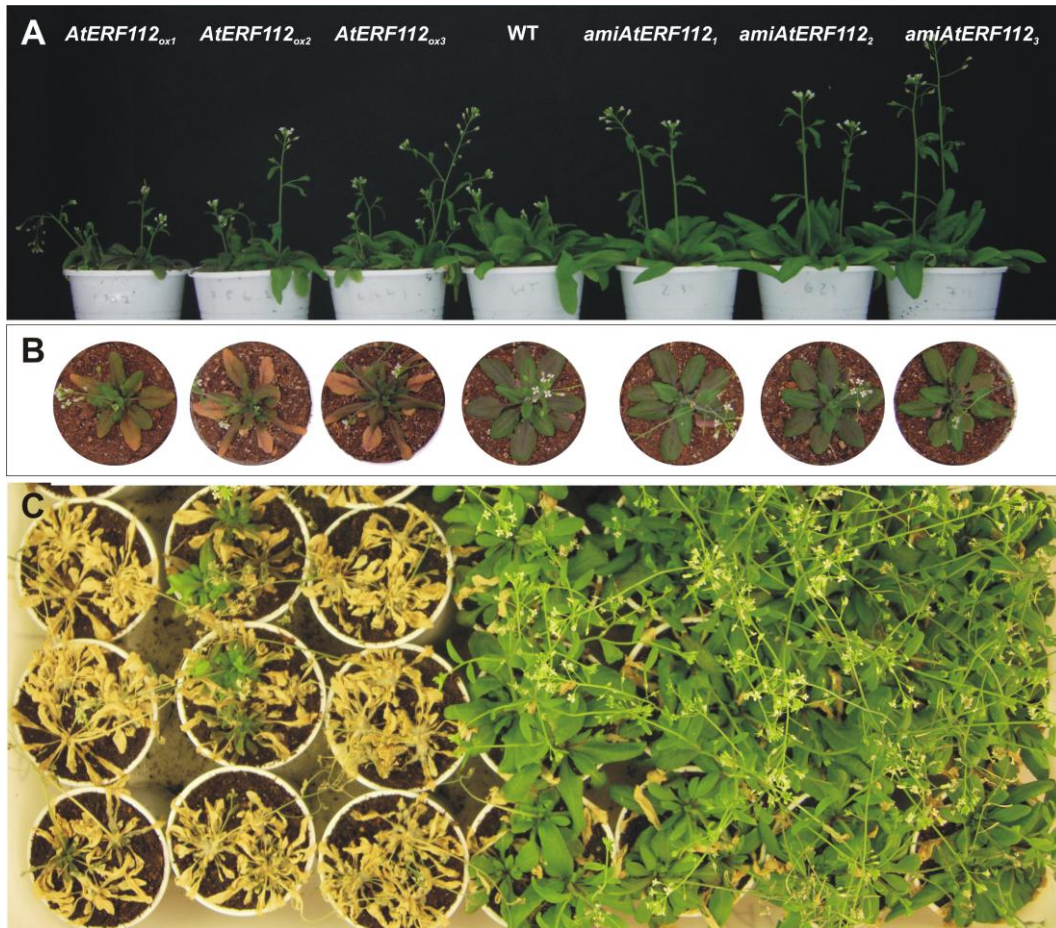


Figura 5.11: Tratamiento de estrés hídrico aplicado a las líneas *AtERF112*.

A: Fenotipo de las plantas sometidas a 12 días de falta de riego (vista lateral). **B:** Fenotipo de las plantas sometidas a 15 días de falta de riego (vista superior). **C:** Recuperación luego de tres días de riego normal. Adaptado de Mengarelli, 2016.

Debido a que el estrés hídrico está relacionado con la acción de la hormona ABA y además dicha hormona es importante en la dormancia de las yemas axilares se crecieron plántulas en medios controles y suplementados con ABA, glucosa, manitol y NaCl para determinar si las líneas presentan una susceptibilidad alterada en alguna de estas condiciones. Se observaron diferencias en el desarrollo de las raíces así como en las partes aéreas en las líneas *AtERF112_{ox}*. Específicamente, dichas líneas presentaron una inhibición del crecimiento de sus raíces (Figura 5.13 A, B, C, D y E), siendo esta reducción estadísticamente significativa

(Figura 5.13 B, C, D y E, prueba t, $P < 0,05$) y no observándose diferencias en los tamaños de las raíces de las líneas silenciadas con respecto al control (resultado no mostrado). Además, y particularmente en medios suplementados con NaCl y manitol, las líneas *AtERF112_{ox}* presentaron signos de clorosis. Estos resultados indican que las líneas *AtERF112_{ox}* son sensibles a tratamientos con ABA, osmóticos y salinos.

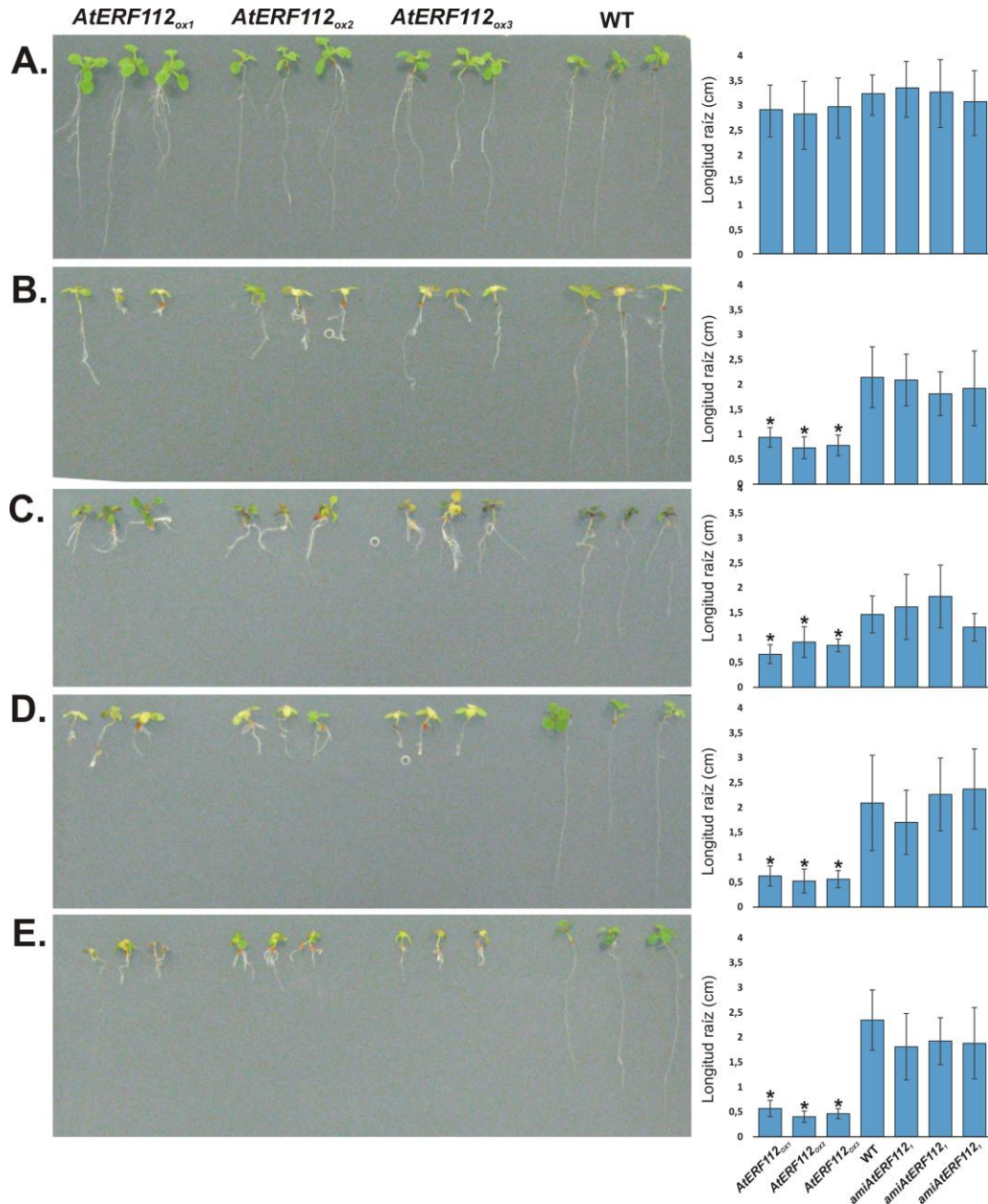


Figura 5.12: Aplicación de diversos estreses a plántulas de las líneas *AtERF112*.

Plántulas germinadas de 3 días de edad fueron transferidas a medios **A:** control, **B:** ABA 1 μ M, **C:** glucosa 4% p/v, **D:** NaCl 50 mM, **E:** manitol 100 mM. La cuantificación de la longitud de las raíces se realizó a los 10 días de tratamiento. *Adaptado de Mengarelli, 2016.*

En síntesis, las líneas *AtERF112_{ox}* resultaron sensibles al estrés por deficiencia de agua, estrés salino, osmótico y aplicación exógena de ABA y glucosa (Figura 5.13).

Analizando los genes que se co-expresan con *AtERF112* en diferentes condiciones, se observó que hay varios genes relacionados con estrés. Entre ellos están PP2C que es una proteína fosfatasa requerida para la señalización de ABA (Brock y col, 2010), PER4 una peroxidasa involucrada en la lignificación de paredes celulares (Fernández-Pérez y col, 2014) y una aspartil-proteasa implicada en la respuesta a sequía (Yao y col, 2012), entre otros.

En base a estos resultados, se propone que *AtERF112* participa en procesos relacionados a ABA. Las líneas sobreexpresantes muestran un fenotipo asociado a carencia de ABA lo cual puede ser el resultado de la disminución de su síntesis, del aumento de su degradación o de insensibilidad a esta hormona. Esto explicaría la sensibilidad a sequía por falta de cierre estomático durante el estrés hídrico, la falta de abscisión de los órganos florales en las silicuas y la alteración en la arquitectura de la planta por producción exacerbada de tallos e inflorescencias. *AtERF112* podría actuar en una o varias vías de transducción de señales afectando la respuesta al estrés, modificando alguna vía de señalización que interviene en la sensibilidad de la respuesta a ABA (Mengarelli, 2016).

Capítulo III:

**FITNESS, una proteína con dominio
CCT que provoca la desregulación de
ERO en Arabidopsis**

6. CAPITULO III: FITNESS, UNA PROTEÍNA CON DOMINIO CCT QUE PROVOCA LA DESREGULACIÓN DE ERO EN ARABIDOPSIS

6.1 Introducción

En las plantas, las principales fuentes de ERO se relacionan con los procesos de fotosíntesis y fotorrespiración que tienen lugar en cloroplastos y peroxisomas, respectivamente. Para lidiar con la condición oxidativa, las plantas desencadenan la expresión temprana de distintos conjuntos de genes involucrados en las vías de señalización antioxidantes y en la regulación transcripcional (Baxter y col., 2013). Se sabe que la duración del día influye en la generación de ERO (Michelet y Krieger-Liszkay, 2012) y es un determinante crítico de la respuesta al estrés oxidativo (Queval y col., 2007). Investigaciones previas (Scarpeci y col., 2008) han mostrado que existe una respuesta rápida de las hojas de *Arabidopsis* a ERO generadas en cloroplastos, que incluye la activación de genes involucrados en respuestas a estrés abiótico y la represión de pocos genes que, en su mayoría, codifican para proteínas de función desconocida. Dentro de este último grupo se encuentra el gen *At1g07050*, cuyos niveles de expresión disminuyen 5,56 veces en condiciones de estrés oxidativo generado por MV (Scarpeci y col., 2008). *At1g07050* codifica para una proteína que presenta una región conservada de 44 AA llamada dominio CCT (CONTANS [CO], CONSTANS LIKE [COL], y TIMING OF CHLOROPHYL AB EXPRESSION1 [TOC1]), similar al dominio presente en la proteína de arroz Hd1, que es un homólogo de CO de *Arabidopsis*, la cual está involucrada en la sensibilidad al fotoperíodo (Yano y col., 2000).

En *Arabidopsis* el FT CO promueve la floración en condiciones de día largo (Putterill y col., 1995), y en arroz controla la represión de la floración por activación de VERNALIZATION2 (Mulki y von Korff, 2016). CO posee regulación circadiana y su degradación es inducida por la luz. CO pertenece a la familia de proteínas llamada COL, que poseen característicamente el dominio CCT en el extremo C-terminal y además, presentan una región tipo dedos de zinc, que se asemeja a un dominio tipo caja B en el extremo N-terminal, que regula interacciones proteína-proteína. A diferencia de los genes *COL*, que poseen dominios adicionales al CCT, existen algunos que poseen solamente el dominio CCT, entre los cuales está *At1g07050* y en investigaciones recientes, dichos genes se agruparon en una familia denominada *CCT MOTIF FAMILY (CMF)* (Cockram y col., 2012). Estos genes están presentes tanto en plantas mono como dicotiledóneas y en *Arabidopsis* específicamente incluye 15 miembros. Se sabe que el dominio CCT puede unirse directamente al ADN, y las proteínas con dominio CCT actúan como FT (Tiwari y col., 2010; Gendron y col., 2012). Los genes que codifican para las proteínas con

dominio CCT han sido implicadas en procesos como floración fotoperiódica (Puterill y col., 1995), señalización mediada por luz (Kaczorowski y col., 2003) y regulación de ritmos circadianos (Strayer y col., 2000). Sin embargo, a pesar del progreso significativo de los últimos años, la función de la gran mayoría de los genes definidos como *CMF* sigue siendo enigmática (Cockram y col., 2012).

Este capítulo describe los estudios realizados para dilucidar el rol de la proteína de función desconocida de *Arabidopsis* codificada por el gen *At1g07050*, que llamamos FITNESS. Para ello se modificaron los niveles de expresión del gen *in planta* empleando técnicas de genética reversa, luego se caracterizaron las líneas obtenidas teniendo en cuenta aspectos morfológicos, bioquímicos y fisiológicos a lo largo del ciclo de vida de las plantas y por último se analizaron los efectos de la aplicación de estrés abiótico en la fisiología de las plantas modificadas genéticamente.

6.1 FITNESS pertenece a una familia de genes no caracterizados que poseen un único dominio CCT (CMF)

FITNESS (*At1g07050*) codifica para una proteína de 195 AA (MM 23.3 kDa) y pI 4.7, con un único dominio CCT localizado entre los residuos de Arg-151 y Glu-194 y pertenece a la familia CMF, donde ha sido clasificado como AtCMF3 (Cockram y col., 2012). El dominio CCT presente en *FITNESS* es de 44 AA y contiene una señal de localización nuclear putativa dentro de su segunda mitad (Figura 6.1 A). En *Arabidopsis*, el homólogo más cercano a *FITNESS* es la proteína AtCMF11 (*At5g14370*) que tiene 339 AA y comparte un 49% de AA idénticos. *FITNESS* y AtCMF7 (*At2g46670*), de 139 AA de longitud, son los miembros más pequeños de las proteínas CMF de *Arabidopsis* (Figura 6.1 B). En arroz el homólogo más cercano es Os02g0731700, con el que comparte el 42% de AA idénticos, la mayoría dentro del dominio CCT. Hasta el momento el único miembro de esta familia cuya función ha sido reportada es AtCMF14 (*At1g57180*) también llamado CIA2, que actúa como FT. CIA2 aumenta la expresión de dos genes del translocón de cloroplastos, *TOC33* y *TOC75* específicamente en hojas, y también aumenta la expresión de genes que codifican proteínas ribosómicas del cloroplasto que conducen de manera conjunta la síntesis y el importe de proteínas a los cloroplastos de las hojas (Sun y col., 2009).

Los análisis computacionales realizados con WoLF PSORT (Horton y col., 2007), para predecir la localización subcelular potencial de *FITNESS*, anticipan localización nuclear. Para validar esta predicción *in vivo*, se analizó la localización subcelular de *FITNESS* mediante expresión estable en *Arabidopsis* usando la proteína GFP como marcador, bajo el control del

promotor 35S CaMV. En la Figura 6.1 C se observa que la proteína de fusión FITNESS::GFP se acumula predominantemente en el compartimento nuclear de las células, mientras que la proteína GFP libre se localiza en citoplasma y núcleo (Haseloff y col., 1999). Análisis bioinformáticos de la secuencia aminoacídica de FITNESS muestran una probable señal de localización nuclear monopartita clase 2 en las posiciones aminoacídicas 169-172 (KK 150 IR) y 182 - 185 (KRPR) que se asemeja a la secuencia consenso K(K/R)X(K/R) (Kosugi y col., 2009). Adicionalmente, FITNESS contiene un probable sitio de sumoilación en el residuo Lys-192 (RFKGRFVKRET, Figura 6.1 A). Los motivos de sumoilación (Ψ KXE, donde Ψ generalmente es un aminoácido hidrofóbico grande y X es cualquier residuo, Zhao y col., 2014) han sido implicados en direccionar proteínas a estructuras nucleares específicas y estabilizarlas.

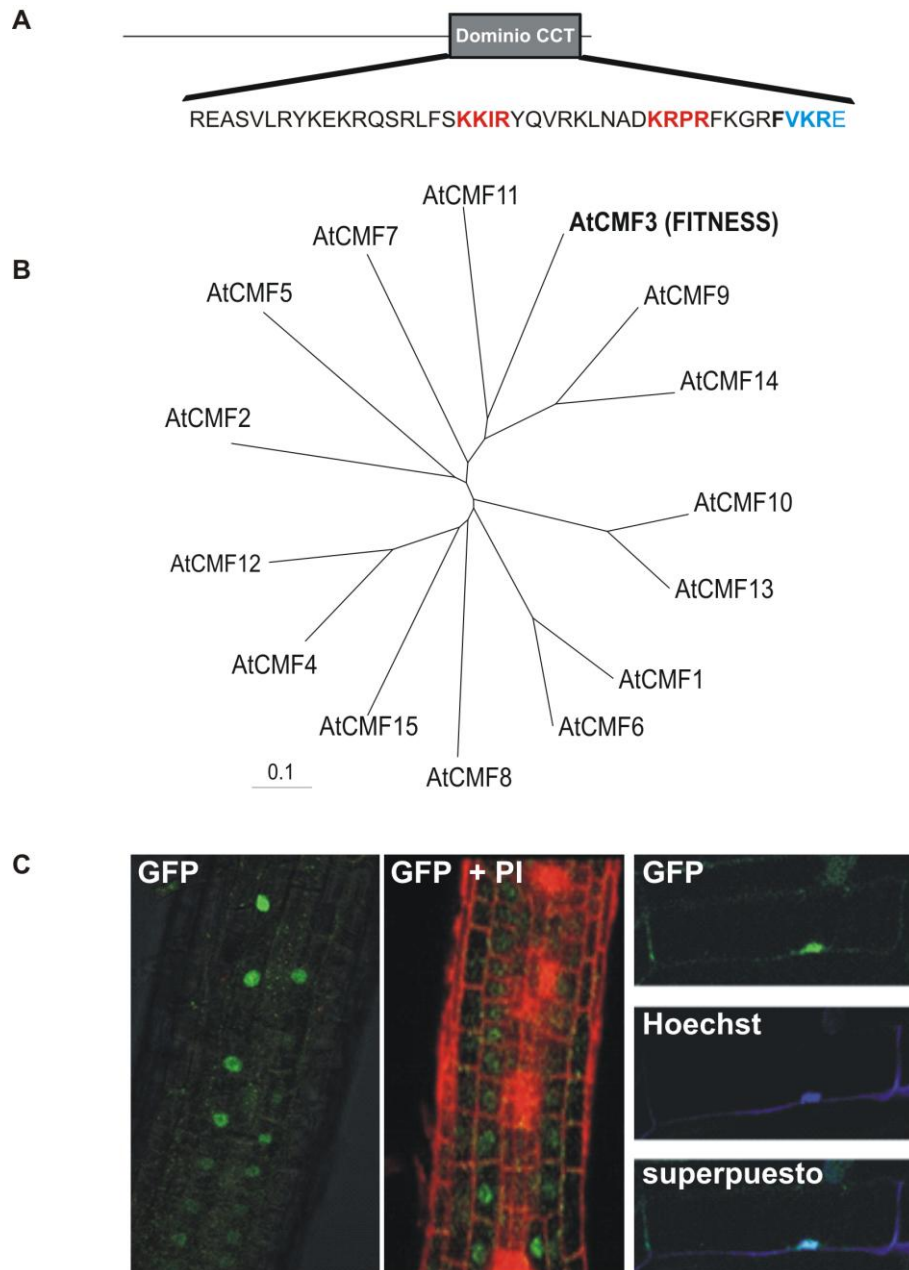


Figura 6.1: Análisis génico y localización subcelular de *FITNESS/At1g07050*.

A: Vista esquemática del gen *FITNESS/At1g07050* que muestra la posición y los AA del dominio CCT. En rojo se muestran dos probables secuencias de localización nuclear y en azul un probable dominio de sumoilación. **B:** Árbol filogenético de las proteínas CMF de Arabidopsis realizado según se describe en la sección 3.20 de Materiales y Métodos. **C:** Localización subcelular de la proteína *FITNESS*. La construcción 35S::FITNESS-GFP fue expresada en Arabidopsis usando transformación estable de plantas. La sublocalización celular de la expresión de GFP fue monitoreada por microscopía confocal en raíces transformadas. La proteína de fusión *FITNESS*-GFP se localizó exclusivamente en el núcleo (panel izquierdo), la fluorescencia roja de PI de la pared celular se monitoreó en forma separada (panel medio). Para confirmar la localización nuclear se empleó el colorante HOECHST, de fluorescencia azul, que fue superpuesto con la fluorescencia de *FITNESS*-GFP (panel derecho).

6.3 Análisis de la región promotora de *FITNESS* y de su patrón de expresión en *Arabidopsis*

6.3.1 Estudios predictivos de elementos regulatorios

El análisis de la secuencia regulatoria del gen *FITNESS* se realizó utilizando el software PLACE (Higo y col., 1999). La secuencia promotora putativa seleccionada y analizada fue la región más larga (~383 pb) antes del inicio del siguiente gen. En dicha región se identificaron elementos regulatorios relacionados con estrés abiótico, como los motivos MYB (CAACCA), *DOF core element* (TAAAG) y algunos sitios para FT de la familia WRKY (Tabla 6.1).

Elemento <i>cis</i> putativo	Cantidad de repeticiones	Secuencia 5' → 3'
DOF	9	AAAG
MYB (1AT)	2	WAACCA
MYB	2	CNGTTR
WRKY (71OS)	2	TGAC
MYB (2AT)	1	TAACCTG

Tabla 6.1: Elementos regulatorios en *promFITNESS* predichos utilizando el software PLACE

6.3.2 Patrón de expresión tejido-específico del gen *FITNESS*

Para monitorear el patrón de expresión del gen *FITNESS* se generaron líneas de *Arabidopsis* transgénicas que contienen la fusión transcripcional del gen marcador GUS bajo el control de la secuencia promotora de *FITNESS* localizada corriente arriba del marco abierto de lectura (llamada *promFITNESS::GUS*). Al igual que en el análisis bioinformático, la secuencia promotora putativa seleccionada fue la región más larga (~383 pb) antes del inicio del gen siguiente considerando que dicha región es informativa para monitorear la expresión de *FITNESS in planta*.

Más de 15 líneas transformantes independientes *promFITNESS::GUS* se seleccionaron y analizaron para actividad GUS. La expresión de *FITNESS* fue muy alta en cotiledones (Figura 6.2 A) y más baja en hojas jóvenes (Figura 6.2 B). En hojas completamente expandidas presentó la menor expresión (Figura 6.2, C y D). Las regiones vasculares de las hojas no mostraron expresión, como así tampoco se observó expresión en la raíz en ningún momento del desarrollo (Figura 6.2, A-D). En hojas de plantas adultas la expresión de *FITNESS* fue débil, mostrando ausencia de expresión hacia la punta. También se detectó expresión de *FITNESS* en los sépalos de las flores (Figura 6.2 E) pero no así en silicuas (Figura 6.2 F).

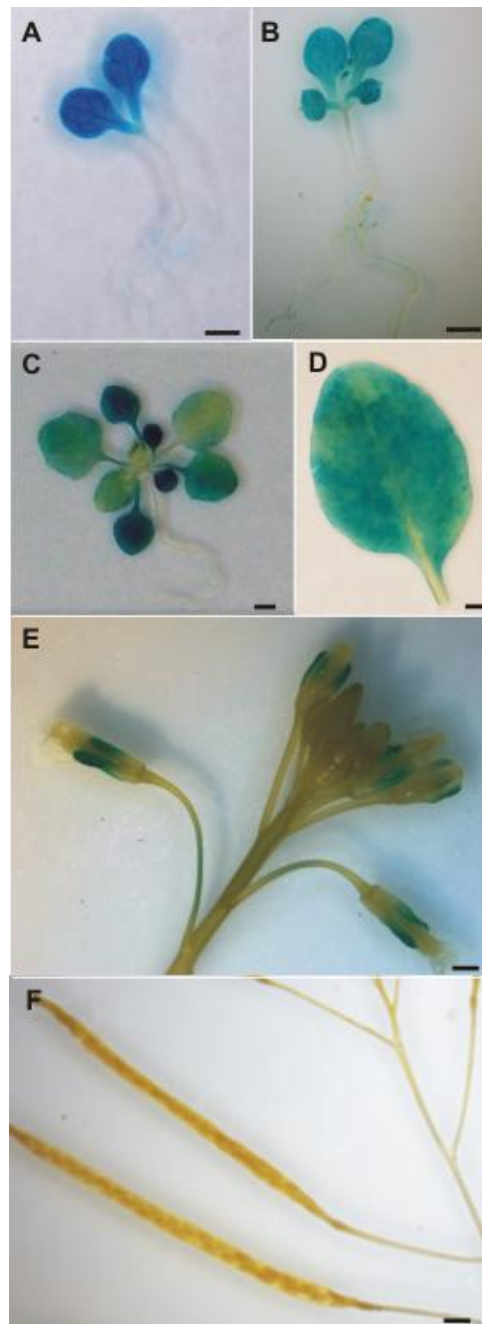


Figura 6.2: Patrón de expresión espacial de *promFITNESS::GUS*.

Se utilizó la región promotora de *FITNESS* para dirigir la expresión de GUS en plantas transgénicas de *Arabidopsis*. **A:** plántula de 5 días. **B:** plántula de 9 días. **C:** plántula de 2 semanas. **D:** hoja de roseta de planta de 4 semanas. **E:** flor de planta de 5 semanas. **F:** silicuas de planta de 7 semanas. Escalas= 1 mm (A y B); 2 mm (C, D, E y F).

6.3.3 Expresión del gen *FITNESS* en diferentes condiciones de estrés abiótico

La expresión de *FITNESS* se evaluó en diferentes condiciones de estrés abiótico haciendo un análisis cualitativo de la expresión GUS en las líneas *promFITNESS::GUS* luego de someterlas a distintas condiciones de estrés. En la Tabla 6.2 se resumen los resultados obtenidos. En todos los casos la expresión GUS fue reprimida luego de someter las plantas a los diferentes estreses abióticos. En la Figura 6.3 se muestra como ejemplo las imágenes obtenidas para el tratamiento realizado con MV 50 μ M durante 2 h.

Estrés aplicado	Tiempo de incubación	FITNESS
NaCl 200mM	24h	Represión
Manitol 400mM	24h	Represión
MV 50 μ M	24h	Represión
4°C	2h	Represión
19°C	2h	Represión
37°C	2h	Represión
H ₂ O ₂ 10mM	2h	Represión
Desecación	1,5h	Represión

Tabla 6.2: Análisis de la expresión del *promFITNESS::GUS* luego de la aplicación de distintos estreses abióticos.

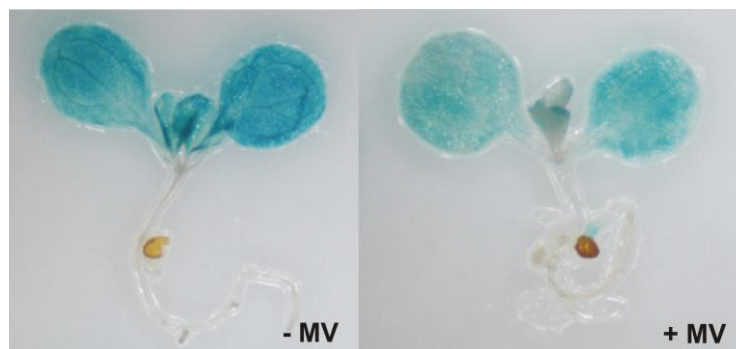


Figura 6.3: Análisis de la expresión del *promFITNESS::GUS* en estrés oxidativo.

A la derecha se observa una plántula representativa de *Arabidopsis* de 10 días de edad crecida en condición control (MS 0,5X sin agregado de MV) y a la izquierda luego de 2h de aplicado un tratamiento de MV 50 μ M en MS 0,5X.

6.4 Efectos fenotípicos de la expresión alterada de *FITNESS* en líneas de *Arabidopsis*

6.4.1. Selección de la línea mutante *fitness*

Se emplearon plantas *knock-out* homocigotas (*fitness*) para todos los análisis, las cuales se seleccionaron a partir de la línea mutante SALK_140249 que tiene un inserto de ADN-T y estaba disponible en la colección presente en el ABRC.

Para seleccionar la línea mutante homocigota para el gen *FITNESS* se empleó la técnica de PCR. Se diseñaron cebadores que permitieron la amplificación del gen completo (*FITNESS* fw y *FITNESS* rev), un cebador RP (que hibrida cercano al lugar de inserción del ADN-T) y un cebador LB (que hibrida en la región izquierda del ADN-T). De esta manera se espera obtener, para una línea mutante homocigota: ninguna amplificación para el gen endógeno y amplificación para el par de cebadores RP/LB. Se utilizó ADNg y ADNc de plantas control WT como control de amplificación. Los tamaños esperados de amplificación son: gen *FITNESS* 833 pb, gen *pp2a* (control positivo) 355 pb, ADNc *FITNESS* 588 pb, ADNc *pp2a* 142 pb. El producto amplificado entre los cebadores RP y LB es de 500 pb. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa 1.5% p/v teñidos post-corrída con el colorante Gel Green (Figura 6.4 B panel izquierdo).

Además, se demostró la ausencia del transcripto de *FITNESS* mediante RT-PCR, utilizando ARN obtenido a partir de hojas completamente expandidas de plantas *fitness* homocigotas (Figura 6.4 B panel derecho).

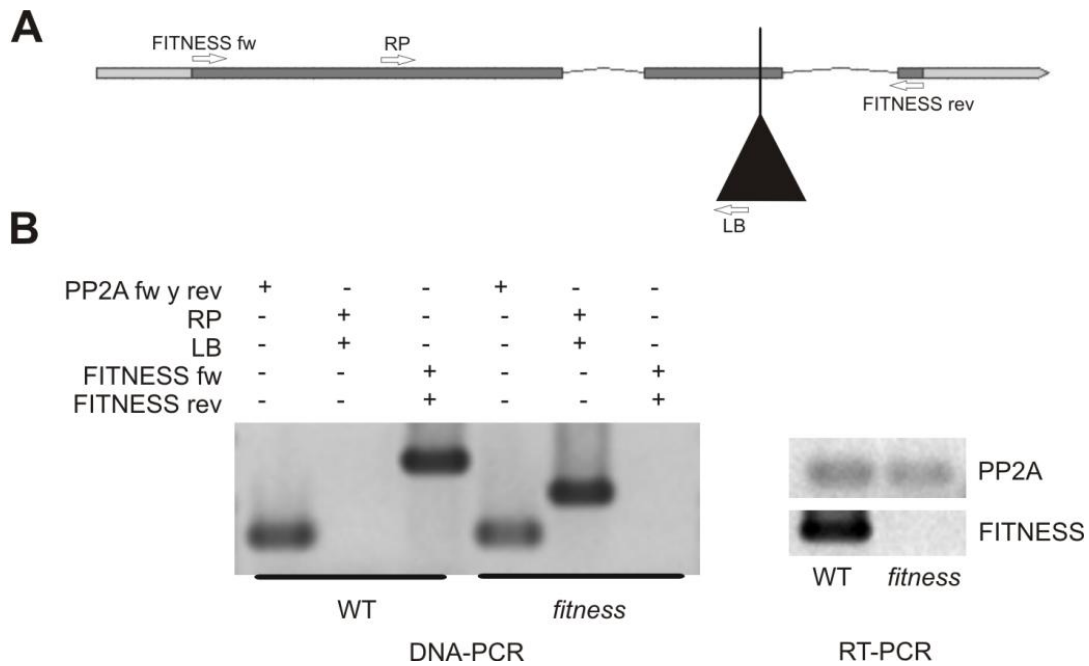


Figura 6.4: Caracterización molecular de la línea mutante *fitness*

A: Representación esquemática de la línea mutante por inserción de ADN-T SALK_140249 y los cebadores utilizados con sus sitios de hibridación. *Adaptado de TAIR.* **B:** A la izquierda se observa la ausencia de amplificación del gen endógeno en la mutante *fitness* y el fragmento amplificado usando los cebadores específico RP/LB. A la derecha, se confirma la ausencia del transcrito *FITNESS* en la mutante aislada mediante RT-PCR.

6.4.2. Selección de líneas sobreexpresantes de *FITNESS*

Se identificaron más de 20 líneas transgénicas independientes de *Arabidopsis* con la construcción *35S::FITNESS*, de las cuales se eligieron tres líneas en la generación T3 para los análisis sucesivos, que se denominaron: *FITNESS_{ox1}*, *FITNESS_{ox2}*, *FITNESS_{ox3}*. En la Figura 6.5 se muestran los niveles de expresión de *FITNESS* cuantificados mediante qPCR, tanto en las líneas seleccionadas sobreexpresantes como en la línea mutante *fitness* comparados con plantas control WT.

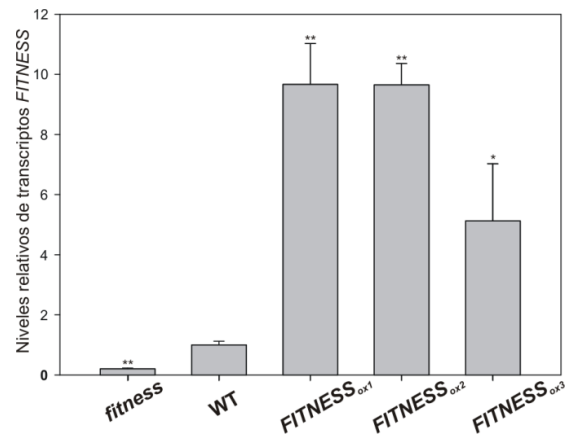


Figura 6.5: Niveles de expresión del transcrita *FITNESS* en las líneas seleccionadas.

Se determinaron los niveles de *FITNESS* expresados como el valor promedio \pm SE de 4 réplicas biológicas. Se realizó qPCR en ADNc sintetizado a partir de ARN total de hojas obtenidas de plantas de 5 semanas crecidas en condiciones normales de luz y temperatura. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Microsoft Excel usando el test t de Student, las diferencias estadísticamente significativas $P < 0.05$ se indican con *, $P < 0.01$ se indican con **.

6.4.3. Análisis fenotípico en condiciones normales de crecimiento

Las líneas sobreexpresantes crecidas en tierra en condiciones de día largo bajo una intensidad de luz de $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ mostraron varias alteraciones morfológicas tales como color verde pálido, tamaño reducido, lesiones espontáneas y hojas redondeadas hiponásticas, es decir con sus bordes curvados hacia arriba (Figura 6.6, A-D).

El fenotipo de la mutante *fitness* fue casi indistinguible de las plantas control WT, aunque en estadios avanzados de desarrollo, sus hojas se vieron ligeramente más estrechas que las plantas control WT debido a una mayor curvatura hacia abajo de sus bordes (Figura 6.6 B).

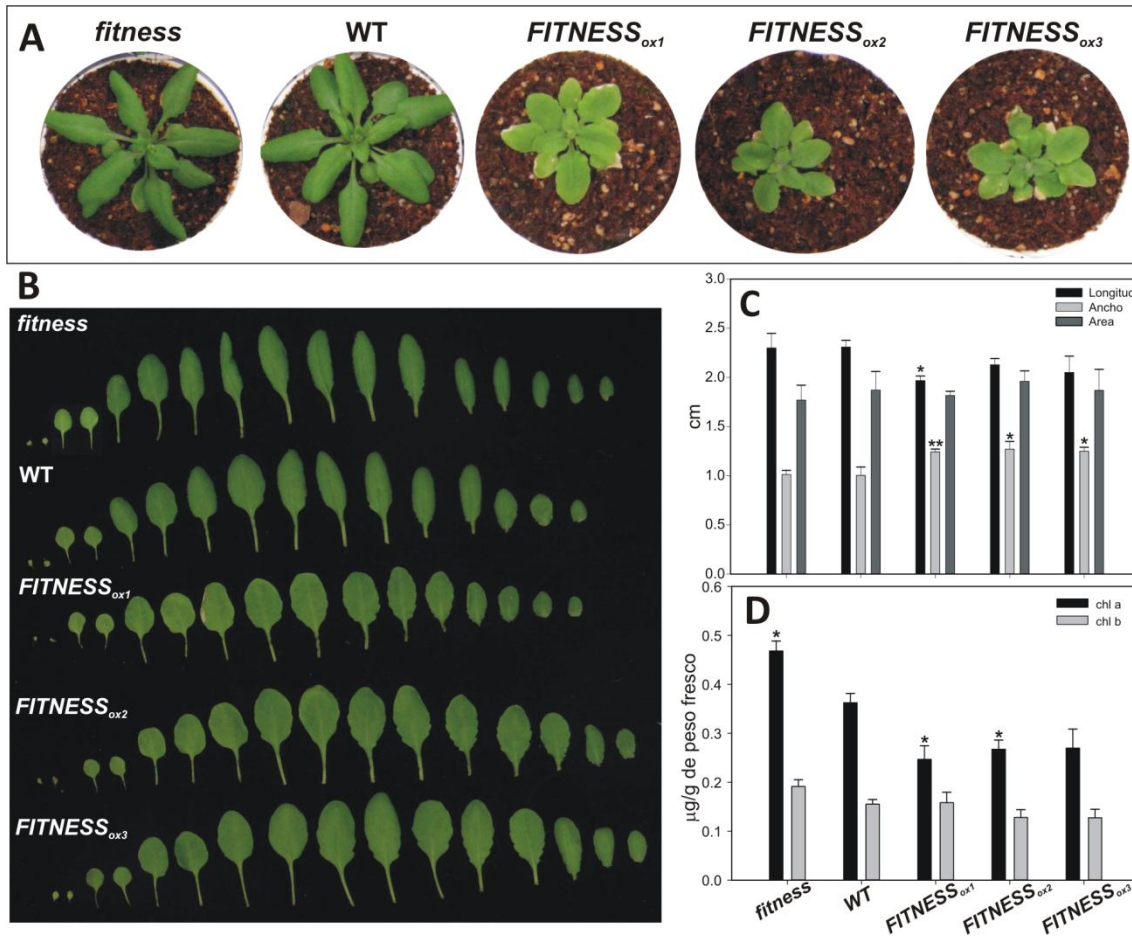


Figura 6.6: Cambios fenotípicos asociados a niveles alterados de expresión de *FITNESS* en *Arabidopsis*.

A: Las líneas *FITNESS_{ox}* desarrollan rosetas más pequeñas que las plantas control y la mutante *fitness*, como puede observarse en plantas representativas de 4 semanas. **B:** Serie de hojas creada por disección de hojas de rosetas de plantas de 4 semanas con arreglo individual. **C:** Medidas de longitud y ancho de la hoja N°7 totalmente expandida. **D:** Niveles de pigmentos (chl a y b) de las líneas *FITNESS* expresados como el valor promedio \pm SE de 4 réplicas biológicas. Se midió en plantas de 5 semanas de edad. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Microsoft Excel usando el test t de Student, las diferencias estadísticamente significativas $P < 0.05$ se indican con *, $P < 0.01$ se indican con **.

Debido a los cambios morfológicos observados en las hojas de las líneas *FITNESS_{ox}*, se analizó el área de las células epidérmicas en estas plantas observándose que en las tres líneas *FITNESS_{ox}* el área de las células epidérmicas es significativamente menor que el de las correspondientes a las líneas control WT y *fitness* (Figura 6.7).

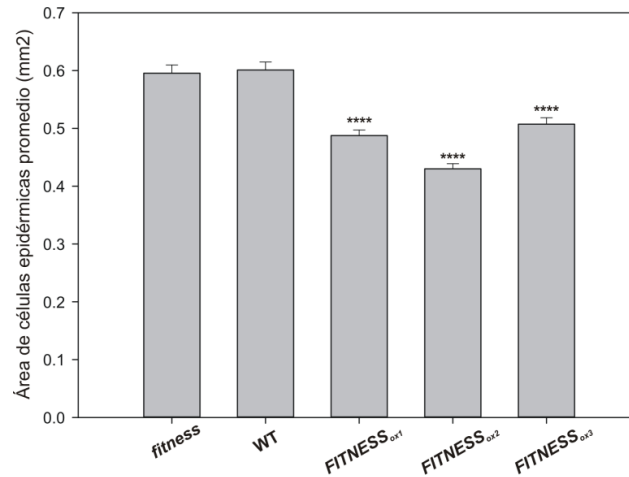


Figura 6.7: Áreas de células epidérmicas de las líneas *FITNESS*.

Se determinaron las áreas de las células epidérmicas de la cara adaxial de la hoja N°6 de plantas de 25 días de las líneas *FITNESS* en condiciones normales de luz y temperatura. Se utilizó el software Image-Pro plus. Se utilizaron 3 plantas por línea de las líneas *FITNESS* y el control WT. En la figura se observa el valor promedio \pm SE de 100 células de cada réplica biológica (3). Los análisis estadísticos se realizaron con el software Microsoft Excel usando el test t de Student, las diferencias estadísticamente significativas $P < 0.0001$ se indican con ****.

Tras analizar las líneas en el estadio reproductivo, se observó que las mutantes *fitness* no mostraron diferencias en el tiempo de floración en relación a las plantas control WT, sin embargo, el número de silicuas por planta fue significativamente mayor (Figura 6.8, A y B). En forma opuesta, las líneas *FITNESS_{ox}* florecieron en promedio 3 días más tarde, siendo el número total de silicuas producidas menor que el de las plantas control WT (Figura 6.8, A y B). Como resultado de estas alteraciones, la producción de semillas en las líneas *FITNESS_{ox}* es menor que en las plantas control WT, contrario a lo que ocurre en la mutante *fitness* donde la producción de semillas es significativamente mayor (Figura 6.8 C).

La observación de que la mutante *fitness* produce un mayor número de semillas en relación al control WT condujo a analizar los parámetros fotosintéticos. Para verificar la integridad y la funcionalidad del PSII se midieron varios parámetros asociados a la fluorescencia de la chl a (Baker y Rosenqvist, 2004). Los valores de Fv/Fm medidos en plantas de 45 días crecidas en condiciones normales fueron similares en todas las líneas, indicando que la actividad del PSII no está alterada. Este parámetro corresponde a la fracción de fotones absorbidos que son usados en el sistema fotoquímico en una hoja adaptada a la oscuridad. Además, la eficiencia cuántica operativa del PSII (ϕ PSII) y el qP, que representa la fracción de

fotones absorbidos por el PSII que es conducido por eventos fotoquímicos, fue similar en todas las líneas lo que sugiere una velocidad similar de transporte electrónico. Sin embargo, la extinción no fotoquímica (NPQ), que indica la fracción de energía disipada como calor, fue significativamente menor en las mutantes *fitness* (Figura 6.8 D) y fue mayor en las líneas *FITNESS_{ox}* en relación con las plantas control WT.

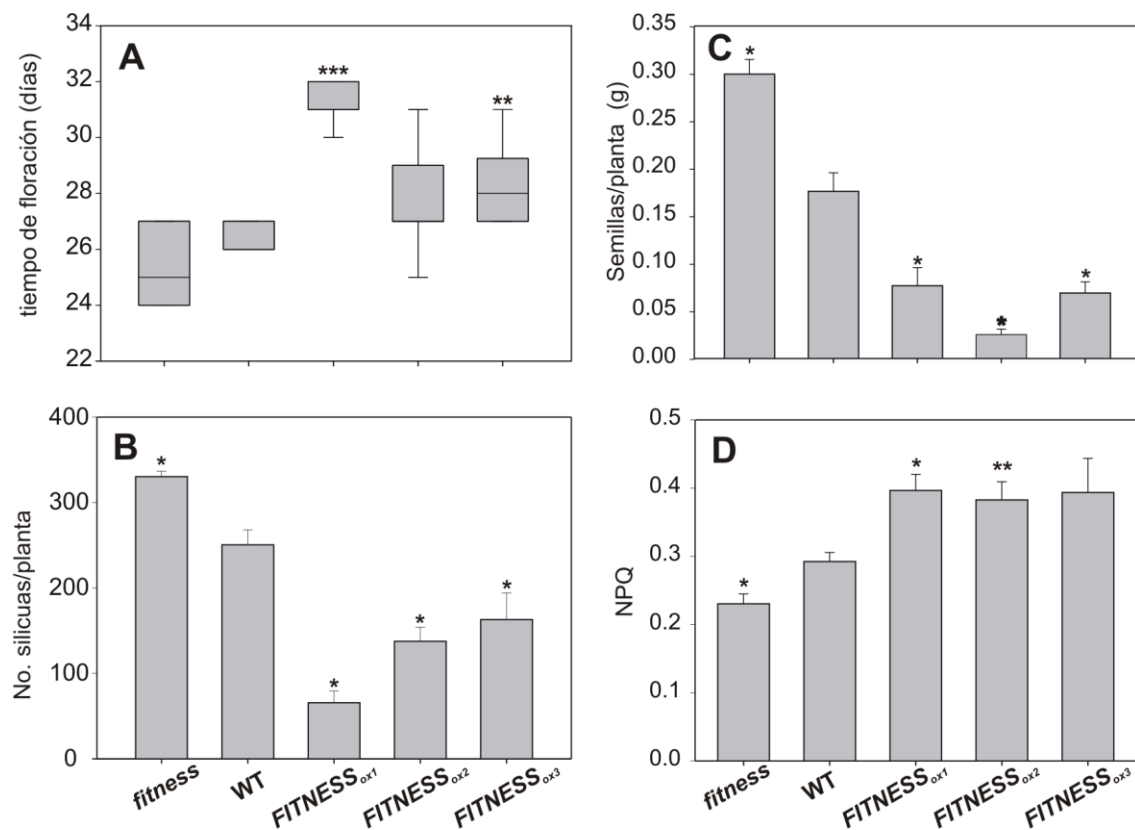


Figura 6.8: Cambios en el desarrollo reproductivo y en la extinción no fotoquímica de la fluorescencia (NPQ) en las líneas *FITNESS*.

A: Tiempo de floración. **B:** Número de silicuas por planta. **C:** Semillas/planta. En A, B y C; las barras de error representan el SE de los promedios de *n* réplicas biológicas. Para tiempo de floración se utilizó un *n*=14 plantas por línea. Para B y C se midió un *n*=5 plantas. **D:** Extinción no fotoquímica de la fluorescencia (NPQ), fue medida en plantas de 4 semanas y se graficó el valor promedio \pm SE de 4 réplicas biológicas. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Microsoft Excel usando el test *t* de Student, las diferencias estadísticamente significativas $P < 0.05$ se indican con *, $P < 0.01$ se indican con ** y $P < 0.001$ se indican con ***.

6.5 La expresión alterada de *FITNESS* promueve la desregulación de los niveles de ERO

El fenotipo de hojas hiponásticas de las líneas *FITNESS_{ox}* se asemeja al reportado para las mutantes *cat2*, una mutante fotorrespiratoria deficiente en CAT (Gao y col., 2014; Queval y col., 2007; Figura 6.9). CAT es una enzima altamente conservada que cataliza la conversión de H_2O_2 a H_2O y O_2 , y juega un rol clave en la remoción de cantidades excesivas de H_2O_2 (Mhamdi y col., 2010). En *Arabidopsis* existen tres genes que codifican para CAT con diferentes patrones y niveles de expresión. *CAT2* presenta una alta expresión en peroxisomas de tejidos fotosintéticos y es la principal contribuyente de actividad catalasa en hojas (Frugoli y col., 1996). Las mutantes *cat2* son mutantes condicionales que acumulan H_2O_2 producto de un aumento en la fotorrespiración en condiciones de día largo. Debido a esto, se evaluó la presencia de ERO mediante tinciones con NBT y DAB observándose mayor acumulación de ERO en las líneas *FITNESS_{ox}* respecto a las mutantes *fitness* y plantas control WT. Las líneas *FITNESS_{ox}* mostraron niveles elevados de O_2^- y H_2O_2 a partir de las 3 semanas de edad. En la Figura 6.10 A y B se observa que a las 2 semanas de edad no se ven diferencias significativas entre líneas, en cambio, a las 5 semanas se observan grandes cantidades de ERO acumuladas.

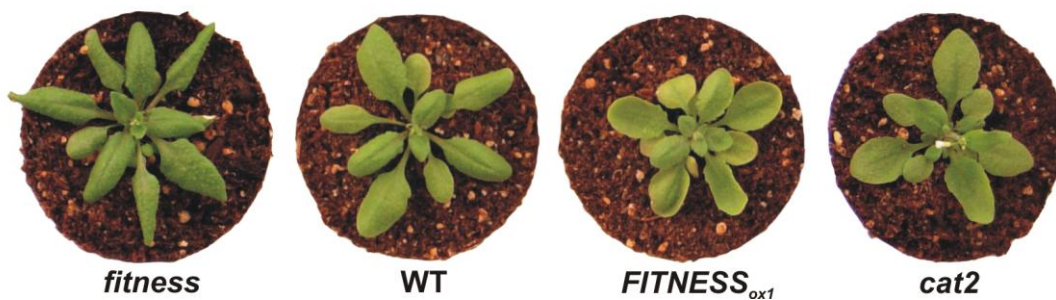


Figura 6.9: Las líneas *FITNESS_{ox}* presentan hojas hiponásticas similares a la mutante *cat2*.

Plantas de 4 semanas crecidas en condiciones normales de luz y temperatura.

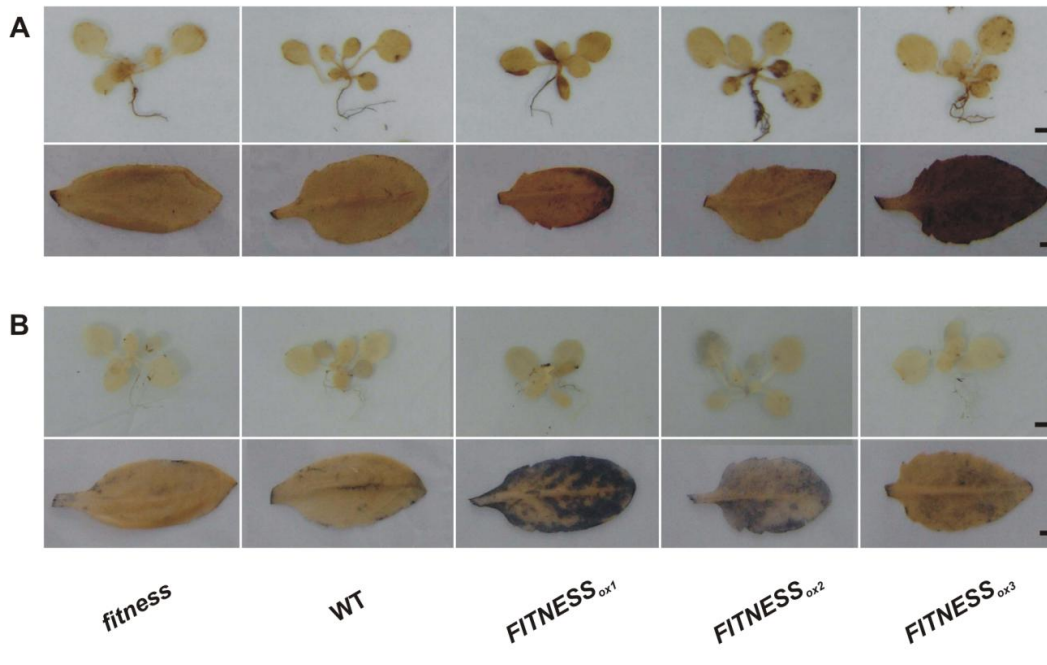


Figura 6.10: La sobreexpresión de *FITNESS* aumenta los niveles endógenos de ERO

A: Niveles de H₂O₂ (DAB) y **B:** Niveles de O₂^{•-} (NBT) de la mutante *fitness*, del control WT y de las líneas *FITNESS_{ox}*. En ambos casos el panel superior muestra plántulas de 2 semanas mientras que el panel inferior muestra hojas totalmente expandidas de rosetas de 5 semanas. Escala = 2 mm.

La acumulación de ERO fue dependiente de la longitud del día. En condiciones de día corto, las líneas *FITNESS_{ox}* no desarrollan lesiones espontáneas en el borde de las hojas y acumulan menos ERO que en día largo (Figura 6.11, A y B).



Figura 6.11: La acumulación de ERO en las líneas *FITNESS_{ox}* es dependiente de la longitud del día.

A: Plantas de 7 semanas de edad crecidas en régimen de día largo. **B:** Plantas de 10 semanas de edad crecidas en régimen de día corto. Para cada experimento se incubaron con DAB y NBT hojas representativas totalmente expandidas para detectar H_2O_2 y O_2^- respectivamente. Escala=1cm.

Como se mencionó anteriormente, la acumulación de ERO está determinada por un balance sutil entre la producción y las actividades antioxidantes. Teniendo en cuenta esto, se determinaron las actividades enzimáticas antioxidantes correspondientes a SOD, CAT, GR y APX en las líneas en estudio. Las actividades SOD y GR resultaron aumentadas en las líneas *FITNESS_{ox}* (Figura 6.12, A y C) mientras que la actividad GR medida fue significativamente menor en la mutante *fitness* (Figura 6.12 C). Interesantemente, la actividad APX medida fue significativamente mayor en la línea *fitness* (Figura 6.12 D). Estos resultados indicarían que las actividades antioxidantes aumentadas no son suficientes para detoxificar eficientemente las ERO en las líneas *FITNESS_{ox}*.

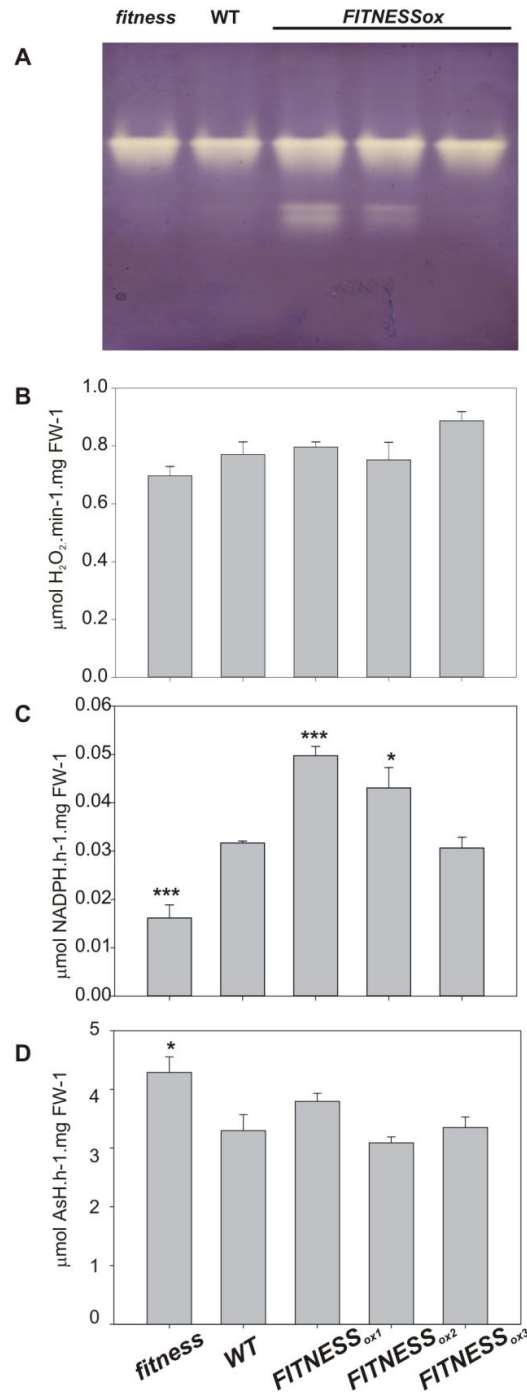


Figura 6.12: Análisis de actividad de enzimas antioxidantes en las líneas control WT y FITNESS.

A: Determinación de SOD en geles de actividad. Se muestra un gel representativo donde se observa mayor actividad de las isoformas CuZnSOD en las líneas *FITNESS_{ox}*, que en la línea *fitness* y la línea control. **B:** Actividad CAT, **C:** Actividad GR y **D:** Actividad APX. Para las determinaciones se utilizaron hojas de plantas de 5 semanas de edad. Se observa el valor promedio \pm SE de 4 réplicas biológicas. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Microsoft Excel usando el test t de Student, las diferencias estadísticamente significativas $P < 0.05$ se indican con *, $P < 0.01$ se indican con ** y $P < 0.001$ se indican con ***.

6.6 Análisis de los niveles de expresión de genes relacionados a ERO, en condiciones normales de crecimiento, mediante qPCR

Dado que la sobreexpresión de *FITNESS* promueve una desregulación en los niveles de ERO de la planta, se decidió evaluar los niveles de transcritos de algunos genes relacionados a ERO y a estrés en las líneas con niveles alterados de *FITNESS*. Se seleccionaron genes involucrados en la respuesta antioxidante de la planta: superóxido dismutasas Cu-Zn (*CDS1*, *CDS2* y *CDS3*), catalasas (*CAT1*, *CAT2* y *CAT3*), *GPX1*, *APX* cloroplástica estromática (*sAPX*), *DHAR*, *MDHAR*, 2-Cys-peroxirredoxina A (*2CysA*), 2-Cys-peroxirredoxina B (*2CysB*) y *Glutarredoxina C2* (*GRXC2*). Entre los genes relacionados a estrés y señalización se evaluaron *Ferredoxina 2* (*AtFd2*), *Multiprotein bridging factor 1c* (*MBF1c*), *Heat-shock proteins* (*Hsp17.6A* y *Hsp17.6B*), genes de *MAPK 3* (*MAPK3*), *MAPK Kinasa 4* (*MKK4*) y *ORE-SARA1 SISTER1* (*ORS1*). También se evaluaron los niveles de los transcritos correspondientes a las NADPH oxidasas (*RbohA-J*) que poseen un rol clave en la producción de ERO.

En las Figuras 6.13, 6.14, 6.15 y 6.16 se observan los niveles relativos de los transcritos analizados en las líneas *fitness*, *FITNESS_{ox1}*, *FITNESS_{ox2}* y *FITNESS_{ox3}* respecto del nivel de expresión en la línea control WT.

En general no se observaron cambios significativos en la mayoría de los transcritos analizados, a excepción de *Hsp17.6B* y *MKK4* que se vieron diferencialmente aumentados y *GPX1* que se vio disminuido en la línea mutante. En las líneas *FITNESS_{ox}* se vio que *GPX1*, *MAPK3*, *ORS1*, *RbohB* y *RbohE* están significativamente disminuidos mientras que *CAT2*, *CDS3*, *APX* y *GRXC2* están aumentados (Figuras 6.13, 6.14 y 6.15).

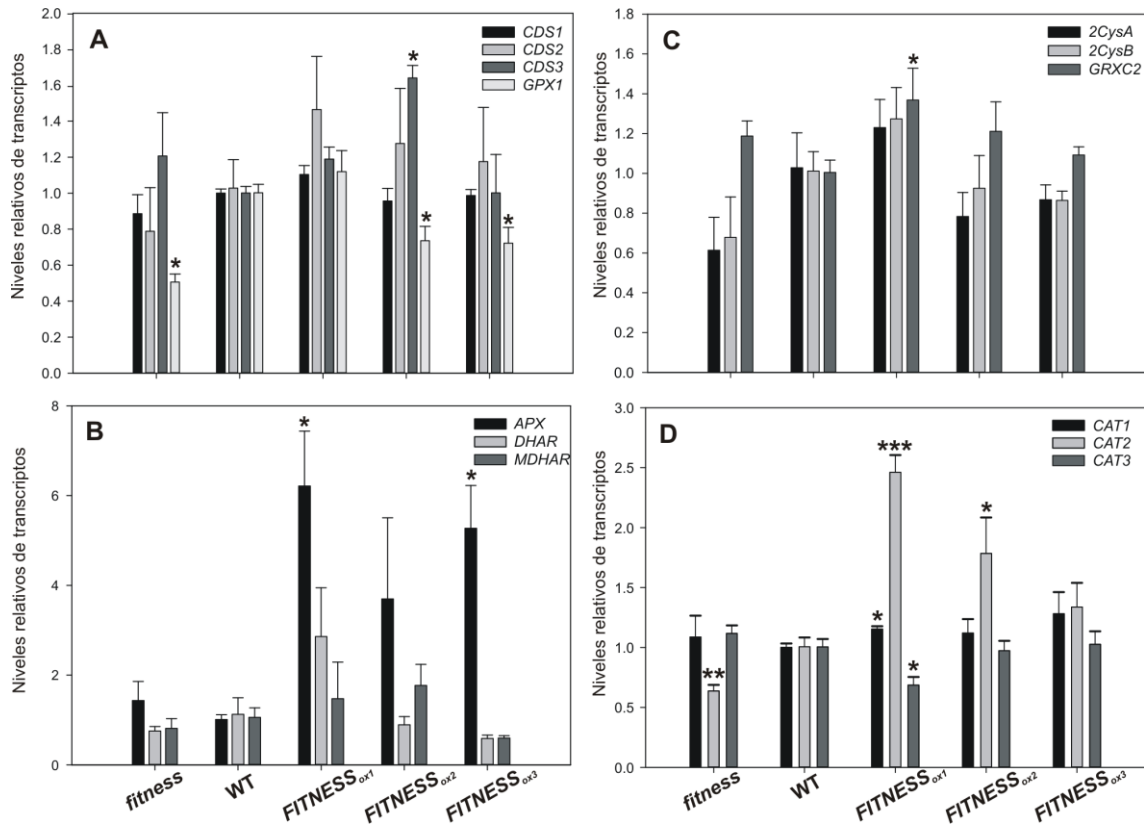


Figura 6.13: Niveles de expresión de genes antioxidantes.

En hojas de plantas de 5 semanas de edad, crecidas en condiciones normales, se cuantificaron los niveles relativos de transcritos de los siguientes genes. **A:** *CDS1*, *CDS2*, *CDS3* y *GPX1*. **B:** *APXs*, *DHAR* y *MDHAR*. **C:** *2CysA*, *2CysB* y *GRXC2*. **D:** *CAT1*, *CAT2* y *CAT3*. Se expresa el valor promedio \pm SE de 4 réplicas biológicas. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Microsoft Excel usando el test t de Student, las diferencias estadísticamente significativas $P < 0.05$ se indican con *, $P < 0.01$ se indican con ** y $P < 0.001$ se indican con ***.

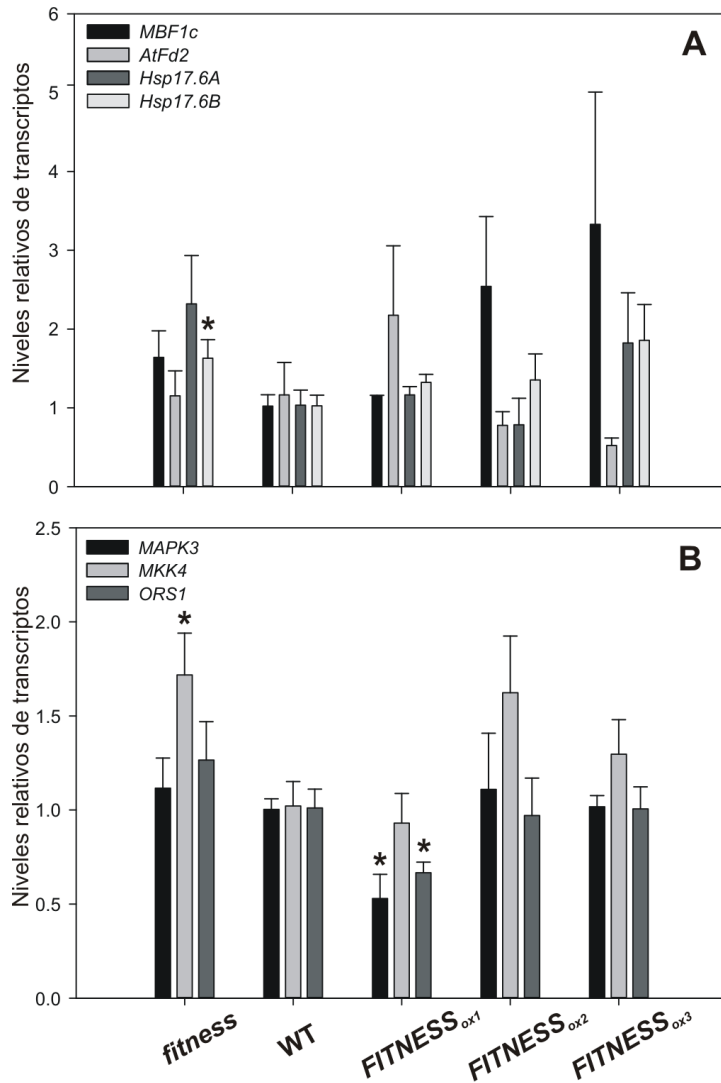


Figura 6.14: Niveles de expresión de genes de respuesta a estrés.

En hojas de plantas de 5 semanas de edad, crecidas en condiciones normales, se cuantificaron los niveles relativos de transcritos de los siguientes genes. **A:** *MBF1c*, *AtFd2*, *Hsp17.6A* y *Hsp17.6B*. **B:** *MAPK3*, *MKK4* y *ORS1*. Se expresa el valor promedio \pm SE de 4 réplicas biológicas. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Microsoft Excel usando el test t de Student, las diferencias estadísticamente significativas $P < 0.05$ se indican con *.

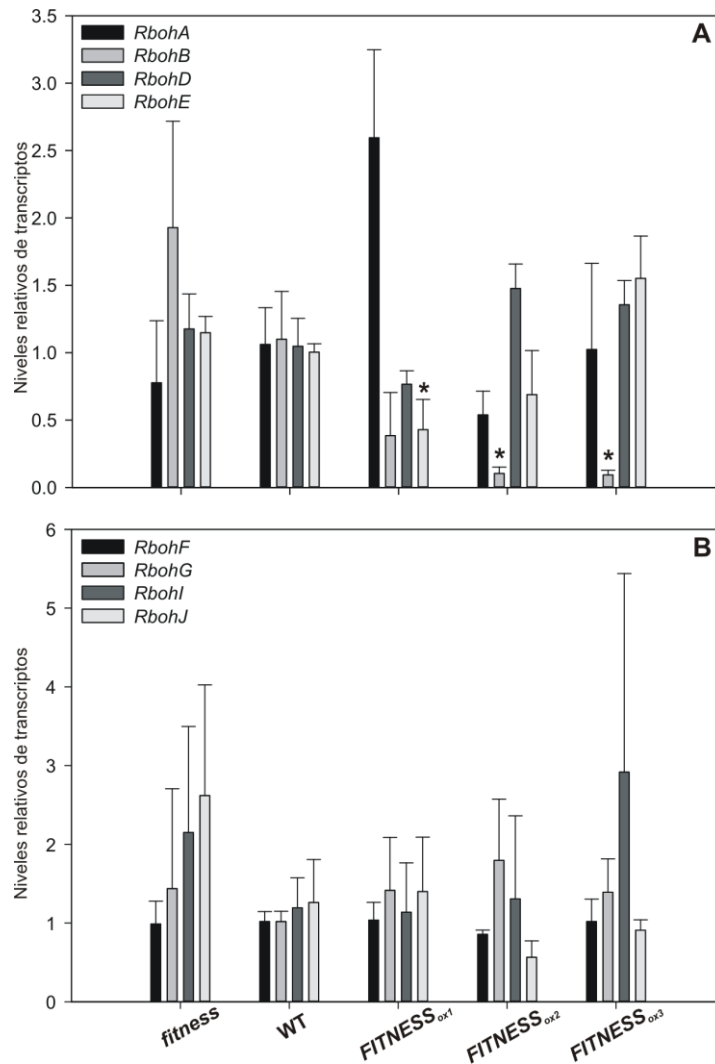


Figura 6.15: Niveles de expresión de genes *Rboh*.

En hojas de plantas de 5 semanas de edad, crecidas en condiciones normales, se cuantificaron los niveles relativos de transcritos de los siguientes genes. **A:** *RbohA*, *B*, *D* y *E*. **B:** *RbohF*, *G*, *I* y *J*. Se expresa el valor promedio \pm SE de 4 réplicas biológicas. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Microsoft Excel usando el test t de Student, las diferencias estadísticamente significativas $P < 0.05$ se indican con *.

6.7. Cambios metabólicos relacionados a niveles alterados de ERO

En muchas plantas se acumula el aminoácido Pro en respuesta a estrés, que funciona no sólo como osmoprotector sino como un potente antioxidante no enzimático (Rejeb y col., 2014). Por ello, se cuantificó la cantidad de Pro libre en plantas de 4, 5 y 6 semanas de edad observándose que existe una acumulación de Pro libre en las líneas *FITNESS_{ox}* a partir de las 5 semanas de edad (Figura 6.16). En estadios más tempranos no se detectaron diferencias. Este

aumento de Pro libre ocurre luego del inicio de la floración lo que sugiere una relación entre la expresión de *FITNESS*, los niveles de ERO y la acumulación de Pro.

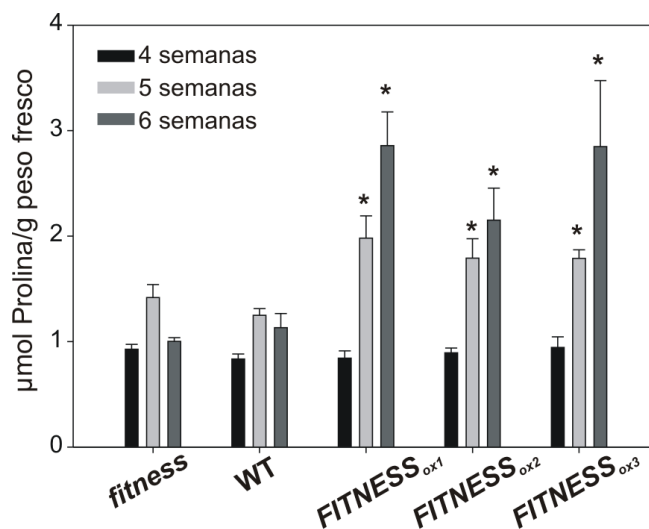


Figura 6.16: Contenido de Prolina libre en hojas de las líneas *FITNESS*.

Nivel de Pro libre expresado como valor promedio \pm SE de 4 réplicas biológicas. La determinación se realizó en plantas adultas, en extractos de hojas de plantas de 4, 5 y 6 semanas de edad crecidas en condiciones normales de luz y temperatura. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Microsoft Excel usando el test t de Student y las diferencias estadísticamente significativas $P < 0.05$ se indican con *.

Adicionalmente, se obtuvieron los perfiles metabólicos de plantas control y plantas con niveles alterados de *FITNESS* utilizando cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) en extractos de hojas de roseta de plantas de 45 días. En cada cromatograma se cuantificaron un total de 34 metabolitos de estructura química conocida entre los cuales había AA, azúcares, azúcares alcohol y ácidos orgánicos. Varios azúcares y azúcares alcohol que incluyen sacarosa, glucosa, galactosa, mio-inositol, galactinol y rafinosa fueron diferencialmente acumulados entre líneas (Figura 6.17 y Tabla 6.3). Es de destacar que las líneas *FITNESS_{ox}* mostraron cambios drásticos en los niveles de galactinol y rafinosa cuando se los compara con las líneas control WT. La rafinosa, que pertenece a la familia de los oligosacáridos de la rafinosa (incluye a la estaquiosa y la verbascosa), es un carbohidrato galactosil-sacarosa sintetizado a partir de galactinol y sacarosa por la enzima rafinosa sintasa. La síntesis de galactinol involucra al azúcar galactosa y al polialcohol mio-inositol, y ambos se encuentran disminuidos en las líneas *FITNESS_{ox}*, lo que refuerza los bajos niveles de rafinosa y

galactinol hallados. Además, el *pool* total del ácido orgánico citrato se encontró significativamente disminuido en las líneas *FITNESS_{ox}*, al contrario de lo que ocurre en las mutantes *fitness* donde se acumulan altos niveles de citrato. Dentro de los AA analizados se destacan los niveles aumentados de serina en dos de tres líneas *FITNESS_{ox}*.

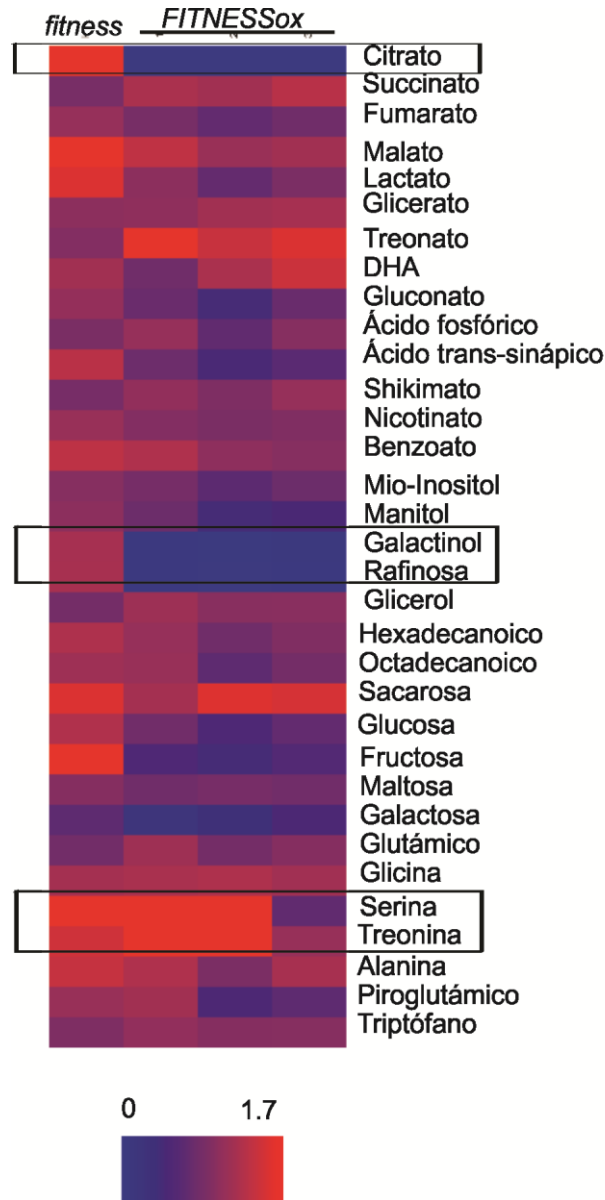


Figura 6.17: Niveles de metabolitos determinados en las líneas *FITNESS* relativos al control WT

Se construyó el *heat map* a partir de los niveles de metabolitos obtenidos para las líneas *FITNESS* y control WT usando GC-MS en extractos de hojas de plantas de 45 días crecidas en condiciones normales. Los valores presentados son relativos al control WT los cuales se indican como regiones rojas (altos niveles) o azules (bajos niveles), de acuerdo a la barra de referencia.

	WT	<i>fitness</i>	<i>FITNESS_{ox1}</i>	<i>FITNESS_{ox2}</i>	<i>FITNESS_{ox3}</i>
Ácido Cítrico	1.00±0.46	5.26±0.50	nd	nd	nd
Ácido Fumárico	1.00±0.05	1.08±0.09	0.70±0.20	0.80±0.29	0.87±0.08
Ácido Málico	1.00±0.30	1.76±0.15	1.11±0.06	1.18±0.12	1.37±0.17
Ácido Succínico	1.00±0.14	0.88±0.15	1.18±0.06	1.32±0.06	1.23±0.01
Ácido Láctico	1.00±0.28	1.56±0.56	0.71±0.14	0.90±0.30	1.02±0.13
Ácido Glicérico	1.00±0.12	1.02±0.13	1.18±0.06	1.20±0.08	1.04±0.06
Ácido Treónico	1.00±0.15	0.95±0.07	1.43±0.06	1.55±0.20	1.70±0.08
Ácido Dehidroascórbico	1.00±0.34	1.18±0.29	1.23±0.15	1.44±0.28	0.80±0.14
Ácido Glucónico	1.00±0.15	1.07±0.23	0.43±0.04	0.74±0.05	0.76±0.22
Ácido Fosfórico	1.00±0.09	0.89±0.06	0.68±0.09	0.98±0.10	1.08±0.20
Ácido Trans-sináptico	1.00±0.04	1.33±0.19	0.46±0.08	0.63±0.11	1.33±0.19
Ácido Shikímico	1.00±0.20	0.86±0.12	0.92±0.08	1.08±0.08	1.06±0.12
Ácido Nicotínico	1.00±0.13	1.10±0.14	0.89±0.03	0.94±0.08	0.95±0.12
Ácido Benzoico	1.00±0.10	1.35±0.25	1.03±0.22	0.98±0.16	1.26±0.02
Mio-Inositol	1.00±0.07	0.98±0.03	0.65±0.04	0.77±0.18	0.85±0.24
Manitol	1.00±0.25	1.02±0.26	0.42±0.03	0.47±0.12	0.77±0.27
Galactinol	1.00±0.35	1.20±0.32	0.02±0.39	0.07±0.6	0.05±0.24
Rafinosa	1.00±0.37	1.21±0.27	0.01±0.86	0.04±0.16	0.05±0.61
Glicerol	1.00±0.11	0.84±0.29	0.99±0.06	1.00±0.11	1.14±0.00
Ácido Hexadecanoico	1.00±0.05	1.25±0.11	0.80±0.06	0.94±0.04	1.08±0.07
Ácido Octadecanoico	1.00±0.07	1.15±0.08	0.67±0.20	0.84±0.14	1.10±0.10
Sacarosa	1.00±0.15	1.56±0.01	1.57±0.07	1.51±0.11	1.19±0.28
Glucosa	1.00±0.12	1.27±0.17	0.51±0.07	0.70±0.32	0.81±0.04
Fructosa	1.00±0.29	1.70±0.33	0.42±0.18	0.55±0.49	0.52±0.27
Maltosa	1.00±0.05	0.97±0.12	0.86±0.11	0.81±0.06	0.80±0.00
Galactosa	1.00±0.30	0.67±0.40	0.21±0.62	0.29±0.49	0.22±0.41
Ácido Glutámico	1.00±0.15	0.82±0.09	0.84±0.06	0.97±0.18	1.16±0.20
Glicina	1.00±0.13	1.22±0.12	1.25±0.06	1.17±0.05	1.22±0.12
Serina	1.00±0.35	1.74±0.35	3.52±0.18	0.92±0.19	4.53±0.01
Treonina	1.00±0.53	1.47±0.46	7.21±0.13	1.09±0.11	7.01±0.26
Alanina	1.00±0.28	1.41±0.13	0.90±0.13	1.21±0.19	1.26±0.28
Ácido Piroglutámico	1.00±0.16	1.10±0.14	0.50±0.25	0.66±0.33	1.18±0.21
Triptófano	1.00±0.20	0.92±0.28	0.97±0.17	0.98±0.23	1.05±0.23

Tabla 6.3: Composición metabólica de la mutante *fitness*, las líneas *FITNESS_{ox}* y la línea control WT

Se presentan los valores finales obtenidos luego de la normalización por peso fresco y un estándar interno (IS, Ribitol), calculado como cambios relativos al control WT=1. Los datos son el promedio de 4 réplicas biológicas. En negrita se muestran aquellos valores que corresponden a cambios significativos cuya prueba t es $P < 0.05$. En rojo se muestran aquellos valores que corresponden a cambios cuya prueba t es $P < 0.1$.

6.8 Las líneas *FITNESS* presentan alteraciones en las vías de fotorrespiración

Durante la fotorrespiración la incorporación de O_2 en vez de CO_2 en la reacción catalizada por la RuBisCO resulta en una pérdida neta de carbono y energía. Se estima que la mayoría del H_2O_2 de las células es producido durante la fotosíntesis y la fotorrespiración (Foyer

y Noctor, 2003; Kaurilind y col., 2015) haciendo de la fotorrespiración un participante importante para el estado celular redox. El H_2O_2 fotorrespiratorio generado durante la oxidación de glicolato a glioxilato es removido enzimáticamente a través de la actividad CAT. Se ha sugerido que la fotorrespiración es una vía importante de disipación de energía para impedir la fotoinhibición (Wingler y col., 2000) y, además, puede generar metabolitos como Serina y Glicina, que son empleados por otras vías metabólicas.

En peroxisomas, el 2-fosfoglicolato producido es irreversiblemente convertido a glicolato y H_2O_2 por la enzima glicolato oxidasa (GO). En Arabidopsis, la familia de la *GO* contiene 5 miembros pero sólo dos genes, *At3g14415* y *At3g14420*, que son corregulados con los genes fotorrespiratorios. Para evaluar si existen alteraciones en el proceso de fotorrespiración en las líneas con niveles alterados de *FITNESS* se evaluaron los niveles de estos dos transcritos de *GO* observándose que las mutantes *fitness* presentan niveles significativamente menores para ambos genes lo que sugeriría que la vía fotorrespiratoria es menos activa en las plantas *fitness* (Figura 6.18 A). Para corroborar esta hipótesis se cuantificaron los niveles del metabolito glioxilato. Las líneas *FITNESS_{ox}* presentaron niveles significativamente mayores de glioxilato (Figura 6.18 B) lo que sugiere que estas líneas tienen fotorrespiración aumentada. Finalmente, se utilizó el marcador fluorescente $H_2DCF-DA$ para intentar localizar la generación de ERO *in planta*. Por un lado, se pudo corroborar que los niveles de ERO acumulados en las distintas líneas dependen de los niveles de expresión de *FITNESS* y adicionalmente se observó que la acumulación de ERO en las líneas *FITNESS_{ox}* presenta un patrón compatible con localización peroxisomal (Figura 6.18 C).

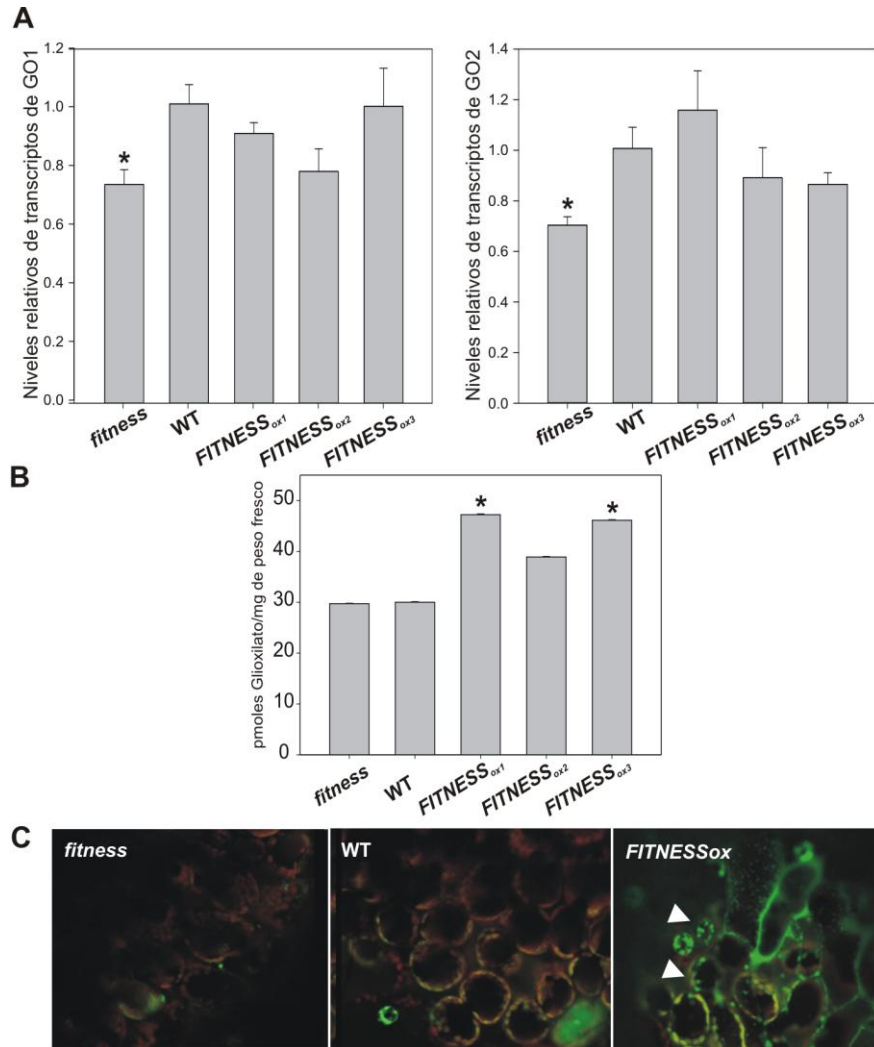


Figura 6.18: *FITNESS* conduce a alteraciones en la fotorrespiración.

A: Niveles de transcritos de glicolato oxidasas (*GO1* y *GO2*), medidos mediante qPCR en plantas de 5 semanas de edad crecidas en condiciones normales de luz y temperatura. Ambos transcritos se vieron significativamente disminuidos en la mutante *fitness* en relación al control WT. Se expresa el valor promedio \pm SE de 4 réplicas biológicas. **B:** Contenido de glioxilato medido en extractos de hojas de plantas de 5 semanas de edad crecidas en condiciones normales en líneas control WT y *FITNESS*. **C:** Hojas representativas totalmente expandidas teñidas con H₂DCF-DA. En el panel derecho las flechas blancas que indican localización putativa en peroxisoma. La mutante *fitness* muestra una menor fluorescencia cuando se la compara con el control WT (panel de la izquierda). Los análisis estadísticos se realizaron con el software Microsoft Excel usando el test t de Student, las diferencias estadísticamente significativas $P < 0.05$ se indican con *.

La enzima fotorrespiratoria serina hidroximetiltransferasa (SHMT) combinada con la actividad de la glicina decarboxilasa convierten Glicina y Serina en mitocondrias. En *Arabidopsis*, *SHMT* esta codificada por un único gen, y su mutante es letal en concentraciones ambientales de CO₂. Aunque los niveles de transcritos de *SHMT* no fueron significativamente inducidos en las líneas *FITNESS_{ox}* en relación a las plantas control WT, sus niveles se vieron aumentados en la línea que más expresa respecto de la mutante *fitness* ($P=0.057$), lo que estaría de acuerdo con un metabolismo fotorrespiratorio aumentado (Figura 6.19).

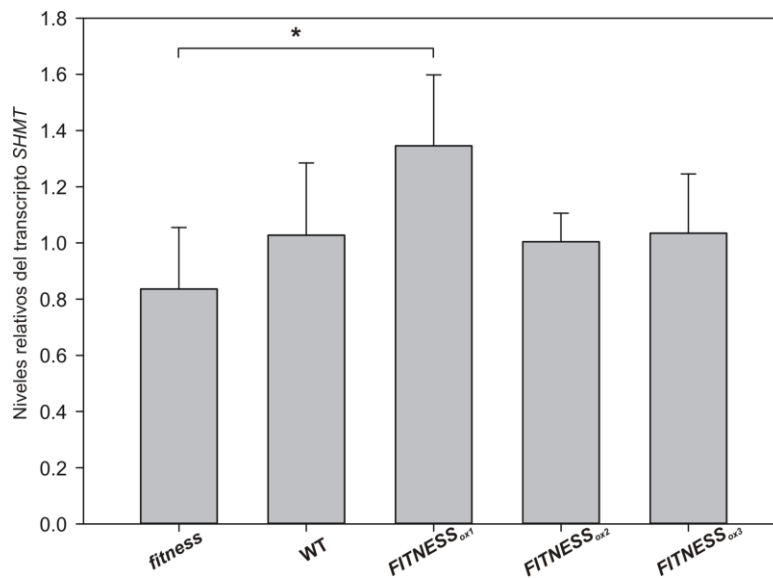


Figura 6.19: Niveles relativos del transcritos *SHMT* en hojas de las líneas *FITNESS*.

Niveles de transcritos de SHMT en las líneas *FITNESS* relativos a los niveles en el control WT en hojas de plantas de 5 semanas de edad crecidas en condiciones normales. Se expresa el valor promedio \pm SE de 4 réplicas biológicas. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Microsoft Excel usando el test t de Student, la diferencia entre la mutante *fitness* y *FITNESS_{ox1}* ($P=0.057$) se indican con *.

6.9 FITNESS provoca cambios en los niveles de AS

Otro cambio detectado a nivel metabólico fue un aumento en el contenido de ácido AS en la mutante *fitness* (Figura 6.20 A). En plantas hay dos vías para la síntesis de AS, la vía del isocorismato (IC) y la vía de la fenilalanina amonio liasa (PAL), siendo la IC sintasa (ICS) y la PAL las enzimas claves de cada una de ellas respectivamente. Ambas vías utilizan corismato, el producto final de la vía del shikimato. Además de la contribución de PAL, la ruta principal de síntesis del AS es la vía del IC. Con el incremento observado en AS, se decidió evaluar los

niveles de transcritos correspondientes a los genes que codifican para *ICS* en *Arabidopsis* (Figura 6.20, B-G). Los transcritos de *ICS1* se vieron significativamente aumentados en las mutantes *fitness* (Figura 6.20 B) de acuerdo a evidencias previas que muestran que el control transcripcional de *ICS1* es clave para el inicio de la biosíntesis de AS (Seyfferth y Tsuda, 2014), aunque no se observó un aumento del transcritos de *ICS2* en estas líneas (Figura 6.20 D). La acumulación de AS es mantenida a través de la regulación transcripcional de *EDS1* (Du y col., 2009) y *PAD4* (Jirage y col., 1999) estando ambos transcritos también aumentados en las mutantes *fitness*, por lo tanto contribuirían a la acumulación de AS (Figura 6.20, C y E). El aumento en los niveles endógenos de AS se correlaciona con la inducción de genes relacionados a patogénesis (genes PR; Durrant y Dong, 2004). La reprogramación transcripcional está controlada principalmente por *NPR1* (*non expressor of pathogenesis-related gene 1*). La monomerización y acumulación nuclear de *NPR1*, en presencia de AS, resulta en un aumento en la expresión de *PR1* (*pathogenesis-related 1*) y es por esto que se lo considera un marcador de activación de la vía de señalización del salicilato. Consistente con el aumento en los niveles de AS medidos en la mutante *fitness* se observó una inducción de los transcritos *NPR1* y *PR1* (Figura 6.20, F y G).

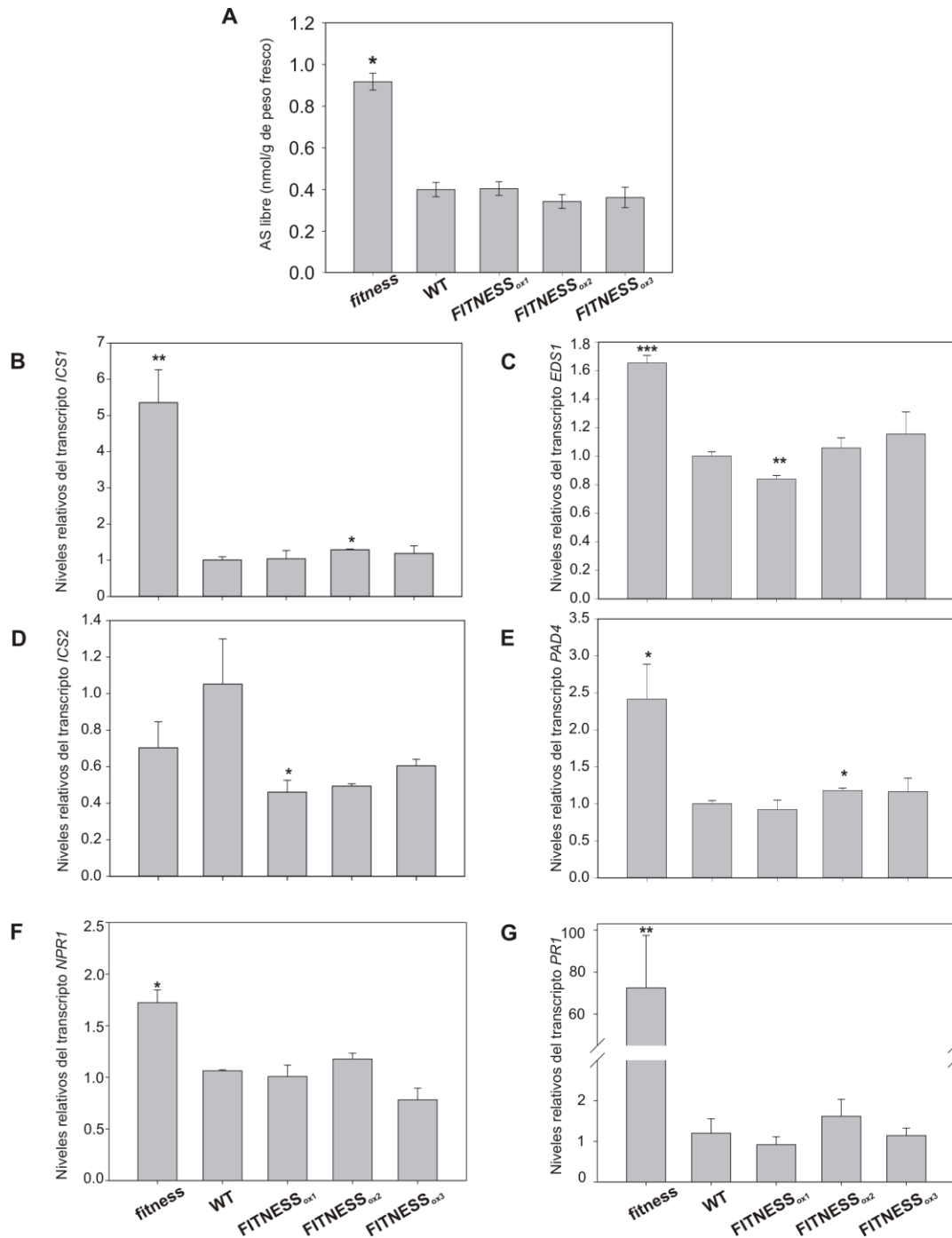


Figura 6.20: FITNESS provoca cambios en los niveles de AS.

A: El AS fue medido mediante GC-MS, y su concentración absoluta fue determinada por comparación con una curva de calibración que contuvo una serie de concentraciones de soluciones estándares, incluyendo el estándar interno ribitol. Niveles de transcritos relativos de *ICS1* (**B**), *ICS2* (**C**) *EDS1*, (**D**) *PAD4*, *NPR1* (**F**) y *PR1* (**G**) fueron cuantificados mediante qPCR en plantas de 5 semanas de edad crecidas en condiciones normales de crecimiento. Se expresa el valor promedio \pm SE de 4 réplicas biológicas. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Microsoft Excel usando el test t de Student, las diferencias estadísticamente significativas $P < 0.05$ se indican con *, $P < 0.01$ se indican con ** y $P < 0.001$ se indican con ***.

6.10 Las mutantes *fitness* poseen tolerancia aumentada al estrés oxidativo

Dada la acumulación de ERO observada en las hojas de las líneas *FITNESS_{ox}* se decidió analizar la tolerancia de estas plantas al MV. Plantas de 4 semanas de edad fueron rociadas con MV (50 μ M en 0.1 % Tween-20) y expuestas a la luz, ya que aumenta el efecto nocivo del herbicida. Las plantas control fueron rociadas con la misma solución pero sin MV. Las mutantes *fitness* reiniciaron su crecimiento, por lo que se observan hojas verdes en la roseta luego del tratamiento, lo que indica tolerancia al MV (Figura 6.21 A). En cambio, las plantas control WT y las líneas *FITNESS_{ox}* desarrollaron síntomas severos de blanqueamiento lo que resultó en la muerte de la planta, esto sugiere que *FITNESS* estaría involucrado en tolerancia al estrés oxidativo en *Arabidopsis*. Esta idea está de acuerdo con los bajos niveles de ERO acumuladas por las mutantes *fitness* luego del tratamiento con MV (Figura 6.21 B).



Figura 6.21: Tratamiento con MV en las líneas *FITNESS*.

Plantas de 4 semanas de edad fueron rociadas con MV (50 μ M en 0.1 % Tween-20) y expuestas a la luz. **A:** Las mutantes *fitness* resultaron más tolerantes al tratamiento con 50 μ M MV luego de 12 días como resultado de una mayor detoxificación de ERO. **B:** Niveles de $O_2^{\cdot-}$ (NBT) menores en las mutantes *fitness* luego de 2 h de tratamiento. Escala= 1 cm

Recientemente se identificó el FT *JUB1*, que pertenece a la familia NAC, que es rápida y fuertemente inducido por H_2O_2 (Wu y col., 2012). *JUB1* participa en la red regulatoria de la homeostasis celular de H_2O_2 y constituye un regulador central de los niveles celulares de H_2O_2 . Teniendo en cuenta esto, se decidió cuantificar los niveles de transcritos de *JUB1* en las líneas *FITNESS*. Las mutantes *fitness* mostraron una fuerte inducción de *JUB1* en hoja (Figura 6.22 A).

Además, los niveles de transcritos de *DREB2a*, un gen blanco de *JUB1* previamente definido, se vió aumentado en las mutantes *fitness* (Figura 6.22 B). Además, la actividad del promotor de *FITNESS* y *JUB1* en las hojas presentan un patrón de expresión opuesto (Figura 6.22 C y Wu y col., 2012). Esto significa que la expresión de *FITNESS* disminuye hacia la punta de la hoja, mientras la expresión de *JUB1* aumenta en esa dirección, lo cual indica que *FITNESS* podría actuar como un regulador negativo de *JUB1*. En conjunto, todos estos datos apoyan la idea de que *FITNESS* actuaría corriente arriba de *JUB1*, controlando el H_2O_2 en las hojas.

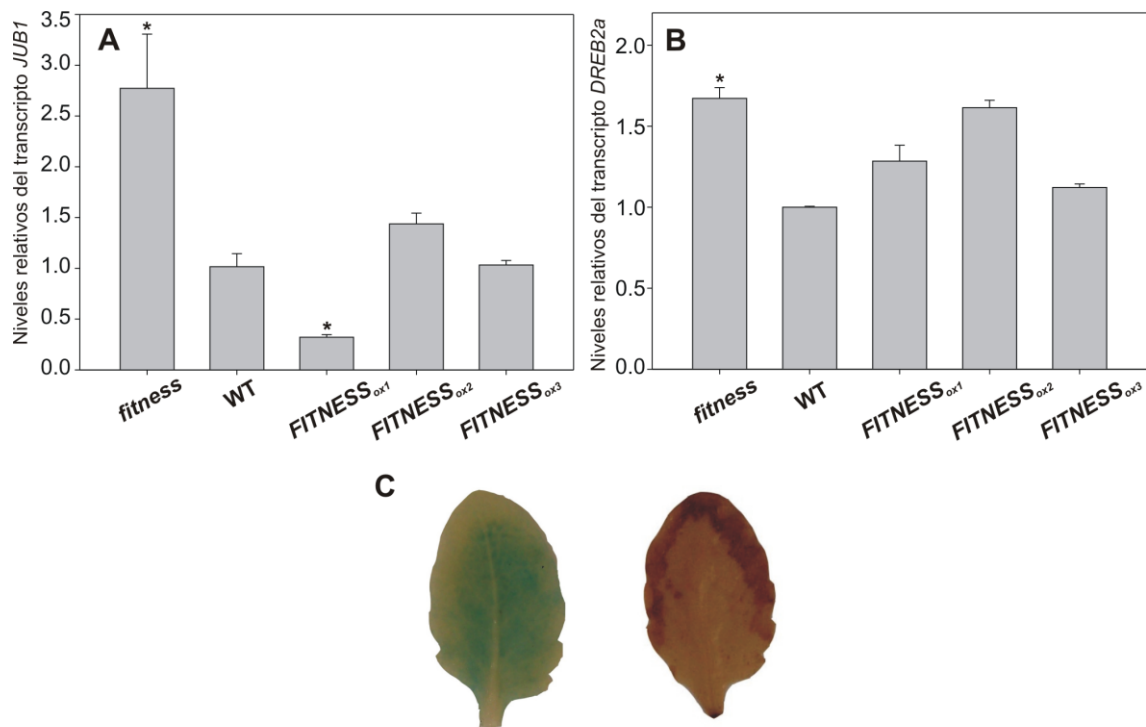


Figura 6.22: Las líneas *FITNESS* muestran tolerancia alterada al estrés oxidativo y expresión alterada de *JUB1* y *DREB2a*.

Se determinó la expresión de *JUB1* (A) y *DREB2A* (B) mediante qPCR en plantas de 5 semanas de edad crecidas en condiciones normales. Se expresa el valor promedio \pm SE de 4 réplicas biológicas. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Microsoft Excel usando el test t de Student, las diferencias estadísticamente significativas $P < 0.05$ se indican con *. C: A la izquierda se muestra una hoja de 5 semanas totalmente expandida, teñida para detectar actividad GUS, donde se observa que la expresión disminuye hacia los bordes de la hoja. A la derecha se muestra una hoja representativa de una línea *FITNESS_{ox}* donde se evidencia la acumulación de H_2O_2 en los bordes de la hoja.

Se ha reportado que la sobreexpresión de *JUB1* genera plantas con senescencia tardía y tolerantes a varios estreses abióticos. Como se mostró anteriormente, la línea *fitness* que presenta altos niveles de *JUB1* es tolerante al estrés oxidativo. Por otro lado, el FT *JUB1* es activado por un aumento en los niveles de H_2O_2 endógenos, desencadenados por un estrés ambiental como el estrés salino, entre otros. Esto se evidenció en un experimento de microarreglos que se realizó en plantas crecidas en hidroponia sometidas a estrés salino (NaCl 150 mM) durante 4 días (Wu y col., 2012). Dada la información reportada se decidió evaluar el comportamiento de la mutante *fitness* ante otro estrés abiótico, la salinidad. Para ello se realizaron dos análisis, uno en plantas adultas crecidas en tierra y otro en plántulas en medio líquido.

El tratamiento de estrés salino en plantas adultas se realizó según se indica en la sección 3.14.1 de Materiales y Métodos. Como se observa en la Figura 6.23, la línea *fitness* es más tolerante al riego con NaCl 250 mM que la planta control WT, ya que mientras que las plantas control WT evidencian a los 15 días de tratamiento hojas amarillentas senescentes, las plantas *fitness* permanecen verdes.

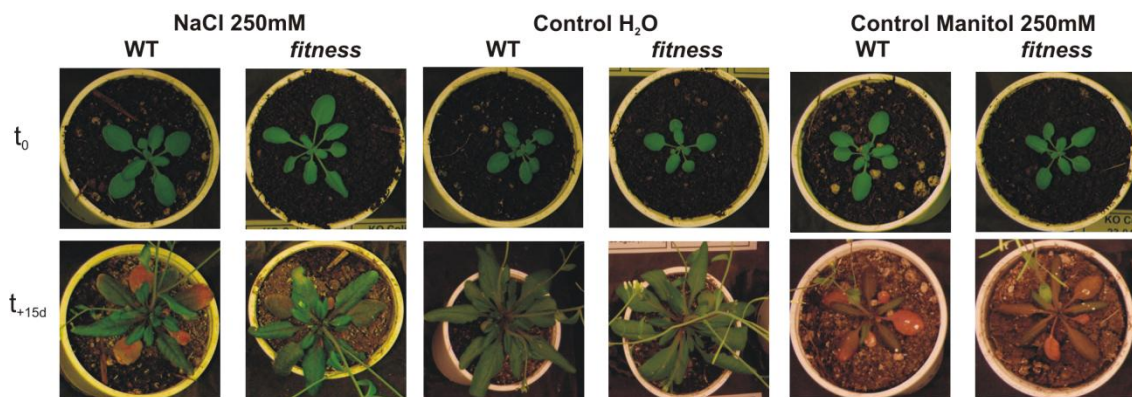


Figura 6.23: Estrés salino en tierra en plantas de la línea *fitness*.

Plantas de 3 semanas de edad fueron regadas con NaCl 250 mM, agua (control) y Manitol 250mM (control de osmolaridad) durante 2 semanas. Las mutantes *fitness* resultaron más tolerantes al tratamiento que la línea control.

Ante el resultado obtenido en plantas adultas se decidió estudiar qué pasaría con el estrés salino en un estadio de crecimiento anterior al de planta adulta, en plántulas (Ver sección 3.14.2 de Materiales y Métodos). Como puede verse en la Figura 6.24, a los 4 días de tratamiento se observa que, en la condición MS 0,5X NaCl 200 mM, la línea *fitness* presenta

hojas verdes, a diferencia de la línea control WT, que presenta todas sus hojas blanquecinas. Esto sugiere que, en las condiciones del ensayo, la línea *fitness* es más tolerante al estrés salino que las plantas control WT.

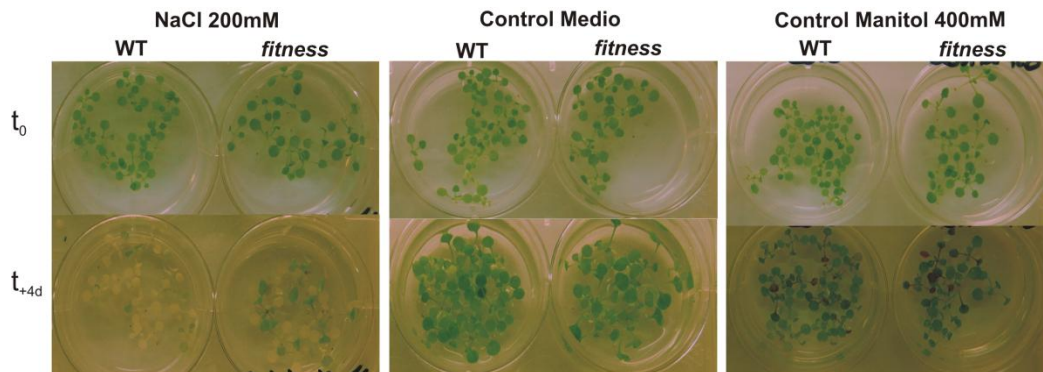


Figura 6.24: Estrés salino en plántulas de la línea *fitness*.

Se incubaron plántulas de 10 días en medio líquido solo (control) y con agregado de NaCl 200 mM durante 4 días. Se observa que en las condiciones en estudio, la línea *fitness* es más tolerante al estrés salino que las plantas control WT.

6.11 Expresión de la proteína FITNESS recombinante para la generación de anticuerpos policlonales

Los ensayos moleculares que involucran inmunodetección requieren contar con anticuerpos policlonales como herramienta, es por esto que se generaron anticuerpos contra la proteína en estudio, inoculando la misma en conejos. El detalle de las técnicas empleadas para obtener la proteína FITNESS-His recombinante se detallan en la sección 3.9.1 y 3.9.2 de Materiales y Métodos.

Primero se realizó el clonado del ADNc en el vector de expresión pET28a, que expresó la proteína de interés fusionada a una cola de His. Se probaron tres cepas de expresión de *E. coli*: BL21, BL21(DE3) Codon Plus y Rosetta; de las cuales se eligió la cepa *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus-RIL (Novagen), porque permitió obtener mayor cantidad de proteína expresada. Las condiciones de expresión analizadas fueron: inducción con IPTG 0,5 mM 18/20°C durante toda la noche y 37°C durante 3 h, obteniéndose mayor cantidad de proteína en la primer condición. También fue necesario probar distintas composiciones de *buffer* de lisis, ya que la primera opción utilizada (Tris HCl 50 mM pH 8; NaCl 300 mM; glicerol 10% v/v) hizo que la proteína expresada se obtenga mayoritariamente en el pellet celular (Figura 6.25) y con una masa molecular de 37 kDa, mayor que la masa molecular teórica para la proteína FITNESS-His

que es de 26,87 kDa. Dada la diferencia en el peso molecular obtenido, se realizó un western blot con un anticuerpo anti-His para corroborar que fuese la proteína de interés y se vio que la banda coincidía con la proteína FITNESS recombinante. Además, se confirmó la identidad de la proteína expresada por secuenciación (Identificación por MALDI-TOF/TOF-CEQUIBIEM).

Para obtener la proteína en la fracción soluble se intentaron resolubilizar los cuerpos de inclusión con SDS y urea sin éxito. Luego se probó un método de purificación de proteínas insolubles usando SDS (Schlager y col., 2012). Se utilizó un buffer de lisis Tris HCl 50 mM pH 8; NaCl 300 mM; SDS 1% v/v; DTT 1 mM. Las células se rompieron por ultrasonido y se incubaron 30 minutos en hielo para precipitar el SDS libre (la concentración residual de SDS fue compatible con la unión a Ni/NTA de alta afinidad). Se centrifugó (eliminándose el SDS como precipitado) y se obtuvieron 3 fracciones: Extracto Total (ET), Sobrenadante (SN) y Pellet, que se corrieron en un gel desnaturizante de poliacrilamida. En la Figura 6.25 se observan los resultados obtenidos con las dos alternativas de buffer de lisis, la opción sin SDS hace que la mayoría de la proteína expresada se obtenga en la fracción del pellet. En cambio, agregando SDS al *buffer* se obtuvo la proteína expresada mayoritariamente en la fracción soluble, lo que permitió purificarla mediante Cromatografía de Afinidad Ni/NTA.

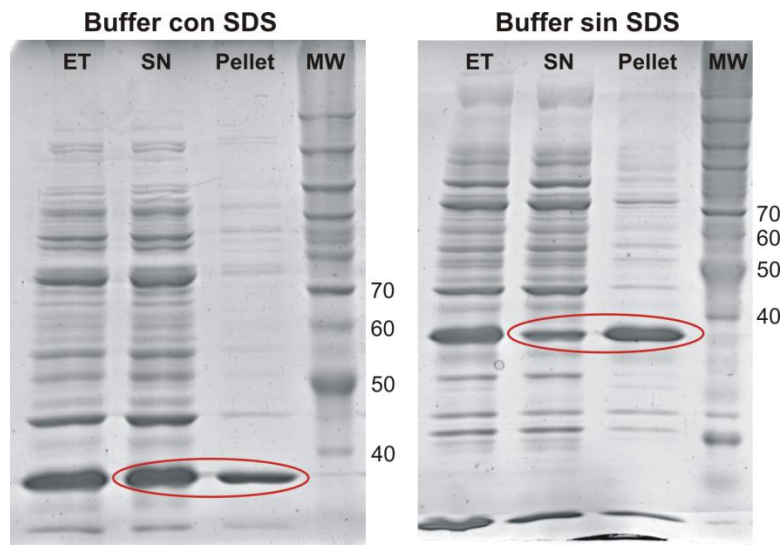


Figura 6.25: Expresión de la proteína FITNESS recombinante.

Se observa que el buffer con SDS permite enriquecer la fracción soluble en la proteína FITNESS, en cambio, en el buffer sin SDS se obtiene la mayoría de la proteína expresada en la fracción del pellet. *Buffer* con SDS (Tris HCl 50mM pH 8; NaCl 300mM; SDS 1% v/v; DTT 1mM) y *Buffer* sin SDS (TrisHCl 50mM pH 8; NaCl 300 mM; glicerol 10% v/v).

Luego se analizó la purificación por cromatografía de afinidad en un gel de poliacrilamida 12%. Como puede observarse en la Figura 6.26 se logró obtener un eluido

enriquecido en la proteína FITNESS recombinante, que se utilizó para inocular un conejo siguiendo el protocolo de inmunización estándar detallado en la sección 3.9.3 de Materiales y Métodos.



Figura 6.26: Purificación de la proteína FITNESS recombinante en columna de Ni-NTA.

La banda encerrada en el círculo rojo corresponde a la proteína FITNESS recombinante que se utilizó para inocular al conejo para la generación de los anticuerpos anti-FITNESS.

Al antisuero obtenido del conejo se le realizaron pruebas de sensibilidad y especificidad. Para ello se sembraron tres cantidades distintas de proteína recombinante purificada (20 μ g; 2 μ g; 0,2 μ g) que se incubaron con tres diluciones distintas del antisuero (1/100; 1/200; 1/500). En la Figura 6.28 se observa la inmunodetección realizada con una dilución del anticuerpo 1/200 que fue la óptima, ya que en la dilución 1/500 ya no se detectó la banda de 0,2 μ g de proteína purificada.

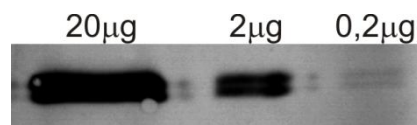


Figura 6.27: Prueba de sensibilidad y especificidad de los anticuerpos generados

Se sembraron tres cantidades distintas de proteína recombinante purificada (20 μ g; 2 μ g; 0,2 μ g) que se incubaron con una dilución del antisuero 1/200.

6.11.1 Análisis de la proteína FITNESS *in planta*

Los anticuerpos generados contra la proteína FITNESS reconocieron la proteína recombinante expresada en *E. coli*. Luego se ensayó si los mismos reconocen a la proteína FITNESS en un extracto de plantas control WT y FITNESS_{ox}. Sólo se detectaron bandas

inmunoreactivas cuando se sembraron 70 μ g de proteínas totales. Se observaron dos bandas (33 y 46 kDa) que son de distinta MM a la predicha para la proteína FITNESS que es de \sim 23 kDa (Figura 6.28).

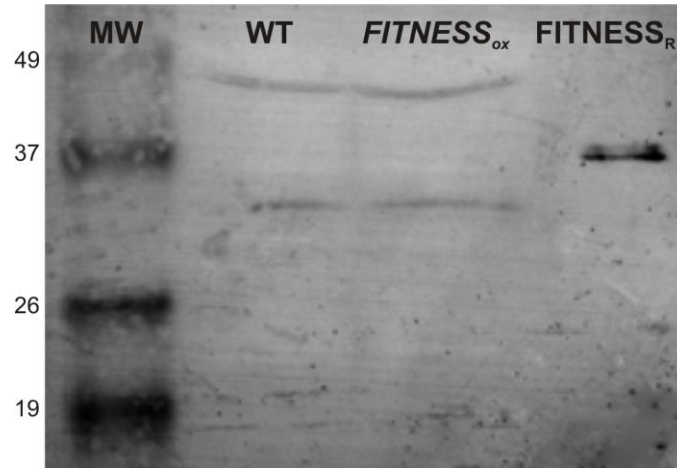


Figura 6.28: Inmunodetección de FITNESS en extractos proteicos vegetales de Arabidopsis.

6.12 Discusión: Rol propuesto para la proteína FITNESS

El gen *At1g07050*, que llamamos *FITNESS*, codifica para una proteína de 195 AA, que se localiza en el núcleo celular (Figura 6.1 C), pudiendo participar en procesos regulatorios. *FITNESS* fue clasificado por Cockram y col. (2012) como *CMF3*, por pertenecer a la familia *CMF*, ya que contiene un dominio CCT hacia su extremo C-terminal (Figura 6.1 A y B). La familia *CMF* posee 15 miembros que, en su mayoría, aún no han sido caracterizados funcionalmente.

Tras analizar la región promotora del gen *FITNESS* se observó que presenta varias repeticiones de unión a los FT DOF y MYB (Tabla 6.1), lo que sugiere una posible regulación de *FITNESS* por estas proteínas. Estudios recientes indican que las proteínas DOF poseen diversos roles en la expresión de genes asociados a procesos específicos de plantas como respuestas a luz, fitohormonas y defensa, desarrollo de semillas y germinación (Yanagisawa, 2002). Por otro lado, los miembros de la familia MYB también funcionan en una variedad de procesos específicos de plantas, son factores claves en las redes regulatorias que controlan el desarrollo, el metabolismo y las respuestas a estrés biótico y abiótico (Dubos y col., 2010).

En este trabajo se comprobó que *FITNESS* se expresa en cotiledones, en hojas (Figura 6.2, A y B) y en los sépalos de las flores (Figura 6.2 E) pero no así en silicuas (Figura 6.2 F) o raíces. Estos resultados confirman el patrón de expresión *in silico* obtenido de Genevestigator y BAR. Con las líneas generadas *promFITNESS::GUS* se realizaron ensayos en distintas

condiciones de estrés abiótico para analizar cómo se comporta *FITNESS*. Se observó que la expresión de *FITNESS* se reduce en todas las condiciones de estrés abiótico ensayadas, salinidad, estrés osmótico, estrés oxidativo (MV y H₂O₂), bajas temperaturas, altas temperaturas y privación de agua (Tabla 6.2), al igual que lo observado en el tratamiento de estrés oxidativo realizado por Scarpeci y col. (2008). Posteriormente, se realizaron tratamientos de estrés oxidativo y estrés salino con las líneas que presentan niveles alterados de *FITNESS*, donde se observó que la línea mutante *fitness* es más tolerante a ambos tratamientos (Figuras 6.20, 6.22 y 6.23).

Numerosos estudios han demostrado que las ERO controlan diversos procesos en plantas tales como el crecimiento y el desarrollo, las respuestas al estrés, la defensa contra patógenos y la señalización hormonal (Davletova y col., 2005). Para dilucidar el rol de *FITNESS* en *Arabidopsis* se alteró su expresión *in planta* y se observó que la misma provoca la desregulación de los niveles de ERO. En las líneas *FITNESS_{ox}* los niveles altos de ERO fueron acompañados por un fenotipo de roseta de menor diámetro, retardo del tiempo de floración y una reducción en la producción de semillas; siendo esto último opuesto a lo que ocurre en las líneas mutantes, donde el rendimiento es mayor (Figura 6.7). Uno de los mayores desafíos actuales es la obtención de cultivos con mayor producción de semillas que permitan alimentar a una población mundial en crecimiento. La productividad de una planta depende de cuán óptima es la fotosíntesis que realiza, ya que durante la luz del día las plantas necesitan controlar estrictamente la homeostasis redox para impedir la sobrecarga de ERO debido a un exceso de luz. La fotoprotección es un mecanismo que utilizan las plantas superiores para disipar térmicamente el exceso de energía lumínica. Las líneas *FITNESS_{ox}* poseen altos valores de NPQ, que es el proceso fotoprotector más importante en plantas superiores. Sin embargo, altos valores de NPQ crónicos representan un costo metabólico grande para la planta porque disminuye la asimilación de CO₂ por unidad de luz absorbida.

La superficie de la hoja generalmente es plana debido a un control genético. Un patrón de crecimiento temprano y regulado (Kuchen y col., 2012; Remmler y Rolland-Lagan, 2012) es esencial para mantener esta superficie plana, y su perturbación puede alterar la arquitectura de la superficie (Todd, 1985; Coen y col., 2004). Por ejemplo, si el centro crece más respecto al margen, la lámina podría formar una curvatura positiva tipo cuchara. El control de la curvatura de la superficie se ha estudiado mayormente desde una perspectiva biomecánica (Moullia, 2000; Sharon y col., 2002; Klein y col., 2007; Koehl y col., 2008; Liang y Mahadevan, 2009) y poco se conoce respecto a su regulación genética (Moullia, 2000; Sharon y col., 2002). La expresión alterada de *FITNESS* ocasiona defectos en la forma de las hojas, ya que en las líneas

sobreexpresantes se observan hojas con forma aplanada o curvada ligeramente hacia arriba, en cambio las hojas de las plantas control presentan una forma no tan aplanada, sino con algo de curva hacia abajo, y eso en la línea mutante *fitness* se exagera (Figura 6.8). Dadas estas diferencias morfológicas se cuantificaron los parámetros de forma largo, ancho y área de una hoja representativa y se evidenció que las hojas de las plantas *FITNESS_{ox}* son más cortas y anchas pero de igual área que la línea control WT (Figura 6.5 C). Dadas estas diferencias en la forma de las hojas, se midieron las áreas de las células epidérmicas de la cara adaxial de la hoja N°6 totalmente expandida. Las líneas *FITNESS_{ox}* presentan células con área significativamente más pequeña que la línea control WT y la mutante *fitness* (Figura 6.6). El crecimiento es principalmente el resultado de dos procesos celulares: división y expansión. Basado en el estado mitótico de las células, la expansión puede ser de dos tipos: proliferación o expansión mitótica y diferenciación asociada. La expansión asociada a diferenciación juega un rol muy importante en el crecimiento de la hoja, mientras que la proliferación, con la expansión mitótica provee al órgano de mayor número de células (Karidas y col., 2015). Teniendo en cuenta que el área total de la hoja es idéntica entre líneas y que el área de las células epidérmicas es menor en las líneas *FITNESS_{ox}* se puede proponer que el número de células en las líneas *FITNESS_{ox}* es mayor, es decir que habría un aumento en la actividad de proliferación y/o una disminución de la actividad de expansión.

Múltiples mecanismos moleculares convergen para el mantenimiento de un apropiado estado redox celular, ya que la falla para mantener el balance redox celular resulta en un crecimiento defectuoso o el inicio de PCD. Trabajos realizados por Kendall y col. (1983) mostraron que CAT juega un rol clave en la homeostasis redox de la hoja. La enzima CAT, localizada principalmente en peroxisomas de plantas, es responsable de detoxificar el H₂O₂ producido por la fotorrespiración y la β -oxidación de ácidos grasos (Mc. Clung, 1997). En condiciones fotorrespiratorias, las mutantes de *Arabidopsis cat2* acumulan H₂O₂ que conduce a una perturbación redox, acumulación de GSSG y el estrés oxidativo resultante puede inducir PCD (Queval y col., 2007). Las plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan *FITNESS*, crecidas en cámaras de cultivo en condiciones controladas, muestran una disminución importante del crecimiento en relación al control WT, acumulan ERO y muestran niveles alterados de metabolitos y transcriptos de enzimas involucradas en la fotorrespiración.

La fotorrespiración en plantas C3 puede considerarse un sumidero alternativo de flujo electrónico inducido por luz, lo que consume una apreciable cantidad de flujo electrónico durante periodos de disponibilidad restringida de CO₂ en los cloroplastos y alta irradiancia (Valentini y col., 1995). La fotorrespiración disminuye la eficiencia fotosintética debido a la

pérdida de CO₂ y amonio, y al consumo de ATP y poder reductor en las vías de reasimilación. Maurino y Weber (2013) especulan que una reducción en la tasa fotorrespiratoria debería aumentar la fijación de CO₂ y el crecimiento de la planta. En este contexto, se postula que el fenotipo de la mutante *fitness* está directamente relacionado con un mejor rendimiento fotosintético. La fotorrespiración representa una limitante en la ganancia de carbono y en consecuencia en el rendimiento de los granos (Foyer y col., 2009b). En este trabajo se ha demostrado que un único gen es capaz de modificar la fotorrespiración llevando a un aumento en el rendimiento de granos producidos. La acumulación de glioxilato puede llevar directamente a una regulación por retroalimentación entre la actividad fotosintética y el estado de activación de la RuBisCO (Häusler y col., 1996) por lo tanto el glioxilato puede verse como un inhibidor de la fotosíntesis *in vivo*.

Bajos niveles de citrato en las líneas *FITNESS_{ox}* también indican una interrupción en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. El complejo de la piruvato deshidrogenasa relaciona a la glicólisis con el catabolismo oxidativo de azúcares mediante la descarboxilación irreversible de piruvato a acetil-CoA, el cual se fusiona a oxaloacetato, etapa catalizada por la enzima citrato sintasa. La formación de acetil-CoA es una etapa altamente regulada y es inhibida cuando se forman ATP y NAD(P)H en la mitocondria como productos de la fotorrespiración, llevando al agotamiento de citrato (Bauwe y col., 2010).

También se detectaron cambios adicionales a nivel metabólico, como la acumulación diferencial de Serina y Pro en las líneas *FITNESS_{ox}*. Se demostró que Serina desregula la transcripción de genes que codifican para enzimas involucradas en la interconversión fotorrespiratoria de Glicina a Serina (Timm y col., 2013). En este estudio, los niveles de transcripto de SHMT se vieron aumentados en las líneas *FITNESS_{ox}* en relación a las mutantes *fitness* (Figura 6.19). Por otro lado, los niveles de Pro fueron mayores en las líneas *FITNESS_{ox}*. En *Arabidopsis* ha sido reportado que la concentración endógena de H₂O₂ en las hojas aumenta durante la aparición de las inflorescencias y, la inhibición de la actividad CAT2, se ha sugerido como el paso inicial de este aumento (Zimmermann y col., 2006). El aumento en los niveles de Pro se solapa con la acumulación de ERO en las líneas *FITNESS_{ox}*. El aminoácido Pro tiene un rol único en la adaptación al estrés. Múltiples y complejas vías regulatorias pueden alterar el metabolismo de Pro durante el estrés (Zhang y Becker, 2015) y su metabolismo se ha propuesto como auxiliar en mantener el balance NADPH/NADP⁺ y los niveles de GSH (Liang y col., 2013). La Pro tiene varios roles que incluyen utilización de energía, generación de ERO, PCD, reprogramación celular y desarrollo (Hare y Cress, 1997; Donald y col., 2001; Liu y col., 2012). Teniendo en cuenta que la Pro puede actuar como un potente antioxidante no

enzimático (Rejeb y col., 2014), su acumulación junto con el aumento de ERO en las líneas *FITNESS_{ox}* puede contribuir a aliviar el daño oxidativo en estas plantas, aunque no completamente.

También se detectaron bajos niveles de rafinosa y galactinol en las líneas *FITNESS_{ox}*. Su acumulación intracelular en las células vegetales se asocia con respuestas a estreses ambientales (ElSayed y col., 2013) y se ha propuesto que uno de los principales roles de estos oligosacáridos es detoxificar ERO en el citosol y en los cloroplastos (Nishizawa y col., 2008). Teniendo en cuenta que las líneas *FITNESS_{ox}* acumulan altos niveles de ERO, los bajos niveles determinados de galactinol y rafinosa podrían contribuir a una falla en la detoxificación y a la formación de lesiones espontáneas en las hojas o alternativamente éstos se agotaron debido a los altos niveles de ERO en las líneas *FITNESS_{ox}*.

Para empezar a desentramar la posible red regulatoria de *FITNESS* se analizó la expresión de más de 30 genes relacionados con las ERO en plantas de 5 semanas de edad de las líneas *fitness*, *FITNESS_{ox}*, y control WT en condiciones normales de crecimiento. El análisis de expresión se realizó mediante qPCR. Los genes incluidos codifican para FT, *heat shock proteins*, enzimas detoxificantes de ERO, miembros de vías de señalización y NADPH oxidasas. Dentro de los genes que se comportaron diferencialmente entre líneas se encuentran los que codifican para las enzimas detoxificantes *sAPX* y *CDS3*, que están aumentadas en las líneas sobreexpresantes, esto podría deberse a los mayores niveles de ERO que presentan estas líneas, es decir, la planta está aumentando sus mecanismos detoxificantes para reducir el nivel de ERO basal. Sin embargo, la enzima GPX1 está disminuida tanto en ausencia de *FITNESS* como en niveles aumentados de la misma. Las glutarredoxinas, son enzimas cuyo rol principal es reducir los puentes disulfuro de las proteínas oxidadas, aunque también se encuentran involucradas en el desarrollo de las flores y en la señalización del AS (Rouhier y col., 2008). En particular para *AtGRXC2*, recientemente se ha demostrado que cataliza la glutationilación inhibitoria del receptor tipo kinasa asociado a *brassinosteroid insensitive 1* (BRI1), BAK1 *in vitro* (Bender y col., 2015). En la Figura 6.13 C se observa que *GRXC2* está aumentado en la línea *FITNESS_{ox1}*, lo que podría relacionarse con los niveles elevados de ERO que presenta esta línea lo que provocaría la oxidación de proteínas. La actividad de la enzima codificada por *GRXC2* actuaría reduciendo los puentes disulfuro formados.

Se analizaron también los niveles de transcritos de genes relacionados con sentido y señalización del estrés en plantas. Entre los genes evaluados se encuentra *MBF1c*, que es un coactivador transcripcional altamente conservado, cuya expresión aumenta luego de infección por patógenos, salinidad, sequía, calor, H₂O₂, ABA y AS en *Arabidopsis* (Miller y col., 2008). Sin

embargo, en condiciones normales de crecimiento no se observaron niveles de transcritos significativamente diferentes entre las líneas en estudio.

La cadena de transporte fotosintético es la principal fuente de energía para el metabolismo celular en plantas, y también tiene el potencial de generar un exceso de ERO que ocasiona daño irreversible al aparato fotosintético durante condiciones adversas. Las ferredoxinas, como centro de distribución electrónica en el cloroplasto, contribuyen a la regulación redox y a la defensa antioxidante. Sin embargo, los niveles estacionarios de ferredoxina fotosintética disminuyen en plantas cuando son expuestas a condiciones de estrés ambiental (Liu y col., 2013). En particular, *AtFd2* es específica de hoja y se ha reportado regulación por luz (Vorst, 1993; Hanke y col., 2004). En la Figura 6.14 A se observa que los niveles de los transcritos de este gen no se acumularon diferencialmente entre las líneas en estudio.

Los estreses abióticos generalmente ocasionan una disfunción proteica. Durante un estrés es muy importante para la supervivencia de la célula mantener las proteínas en sus conformaciones funcionales e impedir que las mismas se agreguen en sus formas no nativas. Las proteínas del choque térmico/chaperonas (*Heat-shock proteins* (Hsps)/*chaperones*) son responsables del plegado, ensamble, translocación y degradación de las proteínas en muchos procesos celulares normales, además estabilizan proteínas y membranas, y pueden asistir el replegado de una proteína durante condiciones de estrés. Poseen un rol crucial en la protección de las plantas contra el estrés porque reestablecen las conformaciones proteicas normales y por lo tanto la homeostasis celular (Wang y col., 2004). Las proteínas del choque térmico pequeñas (*Small heat-shock proteins - sHSPs*) con una masa molecular monomérica de 15 a 42 kDa son sintetizadas por todos los organismos en respuesta a altas temperaturas y se ensamblan en oligómeros de nueve a más de 30 subunidades (Vierling, 1991). Las sHSPs son indetectables en tejidos vegetativos en ausencia de estrés, pero pueden acumularse rápidamente durante un estrés por calor (Vierling, 1991). Además del calor, algunas sHsps de plantas son producidas durante el desarrollo de semillas o estrés hídrico. En particular, Hsp17.6A codifica una sHsp de Arabidopsis, que aumenta la osmotolerancia cuando se la sobreexpresa (Sung y col., 2001). En la Figura 6.14 A se observa que la línea *fitness* mostró niveles significativamente aumentados de Hsp17.6B respecto a WT, al igual que lo reportado ante la sobreexpresión de *JUB1* (Wu y col., 2012). Para el gen *Hsp17.6A* no se observaron diferencias significativas entre las líneas en estudio.

Las plantas poseen sistemas de vigilancia sofisticados para sensar perturbaciones ambientales. Al percibir un estrés, la planta convierte las señales generadas en los sensores y

receptores en respuestas celulares a través de diferentes vías de transducción de señales. Las cascadas de transducción de MAPK traducen la percepción de estos estímulos ambientales externos en respuestas celulares fisiológicas y son mecanismos importantes para los mecanismos de adaptación al estrés dependiente de la transcripción. Estas cascadas de proteinquinasas están altamente conservadas entre eucariotas y consisten de 3 kinasas que actúan en serie: MAPK kinasa kinasas (MKKKs), MAPK kinasas (MKKs), y finalmente MAPKs, cada una de las cuales fosforila su blanco en residuos específicos para propagar una señal (Kim y col., 2011). En particular *MKK4* media la respuesta al estrés osmótico siendo regulada por la actividad de MAPK3 (Kim y col., 2011), es decir que *MKK4* y *MAPK3* se coexpresan positivamente. En la Figura 6.14 B se observa que la línea *fitness* mostró niveles significativamente aumentados de *MKK4* respecto al control WT y la línea *FITNESS_{ox1}* mostró niveles significativamente disminuidos de *MAPK3*. Kim y col. (2011) evaluaron líneas con niveles alterados de *MKK4* y evidenciaron que la mutante *mkk4* es más sensible al estrés salino y acumula ERO, mientras que la *MKK4_{ox}* es más tolerante al estrés salino. Esto coincide con nuestros resultados ya que la línea *fitness*, que mostró tolerancia al estrés salino (Ver sección 6.8), presenta niveles aumentados de *MKK4*.

ORS1 es un FT NAC de respuesta a H_2O_2 , que controla la senescencia en Arabidopsis. *ORS1* desencadena la expresión de genes asociados a senescencia a través de una red regulatoria que podría involucrar la intercomunicación con vías de señalización dependientes de salinidad y H_2O_2 (Balazadeh y col., 2011). En la Figura 6.14 B se observa que la línea *FITNESS_{ox1}* mostró niveles significativamente disminuidos de *ORS1*, lo que podría indicar que estas líneas tienen una senescencia alterada.

Por último, teniendo en cuenta que en plantas las NADPH oxidasas, homólogos de las oxidasas respiratorias (RBOHs), juegan un rol clave en la red de producción de ERO (Torres y Dangl, 2005; Suzuki y col., 2011) y que en Arabidopsis, las RBOHs constituyen una familia multigénica de 10 genes (*AtRBOHA* – *AtRBOHJ*) (Baxter y col., 2014) se decidió analizar los niveles de transcritos de 8 de estos genes en el contexto genético de las líneas con niveles alterados de *FITNESS*. En la Figura 6.15 se observa que dos de las líneas sobreexpresantes presentan niveles significativamente menores de *RbohB* que la línea control. Se ha reportado *RbohB* tiene un rol en las semillas en germinación ya que produce O_2^- en ese estadio. En particular se ha visto que las mutantes para este gen no maduran y poseen una reducción de la oxidación de proteínas (Müller y col., 2009). Por otro lado, en la Figura 6.15 se observa que la línea *FITNESS_{ox1}* presenta niveles significativamente menores del transcritos de *RbohE*, el cual se ha asociado a la producción de ERO en tejidos reproductivos. La ausencia de *RbohE* se

asocia a defectos en el desarrollo del polen (Xie y col., 2014). Todo esto junto con la observación de que las semillas de las líneas *FITNESS_{ox}* no son de tamaño y aspecto homogéneo, como en la línea control, sino que se observan semillas de menor tamaño y de forma irregular sugiere que la sobreexpresión de *FITNESS* altera procesos fundamentales de la fisiología de las semillas en *Arabidopsis*.

Respecto a los niveles de transcritos para las distintas isoformas de la enzima catalasa, se observó que los niveles de transcritos de *CAT2* están aumentados en las líneas *FITNESS_{ox}* (Figura 6.13), mientras que la actividad CAT medida entre líneas (Figura 6.10 B) no mostraron diferencias significativas con las plantas control WT. Por un lado, se ha reportado que la respuesta de las actividades enzimáticas es menor y más lenta que la de los transcritos, que muestran respuestas más rápidas y marcadas (Gibon y col. 2004). Además, en condiciones de alto H₂O₂ la proteína catalasa se inactiva (Weydert y Cullen, 2010) lo que está en concordancia con las medidas de actividad de las líneas.

Para analizar la proteína *FITNESS* *in vivo* por inmunodetección se generaron anticuerpos policlonales. Se expresó y purificó la proteína *FITNESS* recombinante, la cual presentó una masa molecular de 37 kDa, mayor a la MM teórica de ~23 kDa al visualizarla en un SDS-PAGE. Esta diferencia en el peso molecular teórico y el obtenido puede explicarse por una migración anómala de la proteína, que al presentar una gran cantidad de residuos cargados negativamente migra con una masa molecular mayor que la teórica. La diferencia de migración se debería a la presencia de dominios poliacídicos que modifican su movilidad electroforética durante un SDS-PAGE (Armstrong y col., 1993; García-Ortega y col., 2005). Una vez generados los anticuerpos se analizó la presencia de la proteína *FITNESS* en un extracto total de proteínas de plantas control WT y *FITNESS_{ox1}*, se observó que en ambas líneas se detectan dos bandas con peso molecular diferente al predicho para la proteína *FITNESS*, una de 33 kDa y otra de 46 kDa aproximadamente. Se ha reportado que la proteína CO es inestable y que podría ser degradada rápidamente y se sugiere que su abundancia está cercana a la abundancia de su transcritos (Suárez-López y col., 2001). La degradación de CO está relacionada con *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1)*, que actúa como un represor de la floración promoviendo la proteólisis mediada por ubiquitinación de CO en oscuridad, lo que aumentaría su MM en un SDS-PAGE (Liu y col., 2008). El índice de estabilidad de *FITNESS* es 54,61 (Expasy, protparam), lo que la clasifica como inestable, y las bandas visualizadas con los anticuerpos anti-*FITNESS*, podrían indicar que la proteína *FITNESS* sería degradada por un mecanismo similar a CO. Se requieren más ensayos para poder confirmar esta hipótesis.

El H_2O_2 no es solamente un producto de la fotorrespiración sino también un regulador de PCD. La formación de lesiones en las líneas *FITNESS_{ox}* puede ser considerada una consecuencia de la acumulación de ERO. El H_2O_2 de peroxisomas es capaz de desencadenar respuestas relacionadas a AS en tabaco y activar la vía de biosíntesis de AS dependiente de ICS en *Arabidopsis* (Zhang y col., 2016). Notablemente, las mutantes *fitness* acumulan mayor cantidad de AS, lo que se correlaciona con un aumento en la transcripción de *ICS1* (Figura 6.20 B). El perfil de expresión de las mutantes impacta en la vía de la hormona AS colocando a *PAD4* y *EDS1* corriente arriba de *ICS1*. *EDS1* y su compañero de interacción *PAD4* constituyen un núcleo regulatorio para la resistencia basal y son necesarios para la acumulación de AS (Parker y col., 1996; Glazebrook y col., 1997; Falk y col., 1999; Feys y col., 2001; Wiermer y col., 2005). Además, *EDS1* y *PAD4* participan en un *loop* de amplificación de defensa que responde a intermediarios de AS y ERO (Rusterucci y col., 2001). El descubrimiento de que los transcritos de *PAD4* y *EDS1* aumentan en las mutantes *fitness* confirma que la perturbación de ERO lleva a una modificación de la homeostasis hormonal. Wituszynska y col., (2013) reportaron que *LDS1*, *EDS1* y *PAD4* juegan un rol importante en la regulación del “fitness” de la planta y del rendimiento de semillas, que está de acuerdo a estos resultados. Los datos aquí reportados indican que la expresión alterada de *FITNESS* modula los procesos relacionados a AS. Las mutantes *fitness* muestran una alta activación transcripcional del gen *PR1*, marcador de respuesta a AS, cuya expresión es dependiente de *NPR1*. Además, la translocación de *NPR1* al núcleo en su forma monomérica activa es redox dependiente y mediada por AS. Además, recientemente se ha encontrado que GO interacciona físicamente con CAT en peroxisomas llevando a un ajuste reversible de los niveles de H_2O_2 (Zhang y col., 2016). La disociación del complejo GO-CAT induce un aumento en H_2O_2 celular que actúa como una señal que regula los procesos fisiológicos. Por un lado, AS promueve la producción de ERO que son esenciales para las respuestas de defensa; por otro lado, AS promueve la detoxificación de ERO que son esenciales para las respuestas antioxidantes como alta luz, bacterias avirulentas y salinidad (Rivas-San Vicente y Plasencia, 2011).

Se ha postulado que *JUB1* es un regulador central de los niveles de H_2O_2 y prepara a las plantas para el próximo estrés a través de una red regulatoria de genes (Wu y col., 2012). En este trabajo, las mutantes *fitness*, contrario a las líneas *FITNESS_{ox}*, mostraron una fuerte tolerancia al estrés oxidativo generado en cloroplastos por MV (Figura 6.21). En las plantas *fitness* y *FITNESS_{ox}*, la expresión de *JUB1* fue aumentada y disminuida, respectivamente (Figura 6.22). Este dato sugiere que *FITNESS* regularía negativamente la expresión de *JUB1* actuando corriente arriba de *JUB1* en una vía regulatoria de estrés ambiental. Cuando *FITNESS* está

ausente, la expresión de *JUB1* aumenta y las plantas están mejor preparadas para enfrentar el estrés oxidativo, como se observó en las plantas *fitness*.

En la Figura 6.29 se presenta un resumen de estos datos. En estadios tempranos de la generación de ERO cloroplásticas durante la fotosíntesis, los transcritos de *FITNESS* son fuertemente disminuidos como una respuesta antioxidante rápida de la planta (Scarpeci y col., 2008). Para imitar esta situación en forma permanente, los niveles de *FITNESS* fueron dramáticamente disminuidos en plantas de *Arabidopsis* durante todo su ciclo de vida (mutante *fitness*). Se observaron grandes ventajas en estas plantas: bajos niveles de fotorrespiración, bajos niveles de ERO, bajo NPQ y elevado AS. En consecuencia, la respuesta antioxidante está disminuida porque no hay necesidad de detoxificar ERO y el resultado es una planta con un funcionamiento mejorado que conduce a una mayor producción de semillas. De manera opuesta, si los niveles de *FITNESS* están permanentemente presentes en la célula, éstos conducen a mayores niveles de fotorrespiración y niveles de ERO muy altos que no pueden ser detoxificados a pesar del aumento de las actividades antioxidantes, lo que resulta en PCD.

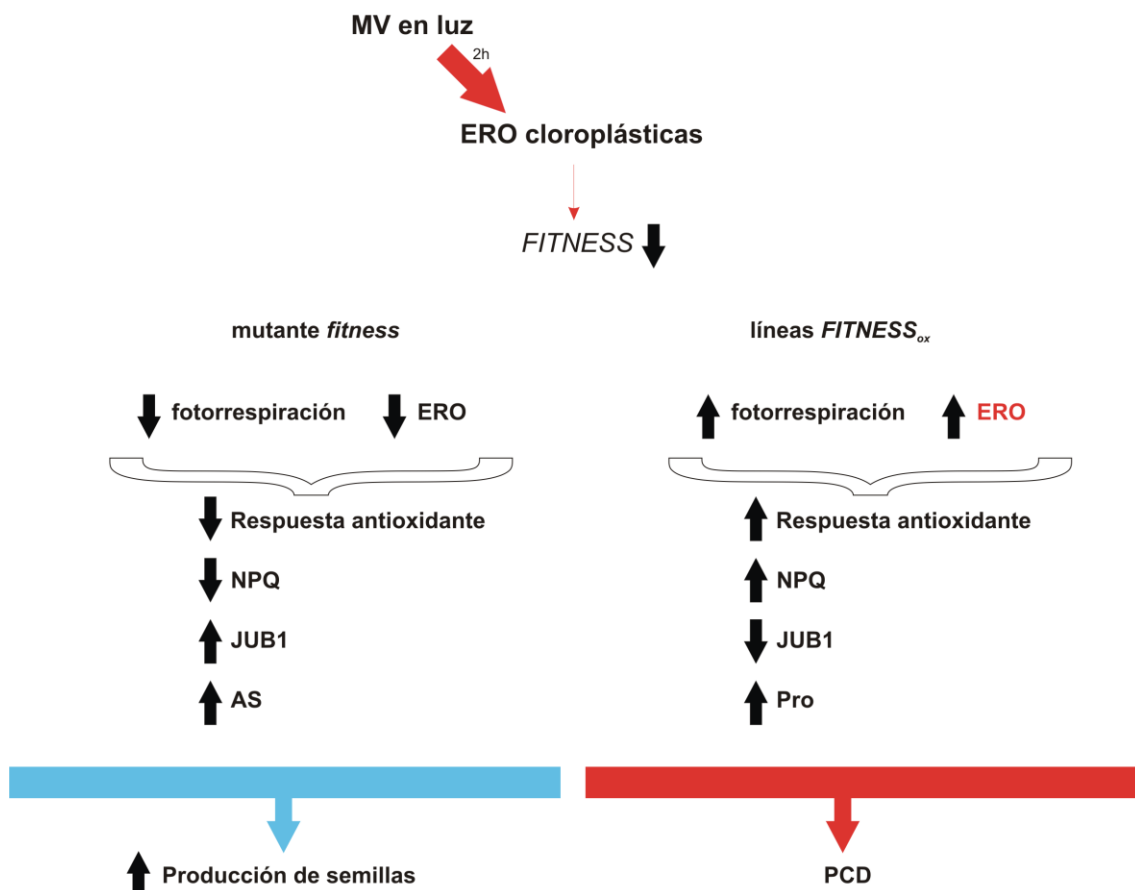


Figura 6.29: Esquema sobre la acción de *FITNESS*.

Conclusiones

7. CONCLUSIONES:

Respecto al gen *AtTX24* (*At5g44910*):

✓ Este gen codifica para una proteína de 241 AA (MM 27.51 kDa) y pI 6.14 clasificada por Meyers y col. (2002) como *AtTX24*, la cual pertenece a la familia de proteínas TX por presentar un dominio TIR y un dominio X.

✓ Mediante análisis filogenéticos se determinó que sus homólogos más cercanos en *Arabidopsis* son las proteínas *AtTX13*, *AtTX3* y *AtTX9*, todas de función aún desconocida.

✓ Tras la generación de líneas transgénicas *promAtTX24::GUS*, que contienen la fusión transcripcional del gen marcador GUS bajo el control de un fragmento de 915 pb ubicado corriente arriba del marco abierto de lectura de *AtTX24* hasta antes del ATG inicial del gen adyacente, se pudo determinar que este gen se expresa en raíces, hidátodos y sistema vascular de la hoja. Estos resultados confirman el patrón de expresión *in silico* presente en la base de datos BAR.

✓ Un gran número de proteinquinasas se co-expresan positivamente con *AtTX24*, las cuales habitualmente están involucradas en cascadas de transducción de señales, lo que indicaría que este gen podría formar parte de una cascada de señalización.

✓ Plantas de *Arabidopsis* con niveles disminuidos de *AtTX24* mostraron un fenotipo de mayor producción de raíces y, aunque no se observaron diferencias en la arquitectura y área de la roseta los tallos fueron de mayor longitud. Además, presentan menores niveles de chl a y carotenoides, y menores niveles de H₂O₂ que la línea control WT. En condiciones de estrés abiótico, la disminución de *AtTX24* se relacionó con mayor tolerancia de las plantas al estrés salino aunque, dicha tolerancia no pudo relacionarse con una acumulación diferencial del metabolito Pro al menos a los tiempos analizados (2,5 h y 25 h). Sin embargo, la fuerte expresión del gen *AtTX24* en raíces sugiere que podría participar en procesos relacionados a estrés abiótico a ese nivel. En cuanto a estrés oxidativo, las plantas con niveles reducidos de *AtTX24* mostraron menores señales de daño luego de la aplicación de MV. Esto podría indicar que en esta línea las ERO generadas durante el estrés aplicado son menores o se detoxifican más eficientemente.

✓ Niveles aumentados de *AtTX24* se relacionan con una mayor producción de hojas y las mismas permanecen verdes por más tiempo que en la línea control WT y con mayores niveles de chl a y carotenoides.

✓ En base a lo observado, la proteína AtTX24 podría participar en procesos de señalización relacionados a estrés abiótico, específicamente aquellos que tienen un componente salino y oxidativo.

Respecto al gen *AtERF112* (*At2g33710*):

✓ Este gen codifica para una proteína de 218 AA (MM 24.3 kDa) y pI 8.43, con un dominio AP2 localizado entre los residuos de 69 a 128 presente hacia el extremo N-terminal de la proteína.

✓ Pertenece al grupo X de la familia de FT ERF definido por Nakano y col. (2006), el cual incluye 8 genes (*AtERF108-115*) que han sido caracterizados funcionalmente, a excepción de *AtERF112*.

✓ Mediante análisis filogenéticos se determinó que sus homólogos más cercanos son las proteínas AtERF113, AtERF114 y AtERF108. AtERF108 y AtERF113 son transactivadores que participan en procesos de desarrollo de plantas así como en señalización de estrés biótico y abiótico (Krishnaswamy y col., 2011). AtERF114 es un nuevo regulador transcripcional del crecimiento de células en proliferación y yemas axilares de Arabidopsis. Las líneas sobreexpresantes de *AtERF108* y de *AtERF114* reportadas presentan un fenotipo de desarrollo con arquitectura alterada similar al observado para las líneas *AtERF112_{ox}*.

✓ Se analizó la localización subcelular de *AtERF112* mediante expresión estable en Arabidopsis usando la proteína GFP bajo el control del promotor 35S del CaMV, y se observó que la proteína de fusión AtERF112::GFP se acumula predominantemente en el compartimento nuclear de las células, lo que indicaría que podría actuar como un FT, como otros miembros del grupo X de la familia ERF.

✓ Se monitoreó el patrón de expresión del gen *AtERF112* en líneas transgénicas generadas en Arabidopsis que contienen la fusión transcripcional del gen reportero GUS bajo el control de una secuencia regulatoria de *AtERF112* de 250 pb, localizada corriente arriba del marco abierto de lectura a la que se denominó *promAtERF112::GUS*. El análisis de las líneas reveló una alta expresión de este gen en cotiledones, hidátodos, sistema vascular de las hojas, flores, anteras, estigma y polen. Estos resultados confirman el patrón de expresión *in silico* de este gen obtenido de la base de datos BAR. La expresión de *AtERF112* es ampliamente detectada en diferentes tejidos de la planta, por lo que este gen podría ejercer su rol en distintos órganos de la misma afectando la función de fitohormonas u otras señales de larga distancia no identificadas.

✓ Niveles disminuidos de *AtERF112* no generan cambios fenotípicos respecto a plantas controles tanto en condiciones normales de crecimiento como en condiciones de estrés abiótico.

✓ Niveles elevados de *AtERF112* produjeron plantas de *Arabidopsis* con alteraciones en su arquitectura. Las líneas presentaron un mayor número de hojas e inflorescencias con pérdida de la dominancia apical en condiciones normales de crecimiento. Cuando se les aplicaron diferentes estreses estas líneas resultaron sensibles a la deficiencia de agua, al estrés salino, osmótico y a la aplicación exógena de ABA y glucosa. Todo esto sugiere que las líneas sobreexpresantes muestran un fenotipo asociado a carencia de ABA lo cual puede ser el resultado de la disminución de su síntesis, del aumento de su degradación o de insensibilidad a esta hormona.

✓ *AtERF112* podría actuar en alguna vía de transducción de señales afectando la respuesta al estrés, modificando en *Arabidopsis* la respuesta a ABA de la planta.

Respecto al gen *FITNESS* (*At1g07050*):

✓ Este gen codifica para una proteína de 195 AA (MM 23.3 kDa) y pl 4.7, con un único dominio CCT localizado entre los residuos de Arg-151 y Glu-194 y pertenece a la familia CMF, donde ha sido clasificado como AtCMF3 (Cockram y col., 2012).

✓ Se validó la localización subcelular potencial de *FITNESS*, predicha como nuclear por análisis computacionales realizados con WoLF PSORT (Horton y col., 2007), mediante expresión estable en *Arabidopsis*, usando la proteína GFP como marcador, bajo el control del promotor 35S CaMV. La proteína de fusión *FITNESS::GFP* se acumuló predominantemente en el compartimento nuclear de las células, lo que indica que podría participar en procesos regulatorios.

✓ *FITNESS* se expresó en cotiledones, hojas jóvenes y hojas completamente expandidas. También se detectó expresión en los sépalos de las flores, pero no así en silicuas. Las regiones vasculares de las hojas no mostraron expresión, como así tampoco se observó expresión en la raíz en ningún momento del desarrollo. En hojas de plantas adultas la expresión de *FITNESS* fue débil, mostrando ausencia de expresión hacia la punta.

✓ Niveles elevados de *FITNESS* provocaron en *Arabidopsis* un fenotipo de desarrollo alterado. Las líneas presentaron tamaño reducido y hojas de color verde pálido, con lesiones espontáneas en los bordes y de forma redondeadas e hiponásticas. Las mutantes *fitness* presentaron un fenotipo que fue casi indistinguible, en cuanto a morfología, de las plantas

control WT, aunque en estadios avanzados de desarrollo, sus hojas se vieron ligeramente más estrechas que las plantas control WT debido a una mayor curvatura hacia abajo de sus bordes y se observó que las mismas producen un mayor número de semillas en relación al control WT, lo cual se pudo relacionar con un valor de NPQ significativamente menor en relación al control WT, lo que indicaría que estas plantas llevan adelante una fotosíntesis más eficiente.

✓ Los niveles alterados de *FITNESS* provocaron también cambios metabólicos y bioquímicos en las plantas de Arabidopsis.

✓ Altos niveles de *FITNESS* indujeron una alta producción de ERO, pero que depende de la duración del día y genera lesiones en los bordes de las hojas.

✓ Las líneas *FITNESS* presentan alteraciones en las vías de fotorrespiración, ya que las mutantes *fitness* presentan niveles significativamente menores de los transcritos correspondientes a los dos genes GO, lo que sugeriría que la vía fotorrespiratoria es menos activa en las plantas *fitness*; además, los niveles del metabolito glioxilato fueron significativamente mayores en las líneas *FITNESS_{ox}*, lo que sugiere que estas líneas tienen fotorrespiración aumentada. Finalmente, utilizando el marcador fluorescente H₂DCF-DA se pudo corroborar que los niveles de ERO acumulados en las distintas líneas dependen de los niveles de expresión de *FITNESS* y adicionalmente se observó que la acumulación de ERO en las líneas *FITNESS_{ox}* presenta un patrón compatible con localización peroxisomal.

✓ *FITNESS* provoca cambios en los niveles de AS.

✓ Las mutantes *fitness* poseen tolerancia aumentada al estrés oxidativo.

✓ Se ha postulado que *JUB1* es un regulador central de los niveles de H₂O₂ y prepara a las plantas para el próximo estrés a través de una red regulatoria de genes (Wu y col., 2012). En las plantas *fitness* y *FITNESS_{ox}*, la expresión de *JUB1* fue aumentada y disminuida, respectivamente. Este dato sugiere que *FITNESS* regularía negativamente la expresión de *JUB1* actuando corriente arriba de *JUB1* en una vía regulatoria de estrés ambiental. Cuando *FITNESS* está ausente, la expresión de *JUB1* aumenta y las plantas están mejor preparadas para enfrentar el estrés oxidativo, como se observó en las plantas *fitness*.

Resumen

8. RESUMEN

Una de las funciones más cruciales de las células vegetales es su capacidad para responder a las fluctuaciones de su ambiente (Greene, 2002) y el estrés ambiental representa el factor limitante más importante para la productividad vegetal y el rendimiento de las cosechas (Allen, 1995). Aproximadamente el 40% de las proteínas codificadas en genomas eucariotas son PFD (Horan y col., 2008). En *Arabidopsis*, aún se desconoce la función de cada uno de sus genes, a pesar de que su genoma fue secuenciado hace más de 15 años (*Arabidopsis Genome Initiative, 2000*). Es por esto que uno de los principales desafíos de la biología moderna es poder dilucidar la función de cada uno de ellos.

En nuestro laboratorio se ha analizado en forma global el transcriptoma de *Arabidopsis* utilizando chips de Affymetrix (Gene Chip), detectando los cambios de expresión génica luego de someter plántulas a estrés oxidativo mediante la aplicación del herbicida MV durante 2 h (Scarpeci y col., 2008). La aplicación del herbicida durante un tiempo corto favorece la detección de genes de respuesta temprana, los cuales se espera que codifiquen para proteínas regulatorias o de señalización tales como proteinquinasas o proteínfosfatasa y FT. Como resultado se identificaron 30 genes que codifican para FT, 23 que codifican para señalización y 68 de función no asignada, de los cuales se seleccionaron tres para caracterizar en este trabajo: *AtTX24* (*At5g44910*), *AtERF112* (*At2g33710*) y *FITNESS* (*At1g07050*).

Al inicio de esta tesis doctoral, no había ningún dato biológico reportado respecto a localización subcelular, expresión tejido y órgano específico, y la caracterización fenotípica, bioquímica y fisiológica de líneas con niveles alterados en los tres genes seleccionados para su estudio que pudieran aportar datos respecto a su posible función biológica. Durante este trabajo, se analizaron los efectos de aumentar o disminuir los niveles de expresión de los mismos en relación a plantas controles de *Arabidopsis*. Por otro lado, se generaron líneas transgénicas de fusión a genes reporteros que permitieron determinar la localización subcelular de los productos génicos de *AtERF112* y *FITNESS*, y el patrón de expresión tejido-específico para los tres genes en estudio.

Con los resultados obtenidos se concluye que:

✓ La proteína **AtTX24**, es una proteína que pertenece a la familia de proteínas TX por presentar un dominio TIR y un dominio X. Se expresa en raíces, hidátodos y sistema vascular de la hoja. Plantas de *Arabidopsis* con niveles disminuidos de *AtTX24* mostraron un

fenotipo de mayor producción de raíces y, aunque no se observaron diferencias en la arquitectura y área de la roseta, los tallos fueron de mayor longitud. A su vez mostraron menores niveles de chl a y carotenoides, y presentaron menores niveles de H₂O₂ basales que la línea control WT. En cuanto a situaciones de estrés abiótico, la disminución de *AtTX24* generó plantas más tolerantes al estrés salino aunque, la tolerancia observada no pudo relacionarse con una acumulación diferencial del metabolito Pro al menos a los tiempos analizados (2,5 h y 25 h). Sin embargo, la fuerte expresión del gen *AtTX24* en raíces sugiere que podría participar en procesos relacionados a estrés abiótico a ese nivel. Respecto al estrés oxidativo, las plantas con niveles reducidos de *AtTX24* mostraron menores señales de daño luego de la aplicación de MV, lo que concuerda con la menor acumulación de H₂O₂ observada luego de este tratamiento. Esto podría indicar que en la línea mutante *attx24* se generan menos o se detoxifican más eficientemente las ERO generadas durante el estrés aplicado. Niveles aumentados de *AtTX24* se relacionan con una mayor producción de hojas y las mismas permanecen verdes por más tiempo que en la línea control WT y con mayores niveles de chl a y carotenoides. Un gran número de proteinquinasas se co-expresan positivamente con *AtTX24*, las cuales habitualmente están involucradas en cascadas de transducción de señales, lo que indicaría que este gen participa en procesos de señalización relacionados a estrés abiótico, específicamente aquellos que tienen un componente salino y oxidativo.

✓ La proteína **AtERF112**, codificada por el gen *At2g33710*, pertenece al grupo X de la familia de FT ERF y se acumuló predominantemente en el compartimento nuclear de las células. Se expresó en cotiledones, hidátodos, sistema vascular de las hojas, flores, anteras, estigma y polen. La expresión de *AtERF112* es ampliamente detectada en diferentes tejidos de la planta, por lo que este gen podría ejercer su rol en distintos órganos de la planta afectando la función de fitohormonas u otras señales de larga distancia no identificadas. Niveles disminuidos de *AtERF112* no generan cambios fenotípicos al compararlas con plantas controles tanto en condiciones normales de crecimiento como en condiciones de estrés abiótico. Niveles elevados de *AtERF112* produjeron plantas de *Arabidopsis* con alteraciones en su arquitectura. Las líneas presentaron un mayor número de hojas e inflorescencias con pérdida de la dominancia apical en condiciones normales de crecimiento. Cuando se les aplicaron diferentes estreses estas líneas resultaron sensibles a la deficiencia de agua, al estrés salino, osmótico y a la aplicación exógena de ABA y glucosa. Todo esto sugiere que las líneas sobreexpresantes muestran un fenotipo asociado a carencia de ABA lo cual puede ser el resultado de la disminución de su síntesis, del aumento de su degradación o de insensibilidad a esta hormona.

AtERF112 podría actuar en alguna vía de transducción de señales afectando la respuesta al estrés, modificando en Arabidopsis la respuesta a ABA de la planta.

✓ La proteína **FITNESS** posee un único dominio CCT y pertenece a la familia CMF, donde ha sido clasificado como AtCMF3. Se localizó en el compartimento nuclear de las células, lo que indica que podría participar en procesos regulatorios. Se expresó en cotiledones, hojas jóvenes, hojas completamente expandidas y en los sépalos de las flores. Niveles elevados de *FITNESS* provocaron en Arabidopsis un fenotipo de desarrollo alterado. Las líneas presentaron tamaño reducido y hojas de color verde pálido, con lesiones espontáneas en los bordes y de forma redondeadas e hiponásticas. Las mutantes *fitness* presentaron un fenotipo casi indistinguible, en cuanto a morfología, de las plantas control WT, aunque en estadios avanzados de desarrollo, sus hojas se vieron ligeramente más estrechas que las plantas control WT debido a una mayor curvatura hacia abajo de sus bordes y se observó que las mismas producen un mayor número de semillas en relación al control WT, lo cual se relacionó con un valor de NPQ significativamente menor en relación al control WT, lo que indicaría que estas plantas llevan adelante una fotosíntesis más eficiente. Los niveles alterados de *FITNESS* provocaron también cambios metabólicos y, bioquímicos en las plantas de Arabidopsis. Altos niveles de *FITNESS* se relacionaron con una alta producción ERO, lo cual depende de la duración del día y genera lesiones en los bordes de las hojas. Las líneas *FITNESS* presentaron alteraciones en las vías de fotorrespiración. Utilizando el marcador fluorescente H₂DCF-DA se pudo corroborar que los niveles de ERO acumulados en las distintas líneas dependen de los niveles de expresión de *FITNESS* y adicionalmente se observó que la acumulación de ERO en las líneas *FITNESS_{ox}* presenta un patrón compatible con localización peroxisomal. Además, *FITNESS* provoca cambios en los niveles de AS y las mutantes *fitness* poseen tolerancia aumentada al estrés oxidativo. Se ha postulado que *JUB1* es un regulador central de los niveles de H₂O₂ y prepara a las plantas para el próximo estrés a través de una red regulatoria de genes (Wu y col., 2012). En las plantas *fitness* y *FITNESS_{ox}*, la expresión de *JUB1* fue aumentada y disminuida, respectivamente. Este dato sugiere que *FITNESS* regularía negativamente la expresión de *JUB1*, actuando corriente arriba de *JUB1* en una vía regulatoria de estrés ambiental. Cuando *FITNESS* está ausente, la expresión de *JUB1* aumenta y las plantas están mejor preparadas para enfrentar el estrés oxidativo, como se observó en las plantas *fitness*.

Material Suplementario

9. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla 3.1: Cebadores utilizados para la selección de mutantes *knock-out* de la línea SALK y para el clonado de los genes en estudio.

Nombre	Secuencia 5'→3'
<i>AtTX24 forw</i>	AAGCTTATGGCAGAACCACCACCG
<i>AtTX24 rev con stop</i>	TCTAGATCATCTGTTTGGTTGGGTCC
<i>AtTX24 rev sin stop</i>	TCTAGATCTGTTTGGTTGGGTCCGTAGAC
<i>AtTX24 prom forw</i>	AAGCTTGAGTTTCATTTTGGTTACACATTGTTGC
<i>AtTX24 prom rev</i>	TCTAGAGGGAGGGTTGAGAGTTGAG
<i>FITNESS forw</i>	GGATCCATGGATACACAAAGGTTGCC
<i>FITNESS rev con stop</i>	TCTAGATTAAGTCTCTCTTTTTCACGAAC
<i>FITNESS rev sin stop</i>	GTCGACAGTCTCTCTTTTTCACGAACC
<i>FITNESS prom forw</i>	TCTAGAAATTCTGAAGAAGAACAGGG
<i>FITNESS prom rev</i>	GGATCCATATCTCTTATCTTTTTCTCTG
<i>ERF112 forw</i>	GGATCCATGCATAGCGGGAAGAGACC
<i>ERF112 rev sin stop</i>	GTCGACTTTTCGTCGTTTGTGGATAC
<i>ERF112prom rev</i>	CGGGATCCTATCCGATGATGTCAA
<i>ERF112prom f250</i>	ATTCTAGAGGAAAATTAAGAGATG
RP <i>FITNESS</i>	GCTCTAACGAACTCACGTGGG
RP <i>AtTX24</i>	TCGACTCCTCGATCTTTGTG
LB	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT

Tabla 3.2: Cebadores utilizados para qPCR.

Nombre	Secuencia 5' → 3'
<i>PP2a fw</i>	CCTGCGGTAATAACTGCATCT
<i>PP2a rev</i>	CTTCACTTAGCTCCACCAAGCA
<i>FITNESS At1g07050 fw</i>	ACAAAGACTTGGGTCTGAAGCTG
<i>FITNESS At1g07050 rev</i>	TCTGGTGATCAGACCAAGCATCG
<i>JUB1 At2g43000 fw</i>	TCTCCAGCTCAACAAGCAGAGG
<i>JUB1 At2g43000 rev</i>	CGGTTTGGTGGTAAGATGGTTGGG
<i>EDS1 At3g48090 fw</i>	GCTCAATGACCTTGGAGTGAGC
<i>EDS1 At3g48090 rev</i>	TCTTCTCTAATGCAGCTTGAACG
<i>DREB2a At5g05410 fw</i>	TGTCTGGAGAATGGTGCGGAAG
<i>DREB2a At5g05410 rev</i>	TCGCTCAGCCAATGCTTATCCG
<i>PAD4 At3g52430 fw</i>	AGATACGCGAGCACAACGCAAG
<i>PAD4 At3g52430 rev</i>	TTCTCGCCTCATCCAACCACTC
<i>ICS1 At1g74710 fw</i>	GCTTGGCTAGCACAGTTACAGC
<i>ICS1 At1g74710 rev</i>	CACTGCAGACACCTAATTGAGTCC
<i>ICS2 At1g18870 fw</i>	GCCTAGAGGTGATTCAAAGGTTCCG
<i>ICS2 At1g18870 rev</i>	ACTCAAGATCGTCTTTGGGACTGG
<i>GO2 AT3G14420 fw</i>	AGTGGCTCCAGACAATCACCAAG
<i>GO2 AT3G14420 rev</i>	AGTGGCTCCAGACAATCACCAAG
<i>GO1 At3g14415 fw</i>	ATGACTCTGGCTTGGCTTCG
<i>GO1 At3g14415 rev</i>	AGCTTGAATCGCTATCCTTGCATC
<i>SHMT At4g13930 fw</i>	AAAGCCAATGCTGTTGCCCTTG
<i>SHMT At4g13930 rev</i>	CAGAGCTTCTCAACCTTGTTTCCG
<i>NPR1 At1g64280 fw</i>	AACGATTCTTCCC GCGCTGTTC
<i>NPR1 At1g64280 rev</i>	TTCTCCGCAAGCCAGTTGAGTC
<i>PR1 At2g14610 fw</i>	ACATGTGGGTTAGCGAGAAGGC
<i>PR1 At2g14610 rev</i>	AAACTCCATTGCACGTGTTCCG
<i>CDS1 At1g08830 fw</i>	GGCCAAGTAACAATGGCGAAAGG
<i>CDS1 At1g08830 rev</i>	CACTCACAGTGGTCACACCATC
<i>CDS2 At2g28190 fw</i>	ATGACACACGGAGCTCCAGAAG
<i>CDS2 At2g28190 rev</i>	TTGTTGTTTCTGCCACGCCATC

<i>CDS3 At5g18100 fw</i>	ACGTCCGAGGCTGTCTTCAATTC
<i>CDS3 At5g18100 rev</i>	TTCCCGGTGACATGAGTAGTTCCG
<i>CAT1 At1g20630 fw</i>	TCGGGAAGGAGAACAACCTTCAAGC
<i>CAT1 At1g20630 rev</i>	TCACGAATCGTTCTTGCCTGTC
<i>CAT2 At4g35090 fw</i>	TCAAGGAGCCTGGAGAGAGATACC
<i>CAT2 At4g35090 rev</i>	CTGGATGAATCGTTCTTGCCTCTC
<i>CAT3 At1g20620 fw</i>	ACAGATCATGGGCACCAGACAG
<i>CAT3 At1g20620 rev</i>	AAGGATCGATCAGCCTGAGACC
<i>GPX1 At2g25080 fw</i>	CAGAGCTTTCACATCTGTACG
<i>GPX1 At2g25080 rev</i>	GGCTCTTGAAACCAAACCTGA
<i>APX At4g08390 fw</i>	GCACCAGGAGGACAGTCATG
<i>APX At4g08390 rev</i>	GGGCTACAGCGTAATCCTTG
<i>MDHAR At1g63940</i>	CCGGATTATCTCTTTGGTGTCC
<i>MDHAR At1g63940</i>	CATAGCCGACCATCAGCCATTC
<i>DHAR At1g19570</i>	GGTTCGACTAAACCGGGAAG
<i>DHAR At1g19570</i>	CTGGGACTTTACCTTCTGGAC
<i>2CysA At3g11630</i>	CAATCTTGGTATTGGCCGAAGCG
<i>2CysA At3g11630</i>	CTGGATGTACTGTAATGCCTGGAG
<i>2CysB At5g06290</i>	TTCTCTCTGTTCCGGGTTCTCC
<i>2CysB At5g06290</i>	ACCGACCAGTGGTAAATCATCAGC
<i>GRXC2 At5g40370 fw</i>	ATCACATCGGTGGCTGTGATGC
<i>GRXC2 At5g40370 rev</i>	ACAGCGGAACCAACTTCCCATC
<i>MBF1c At3g24500 fw</i>	GCCTGCGGCGATGGATCGTG
<i>MBF1c At3g24500 rev</i>	CCATCTTCGCAAGCAGACCTGA
<i>AtFd2 At1g60950</i>	CTCTTCGGTCTCAAATCAGG
<i>AtFd2 At1g60950</i>	CTTTACCAGCACAGCTCGAA
<i>Hsp17.6A At5g12030 fw</i>	TGCGGCTTGTAATGACGGTGTG
<i>Hsp17.6A At5g12030</i>	TTGGCTCAGGAGGAGGAAGTTTCG
<i>Hsp17.6B At2g29500 fw</i>	TGGATCAGGTTAAGGCTGCGATGG
<i>Hsp17.6B At2g29500 rev</i>	TCAGCCTTAGGCACCGTAACAGTC
<i>MAPK3 At3g45640 fw</i>	CCCAACTTCCCACGTCAGCCCTTAGC
<i>MAPK3 At3g45640 rev</i>	TGGCTCATCATTCGGGTCGTGCAA
<i>MKK4 At1g51660 fw</i>	GCTTGCAGAGAGAACC GG GAAAGGA

<i>MKK4 At1g51660 rev</i>	GGAGAAGAAGACGAGGACAGAGGACGA
<i>ORS1 At3g29035 fw</i>	TCTCCGACCAAACAACCGATGAC
<i>ORS1 At3g29035 rev</i>	AGTCGATCCGGAACCAAACATGG
<i>RbohA At5g07390 fw</i>	GCTGTTTCAGTGCTAAAGTTGC
<i>RbohA At5g07390 rev</i>	GCTTGGTCTTGACAAGTGAAGCG
<i>RbohB At1g09090 fw</i>	GTCAAAGTGGGCTCTTCATAGCTG
<i>RbohB At1g09090 rev</i>	CGATTAACAGCCTCGGAAACCTG
<i>RbohD At5g47910 fw</i>	ATGATCAAGGTGGCTGTTACCC
<i>RbohD At5g47910 rev</i>	ATCCTTGTGGCTTCGTCATGTG
<i>RbohE At1g19230 fw</i>	TTCTATCCGGAACACGGGTGAG
<i>RbohE At1g19230 rev</i>	ACTGAAGACTTCCTTCCAGTTGGG
<i>RbohF At1g64070 fw</i>	CGGTTCGACTGCTTAAGGTTGC
<i>RbohF At1g64070 rev</i>	GAGTTGGTTTCGACATTTGTAGCG
<i>RbohG At4g25090 fw</i>	GACATTGTTGCTGGGACAAGGG
<i>RbohG At4g25090 rev</i>	TGCTCCACAATAGAACACTCCAAC
<i>RbohI At4g11230 fw</i>	AGCAACAGGAACAAGCTGAATGC
<i>RbohI At4g11230 rev</i>	ACTGTGATCCGACGAGATGTTGC
<i>RbohJ At3g45810 fw</i>	ACGAGACTTCTCGCATAGGTGTG
<i>RbohJ At3g45810 rev</i>	TTAGCGGTGGAACAAGCGTTGG

Referencias Bibliográficas

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal, S. y Grover, A. (2006) Molecular biology, biotechnology and genomics of flooding-associated low O₂ stress response in plants. *Crit Rev Plant Sci* 25:1–21.

Allen, R.D. (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol.* 107:1049-1054.

Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S. (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot* 53:1331-1341.

Apel, K. y Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 55:373-399.

Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796-815.

Armstrong, D.J., Roman, A. (1993) The anomalous electrophoretic behavior of the human papillomavirus type 16 E7 protein is due to the high content of acidic amino acid residues. *Biochem Biophys Res Co.* 192:1380-7.

Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., Grosdidier, A., Hernandez, C., Ioannidis, V., Kuznetsov, D., Liechti, R., Moretti, S., Mostaguir, K., Redaschi, N., Rossier, G., Xenarios, I., Stockinger, H. (2012) ExPASy: SIB bioinformatics resource portal, *Nucleic Acids Res*, 40:W597-W603.

Asada, K. (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol*, 141:391-396.

Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., Struhl, K. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York.

Bailey-Serres, J. y Voesenek, L.A. (2008) Flooding stress: acclimations and genetic diversity. *Annu Rev Plant Biol*, 59:313–339.

Baker, A. y Graham, I. (2002) *Plant peroxisomes. Biochemistry, cell biology and biotechnological applications*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.

Baker, N.R. y Rosenqvist, E. (2004) Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J Exp Bot* 55:1607-1621.

Balazadeh, S., Kwasniewski, M., Caldana, C., Mehrnia, M., Zanon, M.I., Xue, G.P., Mueller-Roeber, B. (2011) ORS1, an H₂O₂-responsive NAC transcription factor, controls senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant*. 4:346-60.

Ball, L., Accotto, G., Bechtold, U., Creissen, G., Funck, D., Jimenez, A., Kular, B., Leyland, N., Mejia-Carranza, J., Reynolds, H., Karpinski, S., y Mullineaux, P.M. (2004) Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defense gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 2448–2462.

Bartoli, C.G., Casalagué, C.A., Simontacchi, M., Marquez-Garcia, B., Foyer, C.H. (2013) Interactions between hormone and redox signalling pathways in the control of growth and cross tolerance to stress. *Environ Exp Bot*, 94, 73–88.

Bates, L. S., Waldren, R. P., Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*, 39:205-207.

Bauwe, H., Hagemann, M., Fernie, A.R. (2010) Photorespiration: players, partners and origin. *Trends Plant Sci*, 15:330-336.

Bailey-Serres, J., Mittler, R. (2006) The roles of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol*, 141: 311

Baxter, A., Mittler, R., Suzuki, N. (2014) ROS as key players in plant stress signaling. *J Exp Bot*, 65:1229-1240.

Beauchamp, C. y Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44:276-287.

Belkhadir, Y., Subramaniam, R., Dangl, J.L. (2004) Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Curr Opin Plant Biol*, 7: 391–399.

Bender, K.W., Wang, X., Cheng, G.B., Kim, H.S., Zielinski, R.E., Huber, S.C. (2015) Glutaredoxin AtGRXC2 catalyses inhibitory glutathionylation of *Arabidopsis* BRI1-associated receptor-like kinase 1 (BAK1) in vitro. *Biochem J*, 467:399-413.

Berrocal-Lobo, M., Molina, A., Solano, R. (2002) Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J*, 29: 23–32.

Bevan, M. y Walsh, S. (2004) Positioning *Arabidopsis* in Plant Biology. A Key Step Toward Unification of Plant Research. *Plant Physiology*, 135:602-606.

Bick, J.A., Setterdahl, A.T., Knaff, D.B., Chen, Y., Pitcher, L.H., Zilinskas, B.A., Leustek, T. (2001) Regulation of the plant-type 50-adenylyl sulfate reductase by oxidative stress. *Biochemistry*, 40:9040–9048.

Boeckmann, B., Bairoch, A., Apweiler, R., Blatter, M.C., Estreicher, A., Gasteiger, E., Martin, M.J., Michoud, K., O'Donovan, C., Phan, I., y col. (2003) The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res*, 31:365–370.

Bolle, C., Schneider, A. y D. Leister. (2011) Perspectives on Systematic Analyses of Gene Function in *Arabidopsis thaliana*: New Tools, Topics and Trends. *Current Genomics*, 12, 1-14.

Bolouri-Moghaddam, M.R., Le Roy, K., Xiang, L., Rolland, F. y van den Ende, W. (2010) Sugar signaling and antioxidant network connections in plant cells. *FEBS J*, 277:2022-2037.

Bolter, B. y Soll, J. (2001) Ion channels in the outer membranes of chloroplasts and mitochondria: open doors or regulated gates? *EMBO J*, 20: 935-940.

Bostock, R.M. (2005) Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. *Annu Rev Phytopathol*, 43, 545–580.

Boveris, A. (1984) Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol*, 105: 429-435.

Bowler, C., Alliotte, T., De Loose, M., Van Montagu, M., Inzé, D. (1989) The induction of manganese superoxide dismutase in response to stress in *Nicotiana plumbaginifolia*. *EMBO J*, 8: 31-38.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.

Bray, E.A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E. (2000) Response to abiotic stress. En *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan B, Gruissem W, Jones R) American Society of Plant Biologists, Rockville, USA, 1158-1203.

Burch-Smith, T. M., Schiff, M., Caplan, J. L., Tsao, J., Czymmek, K., Dinesh-Kumar, S. P. (2007a) A Novel Role for the TIR domain in association with pathogen-derived elicitors. *PLoS Biol*, 5:e68.

Burch-Smith, Tessa M. y Kumar-Dinesh Savithramma P. (2007b) The function of plant TIR domains. *Science*, 401:pe46.

Cai, X.T., Xu, P., Zhao, P.X., Liu, R., Yu, L.H., Xiang, C.B. (2014) Arabidopsis ERF109 mediates cross-talk between jasmonic acid and auxin biosynthesis during lateral root formation. *Nat Commun*, 5:5833.

Caplan, J.L., Kumar, A.S., Park, E., Padmanabhan, M.S., Hoban, K., Modla, S., Czymmek, K., Dinesh-Kumar, S.P. (2015) Chloroplast stromules function during innate immunity. *Dev Cell*, 34: 45-57.

Chaouch, S. y Noctor, G. (2010) Myo-inositol abolishes salicylic acid-dependent cell death and pathogen defence responses triggered by peroxisomal H₂O₂. *New Phytol*, 188:711-718.

Charfeddine, M., Saïdi, M.N., Charfeddine, F., Hammami, A., Bouzid, R.G. (2015) Genome-wide analysis and expression profiling of the ERF transcription factor family in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Mol Biotechnol*, 57: 348–358.

Chaves, M.M. y Oliveira, M.M. (2004) Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *J Exp Bot*, 55:2365–2384.

Cheng, M.C., Liao, P.M., Kuo, W.W. y Lin T.P. (2013) The Arabidopsis ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 regulates abiotic stress-responsive gene expression by binding to different cis-acting elements in response to different stress signals. *Plant Physiol*, 162, 1566–1582.

Cheong, Y.H., Chang, H.S., Gupta, R., Wang, X., Zhu, T., Luan, S. (2002) Transcriptional Profiling Reveals Novel Interactions between Wounding, Pathogen, Abiotic Stress, and Hormonal Responses in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 129:661-77.

Chew, O., Whelan, J., y Millar, A.H. (2003) Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in Arabidopsis mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *J. Biol. Chem*, 278: 46869– 46877.

Clough, S.J., Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 16:735-743.

Cockram J, Jones H, Leigh FJ, O'Sullivan D, Powell W, y col. (2007) Control of flowering time in temperate cereals: genes, domestication and sustainable productivity. *J Exp Bot*, 58:1231–1244.

Cockram, J., Thiel, T., Steuernagel, B., Stein, N., Taudien, S., Bailey, P., O'Sullivan, D.M. (2012) Genome dynamics explain the evolution of flowering time CCT domain gene families in the Poaceae. *P Natl Acad Sci USA*, 7:e45307.

Coen, E., Rolland-Lagan, A.G., Matthews, M., Bangham, J.A., Prusinkiewicz, P. (2004) The genetics of geometry. *P Natl Acad Sci USA*, 101:4728–4735.

Corpas, F.J., Fernández-Ocaña, A., Carreras, A., Valderrama, R., Luque, F., Esteban, F.J., Rodríguez-Serrano, M., Chaki, M., Pedrajas, J.R., Sandalio, L.M., del Río, L.A., Barroso, J.B. (2006) The expresión of different superoxide dismutase forms is cell-type dependent in olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Plant Cell Physiol*, 47:984-994.

Cosio, C. y Dunand, C. (2009) Specific functions of individual class III peroxidase genes. *J. Exp. Bot*, 60:391–408.

Couée, I., Sulmon, C., Gouesbet, G., El Amrani, A. (2006) Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot*, 57:449-459.

Conklin, P.L., Barth, C. (2004) Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant Cell Environ*, 17: 959–970.

Creissen, G., Firmin, J., Fryer, M., Kular, B., Leyland, M., Reynolds, H., Pastori, G., Wellburn, F., Baker, N.R., Wellburn, A., y Mullineaux, P. (1999) Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco paradoxically causes increased oxidative stress. *Plant Cell*, 11:1277–1291.

Creissen, G., Reynolds, H., Xue, Y.B., y Mullineaux, P. (1995) Simultaneous targeting of pea glutathione reductase and of a bacterial fusion protein to chloroplasts and mitochondria. *Plant J*, 8: 167–175.

Davletova, S., Rizhsky, L., Liang, H., Shengqiang, Z., Oliver, D.J., Coutu, J., Shulaev, V., Schlauch, K., Mittler, R. (2005) Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17: 268–281.

del Río, L.A., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., Palma, J.M., Gómez, M., Barroso, J.B. (2002) Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J Exp Bot*, 53:1255-1272.

del Río, L.A., Fernández, V.M., Rupérez, F.L., Sandalio, L.M., Palma, J.M. (1989) NADH induces the generation of superoxide radicals in leaf peroxisomes. *Plant Physiol*, 89:728-731.

del Río, L.A., Lyon, D.S., Olah, I., Glick, B., Salin, M.L. (1983) Immunocytochemical evidence for a peroxisomal localization of manganese superoxide dismutase in leaf protoplasts from a higher plant. *Planta*, 158:216-224.

DellaPenna, D., y Pogson, B. (2006). Vitamin synthesis in plants: Tocopherols and carotenoids. *Annu. Rev. Plant Biol*, 57:711–738.

Demidchik, V. (2015) Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environ. Exp. Bot*, 109: 212-228.

Demidchik, V., Cuin, T.A., Svistunenko, D., Smith, S.J., Miller, A.J., Shabala, S., Sokolik, A., Yurin, V. (2010) Arabidopsis root K^+ efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death. *J. Cell Sci*, 123:1468–1479.

Demidchik, V., Shabala, S.N., Coutts, K.B., Tester, M.A., Davies, J.M. (2003) Free oxygen radicals regulate plasma membrane Ca^{2+} - and K^+ -permeable channels in plant root cells. *J. Cell Sci*, 116:81–88.

Desikan, R., Hancock, J.T. and Neill, S.J. (2003) Oxidative stress signalling. *Topics in Current Genetics*, Vol. 4. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D. X., Khounloham, M., Boucher, C., Somssich, I., S., Genin, Marco, Y. (2003) Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 100:8024-8029.

Dghim, A.A., Mhamdi, A., Vaultier, M.N., Hasenfratz-Sauder, M.P., Le Thiec, D., Dizengremel, P., Noctor, G., Jolivet, Y. (2013) Analysis of cytosolic isocitrate dehydrogenase and glutathione reductase 1 in photoperiod-influenced responses to ozone using Arabidopsis knockout mutants. *Plant Cell Environ*, 36:1981-91.

Dietz, K. J., Jacob, S., Oelze, M. L., Laxa, M., Tognetti, V., DeMiranda, S.M., y col. (2006) The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *J. Exp. Bot*, 57:1697–1709.

Dixon, D.P., Skipsey, M., Grundy, N.M., Edwards, R. (2005) Stress-induced protein S-glutathionylation in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 138:2233-2244.

Donald, S.P., Sun, X.Y., Hu, C.A., Yu, J., Mei, J.M., Valle, D., Phang, J.M. (2001) Proline oxidase, encoded by p53-induced gene-6, catalyzes the generation of proline-dependent reactive oxygen species. *Cancer Res*, 61:1810-5.

Du, L., Ali, G.S., Simons, K.A., Hou, J., Yang, T., Reddy, A.S. (2009) Ca^{2+} /calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature*, 457:1154-1158.

Dubos, C., Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L. (2010) Trends in Plant Science, 15: 573 – 581.

Durek, P., Schmidt, R., Heazlewood, J.L., Jones, A., Maclean, D., Nagel, A., Kersten, B., Schulze, W.X. (2010) PhosPhAt: The *Arabidopsis thaliana* phosphorylation site database. An update. Nucleic Acids Res, 38: D828–D834.

Durrant, W.E. y Dong, X. (2004) Systemic acquired resistance. Annu Rev Phytopathol, 42:185-209.

Eckardt, N.A., Cominelli, E., Galbiati, M., y Tonelli, C. (2009) The future of science: food and water for life. Plant Cell, 21:368–372.

Edwards, E.A., Rawsthorne, S., y Mullineaux, P.M. (1990) Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in pea (*Pisum sativum* L.). Planta, 180:278–284.

Eitas, T.K. y Dangl, J.L. (2010) NB-LRR proteins: Pairs, pieces, perception, partners, and pathways. Curr. Opin. Plant Biol, 13:472–477.

ElSayed, A.I., Rafudeen, M.S., Golldack, D. (2013) Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: protection against abiotic stress. Plant Biol, 16:1-8.

Engelsberger, W.R., y Schulze, W.X. (2012) Nitrate and ammonium lead to distinct global dynamic phosphorylation patterns when resupplied to nitrogen-starved *Arabidopsis* seedlings. Plant J, 69(6), 978–995.

Evans, N.H., McAinsh, M.R., Hetherington, A.M., y Knight, M.R. (2005) ROS perception in *Arabidopsis thaliana*: The ozone- induced calcium response. Plant J, 41, 615–626.

Falk, A., Feys, B.J., Frost, L.N., Jones, J.D., Daniels, M.J., Parker, J.E. (1999) EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. Proc Natl Acad Sci USA, 96:3292-3297.

Feechan, A., Kwon, E., Yun, B.W., Wang, Y., Pallas, J.A., Loake, G.J. (2005) A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102:8054-8059.

Feng, Z., Pang, J., Nouchi, I., Kobayashi, K., Yamakawa, T., Zhu, J. (2010) Apoplastic ascorbate contributes to the differential ozone sensitivity in two varieties of winter wheat under fully open-air field conditions. Environ Pollut, 158:3539–3545.

Feys, B.J., Moisan, L.J., Newman, M.A., Parker, J.E. (2001) Direct interaction between the Arabidopsis disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *EMBO J*, 20:5400-5411.

Fischer, B.B., Krieger–Liszak, A., Hideg, E., Snyrychova, I., Wiesendanger, M., y Eggen, RIL. (2007) Role of singlet oxygen in chloroplast to nucleus retrograde signaling in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett*, 581:5555–5560.

Flavell, R. (2005) Model plants, with special emphasis on *Arabidopsis thaliana*, and crop improvement. 365-378.

Fotopoulos, V., De Tullio, M.C., Barnes, J., Kanellis, A.K. (2008) Altered stomatal dynamics in ascorbate oxidase over–expressing tobacco plants suggest a role for dehydroascorbate signalling. *J Exp Bot*, 59:729–737.

Foyer, C.H. y Noctor, G. (2012) Managing the cellular redox hub in photosynthetic organisms. *Plant Cell Environ*, 35:199–201.

Foyer, C.H. y Noctor, G. (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol*, 155:2-18.

Foyer, C.H. y Noctor, G. (2009a) Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid Redox Signal*, 11:861-905.

Foyer, C.H., Bloom, A.J., Queval, G., Noctor, G. (2009b) Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics and redox signaling. *Annu Rev Plant Biol*, 60:455-484.

Foyer, C.H. y Noctor, G. (2007) Shape-shifters building bridges? Stromules, matrixules and metabolite channelling in photorespiration. *Trends Plant Sci*, 12:381-383.

Foyer, C.H., Trebst, A. y Noctor, G. (2006) Signaling and integration of defense functions of tocopherol, ascorbate and glutathione. In *Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment*, edited by Demmig–Adams B and Adams WW. Dordrecht, The Netherlands: Springer, pp. 241–268.

Foyer, C.H. y Noctor, G. (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, 17:1866-75.

Foyer, C.H. y Noctor, G. (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol Plant*, 119:355-364.

Foyer, C.H., y Lelandais, M. (1996) A comparison of the relative rates of transport of ascorbate and glucose across the thylakoid, chloroplast and plasma membranes of pea leaf mesophyll cells. *J. Plant Physiol*, 148:391–398.

Foyer, C.H., y Halliwell, B. (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133:21–25.

Fridovich, I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*, 64:97-112.

Frugoli, J.A., Zhong, H.H., Nuccio, M.L., McCourt, P., McPeck, M.A., Thomas, T.L., McClung, C.R. (1996) Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol*, 112:327-336.

Fujimoto, S.Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H., Ohme-Takagi, M. (2000) Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell*, 12:393-404.

Galperín, M.Y. y col. (1998) Analogous enzymes: independent inventions in enzyme evolution. *Genome Res*, 8:779–790.

Gao, X., Yuan, H.M., Hu, Y.Q., Li, J., Lu, Y.T. (2014) Mutation of Arabidopsis CATALASE2 results in hyponastic leaves by changes of auxin levels. *Plant Cell Environ*, 37:175-188.

García-Ortega, L., De los Ríos, V., Martínez-Ruiz, A., Oñaderra, M., Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Gavilanes, J.G. (2005) Anomalous electrophoretic behavior of a very acidic protein: ribonuclease U2. *Electrophoresis*, 26:3407-13.

Gatzek, S., Wheeler, G.L., Smirnoff, N. (2002) Antisense suppression of L-galactose dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* provides evidence for its role in ascorbate synthesis and reveals light-modulated L-galactose synthesis. *Plant J*, 30:541-553.

Gendron, J.M., Pruneda-Paz, J.L., Doherty, C.J., Gross, A.M., Kang, S.E., Kay, S.A. (2012) *Arabidopsis* circadian clock protein, TOC1, is a DNA-binding transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109:3167-3172.

Geourjon, C. y Deléage, G. (1995) SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput Appl Biosci*, 6:681-684.

Gill, S.S. y Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Bioch*, 48:909-930.

Gibon, Y., Blaesing, O.E., Hannemann, J., Carillo, P., Höhne, M., Hendriks, J.H., Palacios, N., Cross, J., Selbig, J., Stitt, M. (2004) A Robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *Plant Cell*, 16:3304-25.

Glazebrook, J., Zook, M., Mert, F., Kagan, I., Rogers, E.E., Crute, I.R., Holub, E.B., Hammerschmidt, R., Ausubel, F.M. (1997) Phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis* reveal that PAD4 encodes a regulatory factor and that four PAD genes contribute to downy mildew resistance. *Genetics*, 146:381–392.

Gómez, L., Vanacker, H., Buchner, P., Noctor, G., Foyer, C.H. (2004a) The intercellular distribution of glutathione synthesis and its response to chilling in maize. *Plant Physiol*, 134:1662-1671.

Gómez, L.D., Noctor, G., Knight, M., Foyer, C.H. (2004b) Regulation of calcium signaling and gene expression by glutathione. *J. Exp. Bot*, 55:1851-1859.

Gong, W., Shen, Y.P., Ma, L.G., Pan, Y., Du, Y.L., Wang, D.H., Yang, J.Y., Hu, L.D., Liu, X.F., Dong, C.X., y col. (2004) Genome-wide ORFeome cloning and analysis of *Arabidopsis* transcription factor genes. *Plant Physiol*, 135:773–782.

Grace, S.C. y Logan, B.A. (1996) Acclimation of foliar antioxidant systems to growth irradiance in three broad-leaved evergreen species. *Plant Physiol*, 112:1631-1640.

Greene, R. (2002) Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. *The Arabidopsis Book*, American Society of Plant Biologists.

Gupta, R., y Luan, S. (2003) Redox control of protein tyrosine phosphatases and mitogen-activated protein kinases in plants. *Plant Physiol*, 132:1149–1152.

Gupta, A.S., Webb, R.P., Holaday, A.S., Allen, R.D. (1993) Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. *Plant Physiol*, 103:1067–1073.

Halliwell, B. y Gutteridge, N.M. (2007) *Free radicals in biology and medicine*, 4th edition. Oxford University Press, Oxford.

Halliwell, B., y Foyer, C.H. (1978) Properties and physiological function of a glutathione reductase purified from spinach leaves by affinity chromatography. *Planta*, 139: 9-17.

Han, X. y col. (2012) Co-expression analysis identifies CRC and AP1 the regulator of Arabidopsis fatty acid biosynthesis. *J. Integr. Plant Biol*, 54:486–499.

Han, Y., Chaouch, S., Mhamdi, A., Queval, G., Zechmann, B., Noctor, G. (2013a) Functional analysis of Arabidopsis mutants points to novel roles for glutathione in coupling H₂O₂ to activation of salicylic acid accumulation and signaling. *Antioxid. Redox Signal*, 18:2087–2090.

Han, Y., Mhamdi, A., Chaouch, S., Noctor, G. (2013b) Regulation of basal and oxidative stress-triggered jasmonic acid-related gene expression by glutathione. *Plant Cell Environ*, 36:1135-1146.

Hanke, G.T., Kimata-Arigo, Y., Taniguchi, I. and Hase, T. (2004) A post genomic characterization of Arabidopsis ferredoxins. *Plant Physiol*, 134,255–264.

Hare, P.D. y Cress, W.A. (1997) Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul*, 21:79-102.

Haseloff, J. (1999) GFP variants for multispectral imaging of living cells. *Methods Cell Biol*, 58:139-51.

Häusler, R.E., Bailey, K.J., Lea, P.J., Leegood, R.C. (1996) Control of photosynthesis in barley mutants with reduced activities of glutamine synthetase and glutamate synthase. *Planta*, 200:388-396.

Havaux, M., Lutz, C., Grimm, B. (2003) Chloroplast membrane photostability in chIP transgenic tobacco plants deficient in tocopherols. *Plant Physiol*, 132:300-310.

Hemavathi, C.P., Upadhyaya, N., Akula, H.S., Kim, J.H., Jeon, M.H., Oh, S.C., Chun, D.H.K., Park, S.W. (2011) Biochemical analysis of enhanced tolerance in transgenic potato plants overexpressing d-galacturonic acid reductase gene in response to various abiotic stresses. *Mol Breed*, 28:105–115.

Hernández, J.A., Ferrer, M.A., Jiménez, A., Barceló, A.R., Sevilla, F. (2001) Antioxidant systems and O₂^{•-}/H₂O₂ production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiol*, 127:817–831.

Higo, K., Y. Ugawa, M. Iwamoto y T. Korenaga (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Res*, 27:297-300.

Hirel, B., Le Gouis, J., Ney, B., Gallais, A. (2007) The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *J Exp Bot*, 58:2369–2387.

Hirokawa, T., Boon-Chieng, S. y Mitaku S. (1998) SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics*, 14:378-9.

Horan, K., Jang, C., Bailey-Serres, J., Mittler, R., Shelton, C., Harper, J.F., Zhu, J.K., Cushman, J.C., Gollery, M., Girke, T. (2008) Annotating genes of known and unknown function by large-scale coexpression analysis. *Plant Physiol*, 147:41–57.

Horemans, N., Foyer, C.H., y Asard, H. (2000) Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. *Trends Plant Sci*, 5:263–267.

Horton, P., Park, K.J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C.J., Nakai, K. (2007) WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res*, 35:W585-W587.

Hruz, T., Laule, O., Szabo, G. et al. (2008) Genevestigator V3: A Reference Expression Database for the Meta-Analysis of Transcriptomes. *Adv in Bioinformatics*, 2008, Article ID 420747, 5 pages.

Hu, J., Baker, A., Bartel, B. y col. (2012) Plant peroxisomes: biogenesis and function. *Plant Cell*, 24:2279–2303.

Huang, C., He, W., Guo, J., Chang, X., Su, P., Zhang, L. (2005) Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant. *J Exp Bot*, 56:3041–3049.

Ishizaki, K., Schauer, N., Larson, T.R., Graham, I.A., Fernie, A.R., Leaver, C.J. (2006) The mitochondrial electron transfer flavoprotein complex is essential for survival of *Arabidopsis* in extended darkness. *Plant J*, 47:751-60.

Ito, T.M., Polido, P.B., Rampim, M.C., Kaschuk, G., Souza, S.G.H. (2014) Genome-wide identification and phylogenetic analysis of the AP2/ERF gene superfamily in sweet orange (*Citrus sinensis*). *Genet Mol Res*, 13:7839–7851.

Jarvis, P., Chen, L.J., Li, H., Peto, C.A., Fankhauser, C., Chory, J. (1998) An *Arabidopsis* mutant defective in the plastid general protein import apparatus. *Science*, 282:100-103.

Jebanathirajah, J.A., Peri, S. y Pandey, A. (2002) Toll and interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing proteins in plants: a genomic perspective. *Trends Plant Sci*, 7:388-391.

Jiménez, A., Hernández, J.A., del Río, L., y Sevilla, F. (1997) Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol*, 114: 275–284.

Jirage, D., Tootle, T.L., Reuber, L., Frost, L.N., Feys, B.J., Parker, J.E., Ausubel, F.M., Glazebrook, J. (1999) *Arabidopsis thaliana* PAD4 encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:13583-13588.

Jofuku, K.D., Boer, B., Montagu, M.V., Okamoto, J.K. (1994) Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. *Plant Cell*, 6:1211–1225.

Jones, J.D.G. y Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature*, 444:323–329.

Joo, J.H., Wang, S., Chen, J.G., Jones, A.M., and Fedoroff, N.V. (2005) Different signaling and cell death roles of heterotrimeric G protein α and β subunits in the *Arabidopsis* oxidative stress response to ozone. *Plant Cell*, 17:957–970.

Kaczorowski, K.A., Quail, P.H. (2003) *Arabidopsis* PSEUDO-RESPONSE REGULATOR7 is a signaling intermediate in phytochrome-regulated seedling deetiolation and phasing of the circadian clock. *Plant Cell*, 15:2654-2665.

Kang, H.G., Foley, R.C., Onate-Sanchez, L., Lin, C. and Singh, K.B. (2003) Target genes for OBP3, a DOF transcription factor, include novel basic helix-loop-helix domain proteins inducible by salicylic acid. *Plant J*, 35:362-372.

Karidas, P., Challa, K.R., Nath, U. (2015) The tarani mutation alters surface curvature in *Arabidopsis* leaves by perturbing the patterns of surface expansion and cell division. *J Exp Bot*, 66:2107-22.

Kato, H., Saito, T., Ito, H., Komeda, Y., Kato, A. (2014) Overexpression of the TIR-X gene results in a dwarf phenotype and activation of defense-related gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol*, 171:382-8.

Kaur, N., Reumann, S., y Hu, J. (2009) Peroxisome biogenesis and function. *Arabidopsis Book*. 7:e0123.

Kaurilind, E., Xu, E., Brosché, M. (2015) A genetic framework for H₂O₂ induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 16:837-907.

Kavdia, M. (2006) A Computational Model for Free Radicals Transport in the Microcirculation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8:1103-1111.

Kendall, A.C., Keys, A.J., Turner, J.C., Lea, P.J., Miflin, B.J. (1983) The isolation and characterization of a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta*, 159:505-511.

Keunen, E., Peshev, D., Vangronsveld, J., Van Den Ende, W., y Cuypers, A. (2013) Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. *PlantCell Environ*, 36:1242–1255.

Kim, S.H., Woo, D.H., Kim, J.M., Lee, S.Y., Chung, W.S., Moon, Y.H. (2011) Arabidopsis MKK4 mediates osmotic-stress response via its regulation of MPK3 activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 412:150-4

Ksenzenko, M., Konstantinov, A.A., Khomutov, G.V., Tikhonov, A.N., Ruuge, E.K. (1983) Effect of electron transfer inhibitors on superoxide generation in the cytochrome bc1 site of the mitochondrial respiratory chain. *FEBS Lett*, 155:19-24.

Klein, Y.K., Efrati, E., Sharon, E. (2007) Shaping of elastic sheets by prescription of non-euclidean metrics. *Science*, 315:1116–1119.

Kleine, T., Leister, D. (2016) Retrograde signaling: organelles go networking. *Biochim Biophys Acta*, 1857:1313-25.

Kocsy, G., Tari, I., Vanková, R., Zechmann, B., Gulyás, Z., Poór, P., Galiba, G. (2013) Redox control of plant growth and development. *Plant Science*, 211:77–91.

Koehl, M.A.R., Silk, W.K., Liang, H., Mahadevan, L. (2008) How kelp produce blade shapes suited to different flow regimes: A new wrinkle. *Integr. Comp. Biol*, 48:318-330.

Kosugi, S., Hasebe, M., Matsamura, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Tomita, M., Yanagawa, H. (2009) Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin α . *J Biol Chem*, 284:478-485.

Kovtum, Y., Chiu, W-L, Tena, G., Sheen, J. (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:2940-2945.

Krishnaswamy, S., Verma, S., Rahman, M.H., Kav, N.N. (2011) Functional characterization of four APETALA2-family genes (RAP2.6, RAP2.6L, DREB19 and DREB26) in Arabidopsis. *Plant Mol Biol*, 75:107-127.

Kuchen, E.E., Fox, S., de Reuille, P.B., y col. (2012) Generation of leaf shape through early patterns of growth and tissue polarity. *Science*, 335:1092–1096.

Kwon, S.Y., Choi, S.M., Ahn, Y.O., Lee, H.S., Lee, H.B., Park, Y.M., Kwak, S.S. (2003) Enhanced stress-tolerance of transgenic plants expressing a human dehydroascorbate reductase gene. *J Plant Physiol*, 160:347–353.

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23:2947-2948.

Leinonen, R., Diez, F.G., Binns, D., Fleischmann, W., Lopez, R., Apweiler, R. (2004) UniProt archive. *Bioinformatics*, 20:3236–3237.

Li, S., Mhamdi, A., Trotta, A., Kangasjärvi, S., Noctor, G. (2014) The protein phosphatase subunit PP2A-B' is required to suppress day length-dependent pathogenesis responses triggered by intracellular oxidative stress. *New Phytol*, 202: 145-160.

Li, F., Wang, J., Ma, C., Zhao, Y., Wang, Y., Hasi, A., Qi, Z. (2013) Glutamate receptor like channel 3.3 is involved in mediating glutathione-triggered cytosolic calcium transients, transcriptional changes, and innate immunity responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 162:1497-1509.

Li, Y., Pennington, B.O., Hua, J. (2009) Multiple R-like genes are negatively regulated by BON1 and BON3 in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact*, 22:840-848.

Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S.K., Becker, D.F. (2013) Proline mechanisms of stress survival. *Antioxid Redox Signal*, 19:998-1011.

Liang, H. y Mahadevan, L. (2009) The shape of a long leaf. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 106:22049–22054.

Licausi, F., Giorgi, F.M., Zenoni, S., Osti, F., Pezzotti, M., Perata, P. (2010) Genomic and transcriptomic analysis of the AP2/ERF superfamily in *Vitis vinifera*. *BMC Genomics*, 11:719.

Lichtenthaler, H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol*, 148:350-382.

Lichtenthaler, H.K. (1996) Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *J. Plant Physiol*, 148:4-14.

Liu, J., Wang, P., Liu, B., Feng, D., Zhang, J., Su, J., Zhang, Y., Wang, J.F., Wang, H.B. (2013) A deficiency in chloroplastic ferredoxin 2 facilitates effective photosynthetic capacity during long-term high light acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 76:861-74.

Liu, W., Le, A., Hancock, C., Lane, A.N., Dang, C.V., Fan, T.W., Phang, J.M. (2012) Reprogramming of proline and glutamine metabolism contributes to the proliferative and metabolic responses regulated by oncogenic transcription factor c-MYC. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109:8983-8.

Liu, L.J., Zhang, Y.C., Li, Q.H., Sang, Y., Mao, J., Lian, H.L., Wang, L., Yang, H.Q. (2008) COP1-mediated ubiquitination of CONSTANS is implicated in cryptochrome regulation of flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 20:292-306.

López-Huertas, E., Charlton, W.L., Johnson, B., Graham, I.A., Baker, A. (2000) Stress induces peroxisome biogenesis genes. *EMBO J*, 19:6770– 6777.

Lorenzo, O., Piqueras, R., Sanchez-Serrano, J.J. y Solano R. (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *The Plant Cell*, 15:165–178.

Loschen, G., Azzi, A., Richter, C., Flohé, L. (1974) Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett*, 42:68-72.

Luck, J.E., Lawrence, G.J., Dodds, P.N., Shepherd, K.W. y Ellis, J.G. (2000) Regions outside of the leucine-rich repeats of flax rust resistance proteins play a role in specificity determination. *Plant Cell*, 12:1367-1377.

McCord, J.M., Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*, 244:6049-55.

Maeda, H. y col. (2011) Prephenate aminotransferase directs plant phenylalanine biosynthesis via arogenate. *Nat. Chem. Biol*, 7:19–21.

Maly, F.E., Nakamura, M., Gauchat, J.F., Urwyler, A., Walker, C., Dahinden, C.A., Cross, A.R., Jones, O.T., De Weck, A.L. (1989) Superoxide-dependent nitroblue tetrazolium reduction and expression of cytochrome b-245 components by human tonsillar B lymphocytes and B cell lines. *J Immunol*, 142:1260–1267.

Matsuo, M. y Oelmüller, R. (2015) REDOX RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR1 is involved in age-dependent and systemic stress signaling. *Plant Signal Behav*, 10:11, e1051279.

Maughan, S.C., Pasternak, M., Cairns, N., Kiddle, G., Brach, T., Jarvis, R., Haas, F., Nieuwland, J., Lim, B., Müller, C., Salcedo-Sora, E., Kruse, C., Orsel, M., Hell, R., Miller, A.J., Bray, P., Foyer, C.H., Murray, J.A., Meyer, A.J., Cobbett, C.S. (2010) Plant homologs of the *Plasmodium falciparum* chloroquinone-resistance transporter, PfCRT, are required for glutathione homeostasis and stress responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 2331-2336.

Maurino, V.G. y Weber, A.P.M. (2013) Engineering photosynthesis in plants and synthetic microorganisms. *J Exp Bot*, 64:743-751.

Mc. Clung, C.R. (1997) Regulation of catalases in Arabidopsis. *Free Radical Biol Med*, 23:489-496.

Mehler, A.H. (1951) Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Arch Biochem Biophys*, 33:65-77.

Meyer, Y., Belin, C., Delorme-Hinoux, V., Reichheld, J. P., y Riondet, C. (2012) Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance. *Antioxid. Redox Signal*, 17:1124–1160.

Meyers, B.C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H., Michelmore, R.W. (2003) Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. *Plant Cell*, 15:809–834.

Meyers, B.C., Morgante, M, Michelmore, R.W. (2002) TIR-X and TIR-NBS proteins: two new families related to disease resistance TIR-NBS-LRR proteins encoded in Arabidopsis and other plant genomes. *Plant J*, 32:77-92.

Mhamdi, A., Noctor, G., Baker, A. (2012) Plant catalases: peroxisomal redox guardians. *Arch. Biochem. Biophys*, 15:181–194.

Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Venderauwera, S., Van Breusegem, F., Noctor, G. (2010) Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stressmimic models. *J Exp Bot*, 61:4197-4220.

Michelet, L., Krieger-Liszkay, A. (2012) Reactive oxygen intermediates produced by photosynthetic electron transport are enhanced in short-day grown plants. *Biochim Biophys Acta*, 1817:1306–1313.

Mignolet-Spruyt, L., Xu, E., Idänheimo, N., Hoerberichts, F.A., Mühlenbock, P., Brosché, M., Van Breusegem, F. y Kangasjärvi, J. (2016) Spreading the news: subcellular and organellar reactive oxygen species production and signaling. *J Exp Bot*, 67:3831-3844.

Miller, G., Schlauch, K., Tam, R., Cortes, D., Torres, M.A., Shulaev, V., Dangl, J.L., Mittler, R. (2009) The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science*, Signal 2: ra45.

Miller, G., Shulaev, V., Mittler, R. (2008) Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiol Plant*, 133:481-9.

Miller, G. y Mittler, R. (2006) Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants? *Ann Bot (Lond)*, 98:279–288.

Mitsuya, S., El Shami, M., Sparkes, I.A. y col. (2011) Salt stress causes peroxisome proliferation, but inducing peroxisome proliferation does not improve NaCl tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 5: e9408.

Mittler, R. y Poulos, T.L. (2005) Ascorbate peroxidase. En *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*, Smirnoff Neds, Blackwell Publishing, pp 87-100.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., van Breusegem, F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci*, 9:490-498.

Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*, 9:405-410.

Miyaji, T., Kuromori, T., Takeuchi, Y., Yamaji, N., Yokosho, K., Shimazawa, A., Sugimoto, E., Omote, H., Ma, J.F., Shinozaki, K., Moriyama, Y. (2014) AtPHT4;4 is a chloroplast-localized ascorbate transporter in *Arabidopsis*. *Nat Commun*, 6: 5928.

Mizoi, J., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012) AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochim Biophys Acta*, 1819:86-96.

Mou, Z., Fan, W., y Dong, X. (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, 113:935–944.

Mouliá, B. (2000) Leaves as shell structure: double curvature, auto- stresses, and minimal mechanical energy constrains on leaf rolling in grasses. *J Plant Growth Regul*, 19:19–30.

Mulki, M.A. y von Korff, M. (2016) CONSTANS controls floral repression by up-regulating VERNALIZATION2 (VRN-H2) in barley. *Plant Physiol*, 170:325-337.

Müller, K., Carstens, A.C., Linkies, A., Torres, M.A., Leubner-Metzger, G. (2009) The NADPH-oxidase AtrbohB plays a role in *Arabidopsis* seed after-ripening. *New Phytol*, 184:885-97.

Müller, M. y Munné-Bosch, S. (2015) Ethylene Response Factors: A Key Regulatory Hub in Hormone and Stress Signaling. *Plant Physiology*, 169:32–41.

Müller-Moulé, P., Golan, T., Niyogi, K.K. (2004) Ascorbate-deficient mutants of *Arabidopsis* grow in high light despite chronic photooxidative stress. *Plant Physiol*, 134:1163–1172.

Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T., Shinshi H. (2006) Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol*, 140:411-32.

Nandety, R.S., Caplan, J.L., Cavanaugh, K., Perroud, B., Wroblewski, T., Michelmore, R.W., Meyers B.C. (2013) The role of TIR-NBS and TIR-X proteins in plant basal defense responses. *Plant Physiol*, 162:1459-72.

Nishizawa, A., Yabuta, Y., Shigeoka, S. (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol*, 147:1251-1263.

Noctor, G. y Foyer, C.H. (2016) Intracellular redox compartmentation and ROS-related communication in regulation and signaling. *Plant Physiol*, 171:1581-92.

Noctor, G., Mhamdi, A., Foyer, C.H. (2014) The roles of reactive oxygen metabolism in drought stress: not so cut and dried. *Plant Physiol*, 164:1636-1648.

Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H., Foyer, C.H. (2002) Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J Exp Bot*, 53:1283-1304.

Noctor, G. y Foyer, C.H. (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49:249-279.

Ogawa, K., Kanematsu, S., Asada, K. (1996) Intra- and extra-cellular localization of 'cytosolic' CuZn-superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyls. *Plant Cell Physiol*, 37:790-799.

Oksanen, E., Haikio, E., Sober, J., Karnosky, D.F. (2003) Ozone-induced H₂O₂ accumulation in field-grown aspen and birch is linked to foliar ultrastructure and peroxisomal activity. *New Phytol*, 161:791–799.

Ohme-Takagi, M., y Shinshi, H. (1995) Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell*, 7:173-182.

Pagani, I. y col. (2012) The Genomes OnLine Database (GOLD) v.4: status of genomic and metagenomic projects and their associated metadata. *Nucleic Acids Res*, 40:D571–D579.

Page, R.D.M. (1996). TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci*, 12:357-358.

Palatnik, J., Valle, E. y Carrillo, N. (2002) Oxidative stress and damage in chloroplasts from dawn to dusk. In *Advances in Plant Physiology*, (ed. Hemantaranjan, A.), 4:75-88.

Palmieri, M.C., Lindermayr, C., Bauwe, H., Steinhauser, C., Durner, J. (2010) Regulation of plant glycine decarboxylase by S-nitrosylation and glutathionylation. *Plant Physiol*, 152:1514-1520.

Pandey, G.K., Grant, J.J., Cheong, Y.H., Kim, B.G., Li, L., Luan, S. (2005) ABR1, an APETALA2-domain transcription factor that functions as a repressor of ABA response in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 139:1185-1193.

Parker, J.E., Holub, E.B., Frost, L.N., Falk, A., Gunn, N.D., Daniels, M.J. (1996) Characterization of eds1, a mutation in Arabidopsis suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different RPP genes. *Plant Cell*, 8:2033-2046.

Pastori, G.M., Foyer, C.H. (2002) Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "redox" and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiol*, 129:460-468.

Pavet, V., Olmos, E., Kiddle, G., Mowla, S., Kumar, S., Antoniw, J., Alvarez, M.E., Foyer, C.H. (2005) Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 139:1291-1303.

Persson, S. y col. (2005) Identification of genes required for cellulose synthesis by regression analysis of public microarray data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:8633-8638.

Pieterse, C.M. y Van Loon, L.C. (2004) NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol*, 7:456-464.

Pignocchi, C., Fletcher, J.M., Barnes, J., Foyer, C.H. (2003) The function of ascorbate oxidase in tobacco. *Plant Physiol*, 132:1631-1641.

Puterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R., Coupland, G. (1995) The CONSTANS gene of Arabidopsis promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell*, 24:847-857.

Qi, Y., Tsuda, K., Glazebrook, J., Katagiri, F. (2011) Physical association of pattern-triggered immunity (PTI) and effector-triggered immunity (ETI) immune receptors in Arabidopsis. *Mol Plant Pathol*, 12:702-708.

Queval, G., Issakidis-Bourguet, E., Hoerberichts, F.A., Vandorpe, M., Gakière, B., Vanacker, H., Miginiac-Maslow, M., Van Breusegem, F., Noctor, G. (2007) Conditional oxidative stress responses in the Arabidopsis photorespiratory mutant *cat2* demonstrate that redox state is a key modulator of daylength-dependent gene expression, and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H₂O₂-induced cell death. *Plant J*, 52:640-657.

Rao, M.V., Paliyath, G., Ormrod, D.P. (1996) Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidants enzymes *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 110:125-136.

Rasmusson, A.G., y Møller, I.M. (1990) NADP-utilizing enzymes in the matrix of plant mitochondria. *Plant Physiol*, 94:1012-1018.

Rejeb, K.B., Abdelly, C., Saviouré, A. (2014) How reactive oxygen species and proline face stress together. *Plant Physiol Biochem*, 80:278-284.

Remmler, L. y Rolland-Lagan, A.G. (2012) Computational method for quantifying growth patterns at the adaxial leaf surface in three dimensions. *Plant Physiol*, 159:27–39.

Rentel, M.C., Lecourieux, D., Ouaked, F., Usher, S.L., Peterson, L., Okamoto, H., Knight, H., Peck, S.C., Grierson, C.S., Hirt, H., y Knight, M.R. (2004) OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signaling in Arabidopsis. *Nature*, 427:858–861.

Rhee, S.Y. y Mutwil, M. (2014) Towards revealing the functions of all genes in plants. *Trends Plant Sci*, 19:212-21.

Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R. y col (2000) Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290:2105-2110.

Rivas-San Vicente, M. y Plasencia, J. (2011). Salicylic acid beyond defense: its role in plant growth and development. *J Exp Bot*, 62:3321-3338.

Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M.C., Sparkes, I., Hawes, C., del Río, L.A., Sandalio, L.M. (2009) Peroxisome dynamics in Arabidopsis plants under oxidative stress induced by cadmium. *Free Radical Bio Med*, 47:1632–1639.

Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M.C., Pastori, G.M., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., del Río, L.A., Palma, J.M. (2007) Peroxisomal membrane manganese superoxide dismutase: characterization of the isozyme from watermelon (*Citrullus lanatus* Schrad.) cotyledons. *J Exp Bot*, 58:2417-2427.

- Rost, B. (2002) Enzyme function less conserved than anticipated. *J. Mol. Biol.*, 318:595–608.
- Rouhier, N., Lemaire, S.D. and Jacquot, J.-P. (2008) The role of glutathione in photosynthetic organisms: Emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 59:143–166
- Rusterucci, C., Aviv, D.H., Holt III, B.F., Dangl, J.L., Parker, J.E. (2001) The disease resistance signaling components EDS1 and PAD4 are essential regulators of the cell death pathway controlled by LSD1 in Arabidopsis. *Plant Cell*, 13:2211-2224.
- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J.G., Abe, H., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002) DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression, *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 290:998-1009.
- Sandalio, L.M. y Romero-Puertas, M.C. (2015) Peroxisomes sense and respond to environmental cues by regulating ROS and RNS signalling networks. *Ann Bot-London* 116:475-485.
- Sandalio, L.M. y Foyer, C.H. (2015) Unravelling the reactive oxygen and reactive nitrogen signalling networks in plants. *J Exp Bot*, 66:2825–2826.
- Sandalio, L.M., Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M.C., del Río, L.A. (2013) Role of peroxisomes as a source of reactive oxygen species (ROS) signaling molecules. *Subcell Biochem*, 69:231–255.
- Sandalio, L.M., Fernández, V.M., Rupérez, F.L., del Río, L.A. (1988) Superoxide free radicals are produced in glyoxysomes. *Plant Physiol*, 87:1-4.
- Sandalio, L.M., Palma, J.M., del Río, L.A. (1987) Localization of manganese superoxide dismutase in peroxisomes isolated from *Pisum sativum* L. *Plant Sci*, 51:1 – 8.
- Sanmartin, M., Drogoudi, P.A., Lyons, T., Pateraki, I., Barnes, J., Kanellis, A.K. (2003) Over-expression of ascorbate oxidase in the apoplast of transgenic tobacco results in altered ascorbate and glutathione redox states and increased sensitivity to ozone. *Planta*, 216:918–928.
- Sarris, P.F., Duxbury, Z., Huh, S.U., Ma, Y., Segonzac, C., Sklenar, J., Derbyshire, P., Cevik, V., Rallapalli, G., Saucet, S.B., Wirthmueller, L., Menke, F.L., Sohn, K.H. y Jones, J.D. (2015) A Plant Immune Receptor Detects Pathogen Effectors that Target WRKY Transcription Factors. *Cell*, 161:1089-100.

Scandalios, J.G. (2002) The rise of ROS. Trends Biochem Sci, 27:483-486.

Scarpeci, T., Zanon, M.I., Carrillo, N., Mueller-Roeber, B., Valle, E.M. (2008) Generation of superoxide anion in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana* during active photosynthesis: a focus on rapidly induced genes. Plant Mol Biol, 66:361–378.

Schatz, M.C. y col. (2012) Current challenges in de novo plant genome sequencing and assembly. Genome Biol, 13:243.

Schauer, N., Steinhauser, D., Strelkov, S., Schomburg, D., Allison, G., Moritz, T., Lundgren, K., Roessner-Tunali, U., Forbes, M.G., Willmitzer, L., Fernie, A.R., Kopka, J. (2005) GCMS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. FEBS Lett, 579:1332-1337.

Schlager, B., Straessle, A., Hafen, E. (2012) Use of anionic denaturing detergents to purify insoluble proteins after overexpression. BMC Biotechnol, 12: 95.

Schneider, C. (2005). Chemistry and biology of vitamin E. Mol. Nutr. Food Res, 49:7–30.

Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., Weigel, D. (2006) Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. Plant Cell, 18:1121-1133.

Scott, I., Sparkes, I.A., Logan, D.C. (2007) The missing link: inter-organellar connections in mitochondria and peroxisomes? Trends Plant Sci, 12:380-381.

Sen Gupta, A., Webb, R.P., Scott, Holaday, A., Allen, R.D. (1993) Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. Plant Physiol, 103:1067-1073.

Setterdahl, A.T., Chivers, P.T., Hirasawa, M., Lemaire, S.D., Keryer, E., Miginiac-Maslow, M., Kim, S.K., Mason, J., Jacquot, J.P., Longbine, C.C., de Lamotte-Guery, F., and Knaff, D.B. (2003) Effect of pH on the oxidation-reduction properties of thioredoxins. Biochemistry 42, 14877–14884.

Seyfferth, C., Tsuda, K. (2014) Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming. Front Plant Sci, 5:00697.

Sharma, S., Villamor, J.G., Verslues, P.E. (2011) Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. Plant Physiol, 157:292-304.

Sharon, E., Roman, B., Marder, M., Shin, G-S, Swinney, H.L. (2002) Buckling cascades in free sheets. *Nature*, 419:579.

Sharoni, A.M., Nuruzzaman, M., Satoh, K., Shimizu, T., Kondoh, H., Sasaya, T., Choi, I.R., Omura, T., Kikuchi, S. (2011) Gene structures, classification and expression models of the AP2/EREBP transcription factor family in rice. *Plant Cell Physiol*, 52:344–360.

Sies, H. (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem*, 215:213–219.

Sinclair, A.M., Trobacher, C.P., Mathur, N., Greenwood, J.S., Mathur, J. (2009) Peroxule extension over ER-defined paths constitutes a rapid subcellular response to hydroxyl stress. *Plant J*, 59:231-242.

Skiryicz, A., Reichelt, M., Burow, M., Birkemeyer, C., Rolcik, J., Kopka, J., Zanol, M.I., Gershenzon, J., Strnad, M., Szopa, J., Mueller-Roeber, B., Witt, I. (2006) DOF transcription factor AtDof1.1 (OBP2) is part of a regulatory network controlling glucosinolate biosynthesis in Arabidopsis. *Plant J*, 47:10-24.

Smirnoff, N. (2011) Vitamin C: the metabolism and functions of ascorbic acid in plants. *Adv. Bot. Res*, 59:107-177.

Smirnoff, N. y Cumbes, Q. (1989) Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28:1057-1060.

Sohn, K.H., Hughes, R.K., Piquerez, S.J., Jones, J.D., Banfield, M.J. (2012) Distinct regions of the *Pseudomonas syringae* coiled-coil effector AvrRps4 are required for activation of immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109:16371-16376.

Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q., y Ecker, J. R. (1998) Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENERESPONSE-FACTOR1. *Genes Dev*, 12:3703-3714.

Song, X., Li, Y., Hou, X. (2013) Genome-wide analysis of the AP2/ERF transcription factor superfamily in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *BMC Genomics*, 14:573–588.

Song, C., Agarwal, M., Ohta, M., Guo, Y., Halfter, U., & Wang, P. (2005) Role of an Arabidopsis AP2/EREBP-Type Transcriptional Repressor in Abscisic Acid and Drought Stress Responses. *The Plant Cell*, 17:2384-2396.

Soosaar, J. L., Burch-Smith, T. M., Dinesh-Kumar, S. P. (2005) Mechanisms of plant resistance to viruses. *Nat. Rev. Microbiol*, 3:789-798.

Stark, C. et al. (2011) The BioGRID Interaction Database: 2011 update. *Nucleic Acids Res*, 39:D698–D704.

Stevens, R.G., Creissen, G.P., y Mullineaux, P.M. (2000) Characterisation of pea cytosolic glutathione reductase expressed in transgenic tobacco. *Planta*, 211: 537–545.

Strayer, C., Oyama, T., Schultz, T.F., Raman, R., Somers, D.E., Más, P., Panda, S., Kreps, J.A., Kay, S.A. (2000) Cloning of the Arabidopsis clock gene TOC1, an autoregulatory response regulator homolog. *Science*, 289:768-771.

Suárez-López, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F., Coupland, G. (2001) CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in Arabidopsis. *Nature*, 410:1116–1120.

Sun, C., Huang, Y., Chang, H. (2009) CIA2 coordinately up-regulates protein import and synthesis in leaf chloroplasts. *Plant Physiol*, 150:879-888.

Sun, W.H., Duan, M., Shu, D.F., Yang, S., Meng, Q.W. (2010a) Over-expression of StAPX in tobacco improves seed germination and increases early seedling tolerance to salinity and osmotic stresses. *Plant Cell Rep*, 29:917–926.

Sung, D.Y. et al. (2001) Comprehensive expression profile analysis of the Arabidopsis Hsp70 gene family. *Plant Physiol*, 126:789–800.

Suzuki, N., Miller, G., Morales, J., Shulaev, V., Torres, M.A., and Mittler, R. (2011). Respiratory burst oxidases: The engines of ROS signaling. *Curr. Opin. Plant Biol*, 14:691–699.

Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R., Miller, G. (2012) ROS and redox signaling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ*, 35:259–270.

Suzuki, N., Rivero, R.M., Shulaev, V., Blumwald, E., Mittler, R. (2014) Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytol*, 203:32–43.

Szabados, L. y Savouré, A. (2010) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci*, 15:89-97.

Tada, Y., Spoel, S.H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J., Dong, X. (2008) Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science*, 321:952-956.

Tahir, J., Watanabe, M., Jing, H.C., Hunter, D., Tohge, T., Nunes-Nesi, A., Brotman, Y., Fernie, A.R., Hoefgen, R., Dijkwel, P. (2013) Activation of R-mediated innate immunity and disease susceptibility is affected by different mutations in a cytosolic O-acetylserine (thiol) lyase in Arabidopsis. *Plant J*, 73:118-130.

Talla, S., Riazunnisa, K., Padmavathi, L., Sunil, B., Rajsheel, P., Raghavendra, A.S. (2011) Ascorbic acid is a key participant during the interactions between chloroplasts and mitochondria to optimize photosynthesis and protect against photoinhibition. *J Biosci*, 36:163–173.

Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., Collinge, D.B. (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J*, 11:1187–1194.

Tian, W. y Skolnick, J. (2003) How Well is Enzyme Function Conserved as a Function of Pairwise Sequence Identity? *J. Mol. Biol*, 333:863–882

Timm, S., Florian, A., Wittmiß, M., Jahnke, K., Hagemann, M., Fernie, A.R., Bauwe, H. (2013) Serine acts as a metabolic signal for the transcriptional control of photorespiration-related genes in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 162:379-89.

Tiwari, S.B., Shen, Y., Chang, H.C., Hou, Y., Harris, A., Ma, S.F., McPartland, M., Hymus, G.J., Adam, L., Marion, C., Belachew, A., Repetti, P.P. y col. (2010) The flowering time regulator *CONSTANS* is recruited to the *FLOWERING LOCUS T* promoter via a unique cis-element. *New Phytol*, 187:57–66.

Todd, P.H. (1985) Gaussian curvature as a parameter of biological surface growth. *J Theor Biol* 113, 63–68.

Torres, M. y Dangl, J. (2005) Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr. Op. Plant Biol*, 8:397-403.

Tsuda, K. y Katagiri, F. (2010) Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol*, 13: 459–465.

Valentini, R., Epron, D., De Angelis, P., Matteucci, G., Dreyer, E. (1995) In situ estimation of net CO₂ assimilation, photosynthetic electron flow and photorespiration in Turkey oak (*Q. cerris* L.) leaves: diurnal cycles under different levels of water supply. *Plant Cell Environ*, 18:631-640.

Valenzuela-Soto, J.H., Iruegas-Bocardo, F., Martínez-Gallardo, N.A., Molina-Torres, J., Gómez-Lim, M.A., Délano-Frier, J.P. (2011) Transformed tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants over-expressing a peroxisome proliferator-activated receptor gene from *Xenopus laevis* (xPPAR α)

show increased susceptibility to infection by virulent *Pseudomonas syringae* pathogens. *Planta*, 233:507–521.

Vanacker, H., Carver, T.L.W., Foyer, C.H. (2000) Early H₂O₂ accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hypersensitive response in the barley powdery mildew interaction. *Plant Physiol*, 123:1289-1300.

Vandenabeele, S., Vanderauwera, S., Vuylsteke, M., Rombauts, S., Langebartels, C., Seidlitz, H.K., Zabeau, M., Van Montagu, M., Inze, D., Van Breusegem, F. (2004) Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 39: 45–58.

Vanderauwera, S., Zimmermann, P., Rombauts, S., Vandenabeele, S., Langebartels, C., Gruissem, W., Inze, D., Van Breusegem, F. (2005) Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in *Arabidopsis* reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Physiol*, 139:806–821.

Vazquez, A. et al. (2003) Global protein function prediction from protein–protein interaction networks. *Nat. Biotechnol*, 21:697–700.

Venkatesh, J., Upadhyaya, C.P., Yu, J.W., Hemavathi, A., Kim, D.H., Strasser, R.J., Park, S.W. (2012) Chlorophyll a fluorescence transient analysis of transgenic potato overexpressing D-galacturonic acid reductase gene for salinity stress tolerance. *Hort Environ Biotechnol*, 53:320–328.

Vernoux, T., Sanchez-Fernandez, R., May, M. (2002) Glutathione biosynthesis in plants. En Inze D, Montagu MV. *Oxidative stress in plants*. Taylor y Francis, Londres, 297-311.

Vershinin, A. (1999) Biological functions of carotenoids - diversity and evolution. *Biofactors*, 10:99-104.

Verstergaard, C.L., Flyvbjerg, H., Møller, I.M. (2012) Intracellular signaling by diffusion: can waves of hydrogen peroxide transmit intracellular information in plant cells? *Front Plant Sci*, 31;3:295.

Vierling, E. (1991) The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*, 42:579–620.

Vogel, M.O., Moore, M., König, K., Pecher, P., Alsharafa, K., Lee, J., Dietz, K.J. (2014) Fast retrograde signaling in response to high light involves metabolite export, MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE6, and AP2/ERF transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 26: 1151-1165.

Vorst, O., van Dam, F., Weisbeek, P., Smeekens, S. (1993) Light-regulated expression of the *Arabidopsis thaliana* ferredoxin A gene involves both transcriptional and post-transcriptional processes. *Plant J*, 3:793–803.

Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A. (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci*, 9:244-52.

Wang, Y., Wisniewski, M., Meilan, R., Webb, R., Fuchigami, L. (2005) Overexpression of cytosolic ascorbate peroxidase in tomato (*Lycopersicon esculentum*) confers tolerance to chilling and salt stress. *J Amer Soc Hort Sci*, 130:167–173.

Weaver, L.M., Swiderski, M.R., Li, Y., Jones, J.D. (2006) The *Arabidopsis thaliana* TIR-NB-LRR R-protein, RPP1A; protein localization and constitutive activation of defence by truncated alleles in tobacco and *Arabidopsis*. *Plant J*, 47:829-40.

Weydert, C.J y Cullen, J.J (2010) Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissues. *Nat Protoc*, 5:51–66.

Wiermer, M., Feys, B.J., Parker, J.E. (2005) Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Curr Opin Plant Biol*, 8:383-389.

Wingler, A., Lea, P.J., Quick, W.P., Leegood, R.C. (2000) Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Phil Trans R Soc Lond*, 355:1517-1529.

Wituszynska, W., Slesak, I., Vanderauwera, S., Szechynka-Hebda, M., Kornas, A., Van Der Kelen, K., Mühlenbock, P., Karpinska, B., Mackowski, S., Van Breusegem, F. y col (2013) LESION SIMULATING DISEASE1, ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1, and PHYTOALEXIN DEFICIENT4 conditionally regulate cellular signaling homeostasis, photosynthesis, water use efficiency, and seed yield in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 161:1795-1805.

Wrzaczek, M., Vainonen, J.P., Stael, S., Tsiatsiani, L., Help-Rinta-Rahko, H., Gauthier, A., Kaufholdt, D., Bollhöner, B., Lamminmäki, A., Staes, A., Gevaert, K., Tuominen, H., Van Breusegem, F., Helariutta, Y., Kangasjärvi, J. (2015) GRIM REAPER peptide binds to receptor kinase PRK5 to trigger cell death in *Arabidopsis*. *EMBO J*, 34:55-66.

Wrzaczek, M., Brosche, M. y Kangasjarvi, J. (2013). ROS signaling loops - production, perception, regulation. *Curr Opin Plant Biol*, 16:575-582.

Wu, A., Allu, A.D., Garapati, P., Siddiqui, H., Dortay, H., Zanol, M.I., Asensi-Fabado, M.A., Munné-Bosch, S., Antonio, C., Tohge, T., Fernie, A.R., Kaufmann, K., Xue, G.P., Mueller-Roeber, B., Balazadeh, S. (2012) JUNGBRUNNEN1, a reactive oxygen species-responsive NAC transcription factor, regulates longevity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 24:482-506.

Xie, H.T., Wan, Z.Y., Li, S., Zhang, Y. (2014) Spatiotemporal Production of Reactive Oxygen Species by NADPH Oxidase Is Critical for Tapetal Programmed Cell Death and Pollen Development in Arabidopsis. *Plant Cell*, 26:2007-2023.

Yanagisawa, S. (2002) The Dof family of plant transcription factors. *Trends Plant Sci*, 7:555-60.

Yano, M., Katayose, Y., Ashikari, M., Yamanouchi, U., Monna, L., Fuse, T., Baba, T., Yamamoto, K., Umehara, Y., Nagamura, Y., Sasaki, T. (2000) Hd1, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the Arabidopsis flowering time gene CONSTANS. *Plant Cell*, 12:2473–2484.

Yao, X., Xiong. W., Ye, T., Wu, Y. (2012) Overexpression of the aspartic protease ASPG1 gene confers drought avoidance in Arabidopsis. *J Exp Bot*, 63:2579-93.

You, J. y Chan, Z. (2015) ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants. *Front Plant Sci*, 6:1-15.

Zaffagnini, M., Bedhomme, M., Lemaire, S.D., Trost, P. (2012) The emerging roles of protein glutathionylation in chloroplasts. *Plant Sci*, 185-186:86-96.

Zanor, M.I., Rambla, J.L., Chaïb, J., Steppa, A., Medina, A., Granell, A., Fernie, A.R., Causse, M., (2009) Metabolic characterization of loci affecting sensory attributes in tomato allows an assessment of the influence of the levels of primary metabolites and volatile organic contents. *J Exp Bot*, 60:2139-54.

Zhang, L. y Becker, D. (2015) Connecting proline metabolism and signaling pathways in plant senescence. *Front. Plant Sci*, 6:552.

Zhang, Q. (2007) Strategies for developing Green Super Rice. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, 104:16402–16409.

Zhang, C., Liu, J., Zhang, Y., Cai, X., Gong, P., Zhang, J., Wang, T., Li, H., Ye, Z. (2011) Overexpression of SIGMEs leads to ascorbate accumulation with enhanced oxidative stress, cold, and salt tolerance in tomato. *Plant Cell Rep*, 30:389–398.

Zhang, Z., Xu, Y., Xie, Z., Li, X., He, Z., Peng, X. (2016) Association-dissociation of glycolate oxidase with catalase in rice: a potential switch to modulate intracellular H₂O₂ levels. *Mol Plant*, 9:737-748.

Zheng, Y., Lyons, T., Ollerenshaw, J.H., Barnes, J.D. (2000) Ascorbate in the leaf apoplast is a factor mediating ozone resistance in *Plantago major*. *Plant Physiol Biochem*, 38:403–411.

Zhao, Q., Xie, Y., Zheng, Y., Jiang, S., Liu, W., Mu, W., Zhao, Y., Xue, Y., Ren, J. (2014) GPS-SUMO: a tool for the prediction of sumoylation sites and SUMO-interaction motifs. *Nucleic Acids Res*, 42:W325-W330.

Zhong, H.H., Young, J.C., Pease, E.A., Hangarter, R.P., McClung, C.R. (1994) Interactions between light and the circadian clock in the regulation of CAT2 expression in Arabidopsis. *Plant Physiol* 104:889–898.

Zhong, H., McClung, C. (1996) The circadian clock gates expression of two Arabidopsis catalase genes to distinct and opposite circadian phases. *Mol. Gen. Genet*, 251:196–203.

Zhou, T., Wang, Y., Chen, J. Q., Araki, H., Jing, Z., Jiang, K., Shen, J., Tian, D. (2004) Genome-wide identification of NBS genes in japonica rice reveals significant expansion of divergent non-TIR NBS-LRR genes. *Mol. Genet. Genomics*, 271:402-415.

Zhu, J.K. (2016) Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*, 167:313-324.

Zhu, J.K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol*, 53:247–273.

Zhu, Q., Zhang, J., Gao, X., Tong, J., Xiao, L., Li, W., Zhang, H. (2010) The Arabidopsis AP2/ERF transcription factor RAP2.6 participates in ABA, salt and osmotic stress responses. *Gene*, 457:1-12.

Zhuang, J., Cai, B., Peng, R.H., Zhu, B., Jin, X.F., Xue, Y., Gao, F., Fu, X.Y., Tian, Y.S., Zhao, W., Qiao, Y.S., Zhang, Z., Xiong, A.S., Yao, Q.H. (2008) Genome-wide analysis of the AP2/ERF gene family in *Populus trichocarpa*. *Biochem Biophys Res Com*, 371:468–474.

Zimmermann, P., Hennig, L., Gruissem, W. (2005) Gene expression analysis and network discovery using Genevestigator. *Trends Plant Sci*, 10:407-409.

Zimmermann, P., Heinlein, C., Orendi, G., Zentgraf, U. (2006) Senescence-specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Cell Environ*, 29:1049-60.