

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctora en Ciencias Biológicas

**Participación de los factores de
transcripción de las familias HD-Zip I y MYB en el
desarrollo vegetal y la adaptación a los cambios
ambientales y nutricionales**

Lic. Fiorella Paola Spies

Directora de Tesis: Dra. Raquel L. Chan

Laboratorio de Biotecnología Vegetal

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral

-2023-

AGRADECIMIENTOS:

A las Instituciones Públicas que hicieron posible que este trabajo de Tesis se lleve a cabo...

A la Universidad Nacional del Litoral y a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, a todas sus autoridades y profesionales que forman parte de esta prestigiosa Casa de Estudios, por permitir mi formación tanto profesional como personal durante mi carrera de grado y posgrado.

A los organismos que financiaron los proyectos que hicieron posible este trabajo de Tesis: al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT).

Al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral, por brindarme un espacio de trabajo e introducirme en la comunidad científica.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por otorgarme la beca para realizar el doctorado.

Y especialmente quiero agradecer al país de Argentina y a todas las Instituciones Educativas Públicas que permitieron mi educación desde los inicios hasta mi formación de posgrado.

A mis formadores durante este trayecto...

A la Dra. Raquel L. Chan por haber aceptado el compromiso de formarme científicamente, y acompañarme durante este largo trayecto, por confiar en mí y enseñarme su vocación científica.

A la Dra. Jesica Raineri por guiarme y allanarme el camino del enorme mundo de las silicuas, por su entusiasmo y alegría contagiosa, dentro y fuera del laboratorio, y su apoyo frente a nuevas ideas y desafíos científicos. Gracias por cada charla y por tanto aguante.

A las Dras. Miguel y Perotti, para todos Virgi y Flor. Porque aún siendo también estudiantes de doctorado siempre tuvieron tiempo para contestar cada duda y ayudar en cada crisis y colapso. Gracias por tantas enseñanzas, laborales y personales.

A los que forman parte del LBV y del IAL...

A Mati, Kari, Juli, Javi, por sus aportes científicos diarios y su ayuda cada vez que se me quemaron los papeles en el laboratorio y no sabía para dónde disparar.

A mis compañeras y compañeros de mesada, Cati, Lucho, Lore, Gustavo, Pau, Pepe, Jeni, por los momentos compartidos de charlas científicas y no tan científicas, por hacer cada día ameno y divertido.

A las amistades de ayer, hoy y siempre...

A mis amigas de la infancia, a mis amigos de la facultad y a los del doctorado, y las nuevas amistades extracurriculares, por cada charla, mate y momento compartido.

A mis amigas Pau y Luci, eternas compañeras tanto dentro del instituto como afuera. Gracias por cada charla, almuerzo, mate. Su compañía en esta etapa le dio el toque que sólo ellas le pueden dar.

A mis amigas Sofi, Emi y Karen, que aún a la distancia supieron estar siempre presentes.

A mi familia, incondicional...

A la querida Olgui, mi mamá y mi pilar, por confiar en mí y tenerme esa paciencia incondicional. Por enseñarme que con esfuerzo y dedicación siempre se puede.

A mis hermanos Lucas y Pablo, pilares claves también, que cerca y lejos siempre están en todas.

A Agus, la hermana que me dio la vida, por cada abrazo, charla y por tanto aguante.

A toda mi familia, papá, padrinos, primos, por siempre estar y por el aguante de siempre.

A mi familia política, la segunda familia que me dio la vida, por cada viaje, asado, juego, charla. Por hacerme sentir parte de la familia desde el primer día. Gracias por tanto cariño en tantos años.

A Nacho, mi compañero de vida y de mundo, mi cable a tierra, por su compañía y paciencia infinita, por estar siempre y confiar en mí.

A los que ya no están, por guiarme en cada paso...

“Si he logrado ver más lejos, ha sido porque
me he subido a hombros de gigantes.”

Isaac Newton.

A mi familia,
mi sostén y mi mejor ejemplo...

PUBLICACIONES:

El presente trabajo de Tesis fue llevado a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (IAL, UNL-CONICET). Los resultados obtenidos dieron lugar a las siguientes publicaciones científicas en revistas internacionales con referato estricto:

Spies FP., Perotti MF., Cho Y., Jo Cl., Hong JC., Chan RL (2023). A complex tissue-specific interplay between the Arabidopsis transcription factors AtMYB68, AtHB23, and AtPHL1 modulates primary and lateral root development and adaptation to salinity. *Plant Journal*, PMID: 37165773, doi: 10.1111/tpj.16273.

Spies FP., Raineri J., Miguel VN., Cho Y., Hong JC., Chan RL (2022). The Arabidopsis transcription factors AtPHL1 and AtHB23 act together promoting carbohydrate transport from pedicel-silique nodes to seeds. *Plant Science*, 315, 111133.

ÍNDICE:

Agradecimientos.....	1
Publicaciones.....	4
Abreviaturas.....	11
Resumen.....	14
Abstract.....	17
1 INTRODUCCIÓN.....	20
1.1 Anatomía, crecimiento y desarrollo de las plantas.....	21
1.2 Fotosíntesis y transporte a lo largo de la planta.....	24
1.2.1 Fotosíntesis.....	24
1.2.2 Transporte entre tejidos fuentes y sumideros.....	25
1.2.3 Familias de proteínas importantes en el transporte intracelular de carbohidratos.....	27
1.3 Los sumideros más distales en la planta de Arabidopsis.....	30
1.3.1 Silicuas y semillas.....	30
1.3.1.1 Desarrollo de silicuas y semillas en Arabidopsis.....	30
1.3.1.2 Dehiscencia de silicuas y abscisión de semillas.....	32
1.3.1.3 Almacenamiento de compuestos de reserva en Arabidopsis.....	33
1.3.2 Las raíces.....	36
1.3.2.1 El sistema radicular de una planta.....	36
1.3.2.2 Organización tisular de una raíz: componentes y funciones.....	37
1.3.2.3 Formación y desarrollo de la raíz principal en Arabidopsis.....	39
1.3.2.4 La arquitectura radicular en estrés salino.....	40
1.3.2.5 La función de los amiloplastos en raíces.....	42
1.3.2.6 Los amiloplastos y el estrés.....	44
1.4 Adaptación y plasticidad vegetal frente a estrés.....	45

1.4.1 Estrés y tipos de respuestas en organismos vegetales: Adaptación y aclimatación.....	45
1.4.2 Plasticidad: característica del desarrollo vegetal.....	46
1.4.3 Plasticidad en tejidos sumideros.....	47
1.5 La regulación de la expresión génica en plantas	48
1.6 Factores de transcripción de plantas.....	49
1.7 Factores de transcripción de la familia homeodominio-cierre de leucinas.....	49
1.8 Factores de transcripción HD-Zip I.....	50
1.9 Función de los factores de transcripción HD-Zip I en raíces de Arabidopsis.....	52
1.10 Función de los factores de transcripción HD-Zip I en flores y frutos de Arabidopsis.....	54
1.11 Factores de transcripción de la familia MYB.....	55
1.12 Factores de transcripción de la familia MYB en el desarrollo radicular.....	57
1.13 Factores de transcripción de la familia MYB en el desarrollo de frutos.....	58
1.14 Interacción de factores de transcripción con otras proteínas como forma de regulación del desarrollo vegetal.....	59
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	61
2.1 Hipótesis.....	62
2.2 Objetivo general.....	62
2.3 Objetivos específicos.....	62
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	64
3.1 Materiales.....	65
3.1.1 Cepas bacterianas y de levaduras.....	65
3.1.2 Especies vegetales.....	66
3.1.3 Medios de cultivo.....	66
3.1.4 Vectores.....	67
3.1.5 Plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	69

3.1.6 Oligonucleótidos.....	69
3.1.7 Construcciones genéticas para plantas.....	71
3.1.7.1 Construcciones para expresar un promotor específico.....	71
3.1.7.2 Construcciones para sobreexpresar un gen específico.....	72
3.1.7.3 Construcciones para sobreexpresar un gen específico como fusión otro gen reportero (Tag).....	72
3.1.7.4 Construcciones para ensayos de doble híbrido en levaduras.....	73
3.2 Métodos.....	74
3.2.1 Métodos utilizados para el trabajo con ácidos nucleicos.....	74
3.2.1.1 Transformación de bacterias por electroporación.....	74
3.2.1.2 Obtención y cuantificación de ácidos nucleicos.....	74
3.2.1.2.1 Minipreparación de ADN plasmídico.....	74
3.2.1.2.2 Minipreparación de ADN genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i>	75
3.2.1.2.3 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.....	76
3.2.1.2.4 Extracción y purificación de ARN total.....	76
3.2.1.2.5 Cuantificación de ácidos nucleicos totales.....	77
3.2.2 Reacciones enzimáticas.....	77
3.2.2.1 Digestión de ADN con endonucleasas de restricción.....	77
3.2.2.2 Ligación de moléculas de ADN.....	77
3.2.2.3 Reacción de recombinación GATEWAY®.....	77
3.2.2.4 Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa.....	78
3.2.2.5 Transcripción reversa de ARN total.....	78
3.2.3 Análisis de ácidos nucleicos.....	79
3.2.3.1 Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	79

3.2.3.2 Electroforesis de ARN en condiciones desnaturalizantes.....	79
3.2.3.3 Cuantificación de transcritos de PCR en tiempo real.....	80
3.2.3.4 Determinación de la secuencia de moléculas de ADN.....	80
3.2.3.5 Análisis de las secuencias.....	80
3.2.4 Métodos para el trabajo con material vegetal.....	81
3.2.4.1 Obtención del material vegetal y condiciones de cultivo.....	81
3.2.4.1.1 Desinfección y cultivo in vitro de <i>Arabidopsis thaliana</i>	81
3.2.4.1.2 Cultivo de plantas en macetas.....	81
3.2.4.1.3 Transformación estable de <i>Arabidopsis thaliana</i>	82
3.2.4.1.4 Selección de transformantes de <i>Arabidopsis thaliana</i>	82
3.2.4.1.5 Selección de líneas transgénicas homocigotas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	83
3.2.4.1.6 Transformación transitoria de <i>Nicotiana benthamiana</i>	83
3.2.5 Análisis de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	83
3.2.5.1 Análisis histoquímico de la actividad de la β -glucuronidasa.....	83
3.2.5.2 Cortes histológicos.....	84
3.2.5.3 Medición de la longitud de raíces en plántulas.....	84
3.2.5.4 Cuantificación de raíces laterales en plántulas.....	84
3.2.5.5 Tratamientos con hormonas o salinidad en plántulas.....	85
3.2.5.6 Observación de amiloplastos en raíces.....	85
3.2.5.7 Cuantificación del contenido de sustancias de reserva.....	86
3.2.5.7.1 Cuantificación de lípidos.....	86
3.2.5.7.2 Cuantificación de proteínas.....	86
3.2.5.7.3 Cuantificación de carbohidratos (glucosa, sacarosa y almidón).....	87
3.2.5.8 Ensayo de transporte en silicuas con sonda CFDA.....	88
3.2.6 Métodos para el trabajo con levaduras.....	88

3.2.6.1 Doble híbrido en levaduras.....	88
3.2.6.2 Cultivo y transformación de levaduras.....	89
3.2.6.3 Evaluación de la transactivación en levaduras.....	89
4 RESULTADOS.....	90
4.1 Los factores de transcripción AtHB23, AtMYB68 y AtPHL1 interaccionan en el núcleo de células vegetales.....	91
4.2 AtPHL1 y AtMYB68 también interaccionan entre sí.....	94
4.3 Los patrones de expresión de <i>AtHB23</i> y <i>AtPHL1</i> se solapan en los nodos pedicelo-silicua y en funículos.....	95
4.4 AtPHL1 y AtHB23 inhiben la formación del botón floral y la apertura de silicuas.....	97
4.5 El contenido lipídico está reducido en semillas de plantas <i>phl1</i> y <i>amiR23</i>	99
4.6 Las plantas mutantes <i>phl1</i> , <i>amiR23</i> y <i>phl1xamiR23</i> transportan más lentamente carbohidratos desde pedicelos hacia silicuas.....	101
4.7 Las mutantes <i>phl1</i> , <i>amiR23</i> y <i>phl1xamiR23</i> no presentan diferencias en el contenido de carbohidratos de tejidos fuente.....	107
4.8 AtPHL1 y AtHB23 no están involucrados en la regulación del desarrollo de diversas características fisiológicas de Arabidopsis.....	108
4.9 AtPHL1 y AtHB23 modulan la expresión de transportadores de carbohidratos.....	108
4.10 <i>AtMYB68</i> y <i>AtPHL1</i> coexpresan con <i>AtHB23</i> en tejidos y estadios de desarrollo específicos de las raíces.....	111
4.11 <i>AtMYB68</i> y <i>AtPHL1</i> tienen un rol en el desarrollo de raíz principal y raíces laterales junto con <i>AtHB23</i>	112
4.12 El flujo de auxinas y transportadores de esta hormona se ven alterados en plantas mutantes <i>phl1</i> y <i>amiR68</i>	115
4.13 <i>AtHB23</i> , <i>AtMYB68</i> y <i>AtPHL1</i> participan en la respuesta a estrés salino con funciones cooperativas y opuestas	119

4.14 La capacidad de adaptación de plantas mutantes, sobreexpresantes y cruza de <i>AtHB23</i> , <i>AtPHL1</i> y <i>AtMYB68</i> a condiciones de salinidad, se correlaciona con el estado de gránulos de almidón en la punta de la raíz principal.....	120
4.15 La síntesis y degradación del almidón, en la columela de raíces principales, se ven afectadas por <i>AtPHL1</i> y <i>AtMYB68</i>	123
5 DISCUSIÓN.....	126
5.1 <i>AtHB23</i> y <i>AtPHL1</i> actúan en conjunto promoviendo el transporte de carbohidratos de nodos pedicelo-silicua a semillas.....	127
5.2 <i>AtHB23</i> , <i>AtMYB68</i> y <i>AtPHL1</i> regulan en conjunto la respuesta a salinidad en raíces de <i>Arabidopsis</i> mediante una compleja interacción tejido-específica.....	131
6 CONCLUSIONES.....	134
7 BIBLIOGRAFÍA.....	136

ABREVIATURAS:

35S Promotor del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor

AD Dominio de activación (del inglés, *Activation domain*)

ADG Adenosina difosfato glucosa pirofosforilasa

ADN Ácido desoxirribonucleico

AHA Residuos aromáticos e hidrofóbicos de gran tamaño incrustados en un contexto ácido

ARN Ácido ribonucleico

ARNm ARN mensajero

BD Dominio de unión al ADN (del inglés, *Binding domain*)

BiFC Ensayo de complementación bimolecular de la fluorescencia (del inglés, *Bimolecular Fluorescence Complementation*)

CC Células acompañantes del floema (del inglés, *companion cells*)

CC-SE Complejo de células acompañantes-elementos del tubo criboso

ChIP Inmuno-precipitación de la cromatina

Col Ecotipo columbia

cm Centímetros

dNTP Desoxinucleótidos trifosfato (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

EDTA Ácido etilen-diamino-tetra-acético

FT Factor/es de transcripción

g Gramos

g/l Gramos de soluto en un litro de solución

GFP Proteína fluorescente verde (del inglés, *Green Fluorescent Protein*)

GUS β -glucuronidasa

h Hora

HD Homeodominio

HD-Zip Homeodominio asociado a un motivo cierre de leucinas

His-Tag Cola de histidinas

IAA Ácido Indol-3-Acético

IgG Inmunoglobulina G

kDa Kilodalton

LB Luria-Bertani

Ler Ecotipo Landsberg erecta

LZ Cierre de leucinas, del inglés *Leucine Zipper*

mg Miligramo

mg/l Miligramo de soluto en un litro de solución

miliQ Agua calidad miliQ

min Minutos

ml Mililitro

mM Milimolar (milimoles/litro)

mm Milímetros

mmol Milimoles

MS Medio de cultivo Murashige-Skoog

ng Nanogramos

pb Pares de bases

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

PGM Fosfoglucomutasa plastidial

PP Células asociadas del parénquima de floema (del inglés, *Phloem Parenchyma*)

PRL Primordio de raíz lateral

p/v Gramos de soluto en mililitros de solución

qPCR Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RL Raíz lateral/Raíces laterales

RNA-Seq Secuenciación de ARN (del inglés, *RNA Sequencing*)

RP Raíz primaria

RSA Arquitectura del sistema radicular (del inglés, *Root System Architecture*)

RT Transcripción reversa

RT-qPCR RT seguida de PCR cuantitativa en tiempo real

SDS Dodecil sulfato de sodio

SE Elementos del tubo criboso (del inglés, *Sieve Elements*)

SOS Vía de señalización de Na⁺ (del inglés, *Salt Overly Sensitive*)

SS Sintetas de almidón (del inglés, *Starch Synthases*)

SSP Proteínas de almacenamiento especializadas (del inglés *Seed Storage Proteins*)

STP Transportadores de hexosas (del inglés, *Sugar transport protein*)

SUC Transportadores de sacarosa (del inglés, *Sucrose transporters*)

SUT Transportadores de sacarosa (del inglés, *Sucrose transporters*)

SWEET transportadores de exportación de azúcares (del inglés, *Sugars will eventually be exported transporters*)

TAE Tris Acético EDTA

TAG Triacilglicéridos

Tris Tris (hidroximetil)-aminometano

v/v Mililitros de soluto en 100 ml de solución

µg Microgramos

µM Micromolar

µL Microlitros

RESUMEN:

Una de las principales características de las plantas es su plasticidad, dado que son organismos sésiles que no pueden movilizarse hacia lugares con condiciones ambientales óptimas para crecer y desarrollarse. Es decir que un determinado genotipo puede dar lugar a una amplia variedad de fenotipos diferentes, dependiendo del medioambiente. Es por esto que la plasticidad y capacidad de percibir señales externas les permite a las plantas ajustar su patrón de crecimiento y desarrollo en forma continua. En las respuestas a los cambios medioambientales, las plantas ponen de manifiesto cascadas de señalización específicas, finamente reguladas, de las cuales dependerán su crecimiento, y posterior supervivencia.

La regulación de la expresión génica en plantas se da a distintos niveles, de los cuales el control transcripcional es uno de los mecanismos principales. En estos procesos tienen un papel fundamental las proteínas reguladoras denominadas Factores de Transcripción (FT). Estas proteínas están formadas por diferentes dominios entre los cuales se destacan uno de unión al ADN (BD) y otro de interacción proteína-proteína, a través del cual pueden mediar la activación o represión de la transcripción. En plantas, los FT son especialmente abundantes, representando aproximadamente el 5 % de los genomas de *Arabidopsis* y arroz. Los 1572 FT de *Arabidopsis* se clasifican en familias principalmente según sus dominios de unión al ADN, y éstas a su vez en diferentes subfamilias según la presencia de otros motivos conservados y demás rasgos estructurales y funcionales.

Una de las principales familias de FT de plantas se conoce como la superfamilia Homeodominio-Cierre de leucinas (HD-Zip) compuesta por cuatro subfamilias denominadas I, II, III y IV. Los miembros de esta familia se caracterizan por la presencia de un dominio de cierre de leucinas (LZ), ubicado inmediatamente aguas abajo del dominio de unión al ADN (HD). El LZ se pliega en una estructura tridimensional que le permite la formación de homodímeros o heterodímeros a través de interacciones hidrofóbicas entre ambos péptidos. Si bien se pueden encontrar HDs y LZs en FT de otros reinos eucariotas, su combinación en una sola proteína es exclusiva de las plantas. La subfamilia I de proteínas HD-Zip está compuesta por 17 miembros. Estas proteínas tienen un tamaño de aproximadamente 35 kDa, un HD altamente conservado y un LZ menos conservado. Se han identificado otros motivos conservados en estos FT, localizados en las regiones amino y carboxilo terminales con respecto al dominio HD-Zip, aunque a la mayoría de estos motivos no se les ha asignado una función aún. Se cree que estos motivos juegan un papel importante en las redes de señalización en las

que participan los FT HD-Zip, determinando de esta manera su funcionalidad, probablemente mediante la interacción con otras proteínas reguladoras.

El FT AtHB23 es un miembro de la familia HD-Zip I de *Arabidopsis thaliana*. Tiene algunas funciones redundantes y otras divergentes con su parólogo AtHB13. Los estudios funcionales previos determinaron que este FT es fundamental para la supervivencia de las plantas en medio salino y que juega un papel fundamental en el desarrollo radicular.

Si bien esas funciones fueron establecidas claramente, los mecanismos moleculares puestos en juego para ejercerlas no quedaron claros. Planteamos como hipótesis que AtHB23 requeriría de la interacción con otra proteína, probablemente otro FT, para jugar su rol.

En este trabajo de Tesis nos propusimos estudiar con qué proteínas reguladoras interacciona el FT AtHB23, y cuál es la función de dicha interacción en el desarrollo vegetal, tanto en condiciones normales como frente a estrés abiótico, particularmente el generado por salinidad.

Con este objetivo, se llevó a cabo inicialmente un ensayo de doble híbrido en levaduras (Y2H) empleando AtHB23 como carnada frente a una biblioteca que codificaba todos los FT de *Arabidopsis*. A partir de estos ensayos, se encontraron dos posibles proteínas interactuantes de la familia MYB: AtPHL1 y AtMYB68. Posteriormente, se confirmó interacción de AtHB23 con ambas mediante ensayos independientes en levaduras y de BiFC en plantas de tabaco. Con el objetivo de evaluar si además de interactuar con AtHB23, dichas proteínas interaccionaban también entre sí, se realizaron nuevos ensayos de BiFC, corroborando la interacción entre AtPHL1 y AtMYB68.

Dado que la coexpresión de FT en el mismo tejido, etapa de desarrollo y condición ambiental es un requisito absoluto para sugerir una interacción funcional proteína-proteína, decidimos evaluar el patrón de expresión de AtPHL1 y AtMYB68 para lo que utilizamos plantas transformadas con construcciones en las que los promotores de estos genes dirigen la expresión del reportero GUS. Los ensayos de histoquímica mostraron que tanto AtHB23 y AtPHL1 se coexpresaron en los nodos pedicelo-silicua y en el funículo. Además, el estudio de las plantas mutantes *phl1* y silenciadas *amiR23* mostraron una marcada reducción del contenido de lípidos en las semillas, aunque la composición de lípidos no cambió en comparación con el tipo salvaje. Si bien los contenidos de proteínas y carbohidratos no fueron significativamente diferentes entre semillas de plantas mutantes y plantas salvajes, observamos un contenido reducido de carbohidratos en silicuas jóvenes de plantas mutantes (7 días después de la polinización). Además, utilizando una sonda CFDA, revelamos un

transporte enlentecido a las semillas de las mutantes y silenciadas. A continuación, se determinó que los genes que codifican para los transportadores de carbohidratos SWEET10 y SWEET11, generalmente expresados en tejidos de transporte, se encontraban reprimidos en las plantas mutantes *phl1* y *amiR23*. En conjunto, estos resultados indicaron que *AtHB23* y *AtPHL1* actúan juntos, promoviendo el transporte de sacarosa, y la falta de cualquiera de los dos genera características diferenciales, entre ellas una reducción en el transporte de carbohidratos y en el contenido de lípidos de las semillas.

El otro tejido en el cual los tres FT en estudio se coexpresan, es la raíz, por lo que decidimos caracterizar el fenotipo de mutantes y sobreexpresantes de las dos proteínas MYB en este órgano. En condiciones normales, las plantas silenciadas *amiR68* tienen menor cantidad de RL iniciadas, el fenotipo opuesto al que presentan las plantas *amiR23*. El análisis de plantas mutantes y sobreexpresantes reveló que *AtMYB68* y *AtPHL1* juegan papeles opuestos en el alargamiento de raíces laterales. Además, en condiciones de salinidad, en las que *AtHB23* juega una función positiva crucial, se observó que *AtMYB68* tiene una función cooperativa, mientras que *AtPHL1* impide su acción, lo que afecta la capacidad de supervivencia. La capacidad de adaptación de la raíz se asoció con el estado de los amiloplastos presentes en las células de la columela. En su conjunto, estos resultados permitieron identificar nuevos integrantes moleculares que, a través de una relación compleja, determinan la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis* y la capacidad de supervivencia en condiciones de salinidad. Esta interacción se da a nivel proteína-proteína con un juego de abundancia de cada uno de los miembros de este triplete dando lugar a una regulación fina de estos eventos del desarrollo y respuesta al medioambiente.

Al finalizar este trabajo de Tesis pudimos hacer una contribución a la comprensión de la regulación de la expresión génica que gobierna el desarrollo y la plasticidad radicular en plantas de *Arabidopsis*.

ABSTRACT:

Plasticity is one of the main characteristics of plants since they are sessile organisms that cannot move to places with optimal environmental conditions to grow and develop. In other words, a given genotype can give rise to different phenotypes depending on the environment. For this reason, plasticity and the ability to perceive external signals allow plants to adjust their pattern of growth and development. In response to environmental changes, plants display specific, finely regulated signaling cascades, on which their growth and subsequent survival will depend.

The regulation of gene expression in plants occurs at different levels, of which transcriptional control is one of the most important. Regulatory proteins called Transcription Factors (TF) play fundamental roles in these processes. These proteins have different functional regions, including a DNA binding domain (BD) and a protein-protein interaction one, through which they can mediate the activation or repression of their target genes. TFs are especially abundant in plants, representing approximately 5% of the Arabidopsis and rice genomes. The 1572 Arabidopsis TFs are classified into families mainly based on their DNA-binding domains, and these are divided into different subfamilies based on the presence of other conserved motifs and other structural and functional features.

One of the plant's TFs families is known as the Homeodomain-Leucine Zipper (HD-Zip) superfamily composed of four subfamilies named I, II, III, and IV. Members of this family are characterized by the presence of a leucine zipper (LZ) domain located immediately downstream of the DNA-binding (HD) domain. The LZ folds into a three-dimensional structure that allows the formation of homodimers or heterodimers through hydrophobic interactions between both peptides. While HDs and LZs can be found in TF from other eukaryotic kingdoms, their combination into a single protein is unique to plants. The HD-Zip protein subfamily I has 17 members in Arabidopsis. These proteins have a size of approximately 35 kDa, a highly conserved HD, and a less conserved LZ. Other conserved motifs have been identified in these TFs, located in the amino- and carboxyl-terminal regions of the HD-Zip domain, although most of these motifs have not been assigned a function yet. These motifs are thought to play roles in signaling pathways, thus determining HD-Zip I functionality, probably through the interaction with other proteins.

AtHB23 TF is a member of the HD-Zip I family of Arabidopsis thaliana. It has some redundant and divergent functions with its paralogue, AtHB13. Previous functional studies determined

that this TF is essential for plant survival in saline medium and plays a fundamental role in root development.

Although these functions were well known, the molecular mechanisms involved are unclear. We hypothesized that AtHB23 would require interaction with another protein, probably another TF, to play its role.

In this Thesis, we investigated which regulatory proteins interact with AtHB23 and what the role of this interaction is in plant development, both under normal conditions and abiotic stress, particularly that generated by salinity.

To this end, we carried out a yeast two-hybrid (Y2H) assay using AtHB23 as bait to screen a library encoding all Arabidopsis TFs. Two potential MYB interacting proteins resulted from this assay: AtPHL1 and AtMYB68. Subsequently, we confirmed the interaction of AtHB23 by independent assays in yeast and BiFC in tobacco plants. To assess whether, in addition to interacting with AtHB23, these proteins also interact with each other, we performed new BiFC assays, corroborating the interaction between AtPHL1 and AtMYB68.

Since the coexpression of TF in the same tissue, stage of development, and environmental condition is an absolute requirement to suggest a functional protein-protein interaction, we decided to evaluate the expression patterns of AtPHL1 and AtMYB68, for which we used transformed plants with constructs in which the promoters of these genes drive the expression of the *GUS* reporter gene. Histochemical assays showed that AtHB23 and AtPHL1 coexpressed in the pedicel-silique nodes and the funicle. Furthermore, the study of *phl1* mutant and *amiR23* silenced plants showed a marked reduction of lipid content in the seeds, although the lipid composition did not change compared to the wild-type. Although the protein and carbohydrate contents were not significantly different between mutants and wild-type seed plants, we observed a reduced carbohydrate content in young siliques of mutant plants (7 days after pollination). Furthermore, using a CFDA probe, we revealed slowed transport to the seeds of the mutants and silenced plants. Next, genes encoding carbohydrate transporters *SWEET10* and *SWEET11*, generally expressed in transport tissues, were repressed in the *phl1* and *amiR23* genotypes. Altogether, the results indicated that AtHB23 and AtPHL1 act together, promoting sucrose transport, and the lack of either generates differential characteristics, including a reduction in carbohydrate transport and lipid content of the seeds.

Aside from the funiculus and the pedicel-silique nodes, *AtHB23*, *AtMYB68*, and *AtPHL1* also coexpress in roots. We determined the expression patterns of both MYB genes using plants transformed with their promoters driving the *GUS* reporter and characterized the phenotype

of mutants and overexpressors in this organ. Under normal conditions, *amiR68* silenced plants have fewer initiated lateral roots, the opposite phenotype to that of *amiR23* plants. The analysis of mutant and overexpressors revealed that AtMYB68 and AtPHL1 play opposite roles in lateral root elongation. Furthermore, under salinity conditions, in which AtHB23 plays a crucial positive role, AtMYB68 was found to cooperate with it, whereas AtPHL1 prevents its action, thus affecting survivability. The adaptive capacity of the root was associated with the state of the amyloplasts present in the columella cells. Amyloplasts were evaluated in all mutant and overexpressor plants, resulting in supportive evidence for the interaction between these three TF. Altogether, these results allowed us to identify new molecular components that, through a complex relationship, determine the architecture of the Arabidopsis root and its ability to survive under salinity conditions. This interaction occurs at the protein-protein level with a set of abundances of each one of the members of this triplet, giving rise to fine regulation of these events of development and response to the environment.

At the end of this Thesis work, we contributed to a better understanding of gene expression governing carbohydrate transport to siliques, root development, and plasticity in Arabidopsis plants.

INTRODUCCIÓN

"Sé el cambio que quieres ver en el mundo."

Mahatma Gandhi

1. INTRODUCCIÓN:

1.1 Anatomía, crecimiento y desarrollo de las plantas

Las plantas son organismos ubicados taxonómicamente en el Reino *Plantae*, caracterizadas por contener millones de células con funciones especializadas. En la madurez, estas células especializadas difieren mucho entre sí en sus estructuras. Sin embargo, todas las células vegetales tienen la misma organización eucariota básica: contienen un núcleo, un citoplasma y orgánulos subcelulares, y están encerradas en una membrana plasmática que define sus límites (Taiz y Zeiger, 2010). Las plantas se caracterizan por ser organismos autótrofos, es decir, son capaces de producir su propio alimento. Tienen requerimientos nutricionales simples: necesitan agua, CO₂ y diferentes compuestos químicos inorgánicos derivados de los minerales del suelo, como así también O₂ (Chrispeels y Sadava, 2003).

Las plantas y los animales están separados por unos 1.500 millones de años de historia evolutiva. Han desarrollado su organización multicelular de forma independiente, pero utilizando el mismo conjunto de herramientas iniciales: el conjunto de genes heredados de su antepasado eucariótico unicelular común. La mayoría de las diferencias en sus estrategias de desarrollo surgen de dos características básicas de las plantas: obtienen su energía de la luz solar, no de la ingestión de otros organismos, y sus células están encerradas en paredes celulares semirrígidas y cementadas entre sí, evitando que se muevan como lo hacen las células animales. Esto dicta un conjunto diferente de mecanismos para dar forma al cuerpo vegetal y diferentes procesos de desarrollo para hacer frente a un entorno ambiental cambiante (Alberts y col., 2002). El desarrollo de la mayoría de las plantas está dramáticamente influenciado por el medio ambiente. Debido a que no pueden adaptarse a su entorno moviéndose de un lugar a otro, las plantas se adaptan alterando el curso de su desarrollo (Alberts y col., 2002).

Es evidente la gran diversidad de tamaños y formas de las plantas a lo largo y ancho del planeta Tierra. Las plantas varían en tamaño desde menos de 1 cm de altura hasta más de 100 m. La morfología de las plantas también es sorprendentemente diversa. Pero independientemente de sus adaptaciones específicas, todas las plantas llevan a cabo procesos fundamentalmente similares y se basan en el mismo plan arquitectónico para crecer y desarrollarse. Las principales características de las plantas que dictan el patrón de desarrollo característico que éstas tienen son los siguientes:

- Como principales productores de la Tierra, las plantas verdes son los mejores “colectores” solares: cosechan la energía de la luz solar al convertirla en energía química, que almacenan en enlaces cuando sintetizan carbohidratos a partir de CO₂ y agua.
- Las plantas no son móviles. Como sustituto de la motilidad, han desarrollado la capacidad de crecer hacia los recursos esenciales, como la luz, el agua y los nutrientes minerales, a lo largo de su vida.
- Las plantas terrestres están estructuralmente reforzadas para soportar su masa a medida que crecen hacia la luz del sol en contra de la gravedad.
- Las plantas terrestres pierden agua continuamente por evaporación y han desarrollado mecanismos para evitar la desecación.
- Las plantas terrestres tienen mecanismos para mover agua y minerales del suelo a los sitios de fotosíntesis y crecimiento, así como mecanismos para mover los productos de la fotosíntesis a órganos y tejidos no fotosintéticos.

En función de estas características, la estructura global de una planta puede ser muy variable, ya sea su patrón de raíces y ramas o su número de hojas y flores. Sin embargo, su organización detallada a pequeña escala no lo es. Una hoja, una flor o, de hecho, un embrión de una planta joven, se especifica con tanta precisión como cualquier órgano de un animal que posea una estructura determinada, en contraste con el patrón indeterminado de ramificación y brotes de la planta como un todo (Alberts y col., 2002).

Las plantas vasculares (también conocidas como traqueofitas), se caracterizan por contener tejidos que transportan los fluidos a través de la planta, llamados xilema y floema. A estas plantas se las conoce comúnmente como “plantas superiores”, y se dividen en plantas con y sin semillas. Las plantas sin semillas se caracterizan por contar con esporas como unidad de dispersión que persiste por siglos, y son las responsables de colonizar nuevos hábitats. Las plantas con semillas (también conocidas como espermatofitas) forman el grupo de plantas más familiar, y se caracterizan por formar semillas como unidad de dispersión. Hay dos categorías de plantas con semillas: Gimnospermas (del griego, "semilla desnuda") y Angiospermas (del griego, "semilla de recipiente" o “semillas contenidas en un recipiente”).

Las angiospermas, el tipo más avanzado de plantas con semillas, se hicieron abundantes por primera vez durante el período Cretácico, hace unos 100 millones de años, y, actualmente, dominan el paisaje. La principal innovación de las plantas angiospermas es el órgano de la flor; por lo tanto, se las conoce también como “plantas con flores”. Este grupo de plantas está representado por al menos 300000 especies (Raven y col., 2013), lo que las convierte en el

grupo más grande de organismos fotosintéticos (Barclay, 2015). Sin embargo, a pesar de su diversidad, todas las plantas con semillas crecen y se desarrollan a partir de unos pocos tipos diferentes de células, tejidos y órganos, y tienen una estructura anatómica común compuesta por 4 órganos principales: raíces, tallos, hojas y flores (Figura 1; Taiz y Zeiger, 2010).

El desarrollo de una planta con flores, al igual que el de un animal, comienza con la división de un óvulo fecundado para formar un embrión con una organización polarizada: la parte apical del embrión formará el brote, la parte basal, la raíz y la región del medio, el tallo. Al principio, la división celular ocurre en todo el cuerpo del embrión. Sin embargo, a medida que el embrión crece, la adición de nuevas células se restringe a pequeñas regiones conocidas como meristemas. Los meristemas apicales, en las puntas de los brotes y las puntas de las raíces, persistirán a lo largo de la vida de la planta, lo que le permitirá crecer agregando secuencialmente nuevas partes del cuerpo en su periferia. Por lo general, el brote genera una serie repetitiva de módulos, cada uno de los cuales consta de un segmento de tallo, una hoja y una yema axilar. Una yema axilar es un nuevo potencial meristema, capaz de dar lugar a una rama lateral.

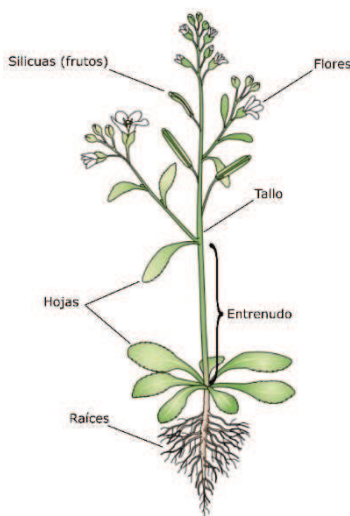


Figura 1. Esquema representativo de los diferentes órganos presentes en una planta con flores. Figura creada con BioRender.

Las señales ambientales, especialmente la luz en el momento adecuado, pueden causar la expresión de genes que cambian el meristema apical de un modo de formación de hojas a uno de formación de flores (cambio de desarrollo vegetativo a reproductivo).

A lo largo de su crecimiento, los órganos y tejidos de una planta experimentan diferentes ambientes y reaccionan a ellos individualmente mediante cambios en su modo de desarrollo. La planta, sin embargo, debe continuar funcionando como un “todo”. Esto exige que las elecciones y eventos de desarrollo en un órgano de la planta afecten las elecciones de

desarrollo en otro. Debe haber señales de largo alcance para lograr tal coordinación. En este caso, se ha identificado la señal de largo alcance del meristema apical, o al menos un componente clave, y es una auxina, miembro de una de las seis clases conocidas de reguladores del crecimiento de las plantas (también llamadas hormonas vegetales), todas las cuales tienen mucha influencia en el desarrollo de las plantas. Las otras cinco clases conocidas son las giberelinas, las citoquininas, el ácido abscísico, el etileno y los brasinoesteroides. Son todas moléculas pequeñas que penetran fácilmente en las paredes celulares, son sintetizadas por la mayoría de las células vegetales, y pueden actuar localmente o ser transportadas para influir en otras células distanciadas (Alberts y col., 2002).

1.2 Fotosíntesis y transporte a lo largo de la planta

1.2.1 Fotosíntesis

La vida en la Tierra depende de la energía derivada del sol. La fotosíntesis es el único proceso de importancia biológica que puede recolectar esta energía. Además, una gran fracción de los recursos energéticos del planeta proviene de la actividad fotosintética producida en tiempos recientes o antiguos (combustibles fósiles).

El término fotosíntesis significa literalmente "síntesis usando luz". Los organismos fotosintéticos utilizan la energía solar para sintetizar compuestos de carbono que no pueden formarse sin el aporte de energía. Más específicamente, la energía de la luz impulsa la síntesis de carbohidratos a partir de CO₂ y agua con la generación de oxígeno. La energía almacenada en estas moléculas se puede usar más tarde para impulsar los procesos celulares en la planta y puede servir como fuente de energía para todas las otras formas de vida (Taiz y Zeiger, 2010).

Durante la evolución, las primeras plantas terrestres fueron desafiadas por serias presiones ambientales para su supervivencia. El principal desafío fue la absorción y retención de agua. Esta presión por la supervivencia condujo a la diferenciación de raíces, para la absorción de agua y nutrientes inorgánicos, y hojas, para la absorción de luz, fotosíntesis e intercambio gaseoso. En las plantas vasculares existen tejidos funcionalmente destinados al transporte de agua y nutrientes a lo largo de la planta: el xilema es responsable del transporte de agua y minerales desde las raíces hasta las partes aéreas, mientras que el floema facilita la translocación de los productos fotosintéticos, fotoasimilados, hacia los tejidos sumideros (Figura 2). Se estima que un alto porcentaje del carbono fijado fotosintéticamente puede exportarse de las hojas maduras.

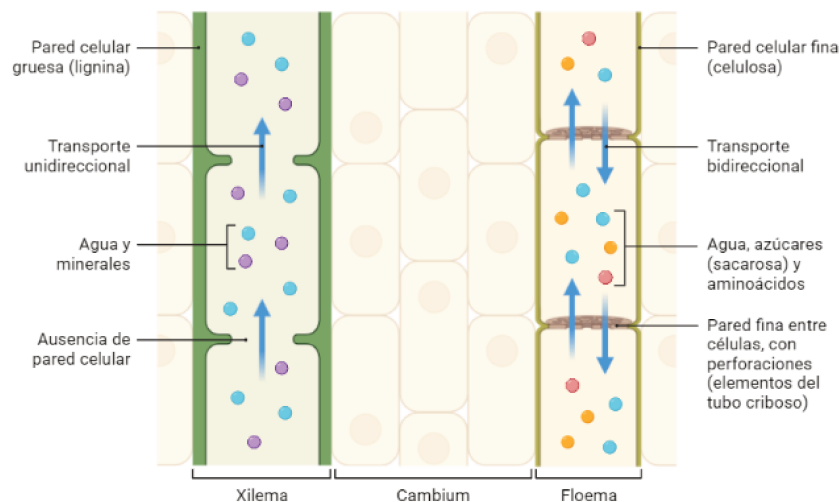


Figura 2. Esquema representativo de los sistemas de transporte en una planta dicotiledónea: xilema y floema. Figura creada con BioRender.

Los órganos fotosintetizadores que tienen azúcares excedentes, pueden metabolizarlos o exportarlos; son los tejidos conocidos como “fuentes”. Por el contrario, los órganos que metabolizan activamente o los que almacenan carbohidratos necesitan importarlos. Estas partes de la planta se conocen como “sumideros”. Una planta consta de una serie de fuentes y sumideros, con muchos sumideros que compiten por los azúcares exportados por los órganos fotosintéticos de origen. El floema juega un papel importante como conexión entre la fuente y el sumidero. En la etapa temprana de desarrollo de una planta, las raíces y los brotes compiten principalmente por recibir fotoasimilados y, más tarde, otros órganos se convierten en sumideros efectivos.

Los sistemas de transporte de larga distancia son parte integral del funcionamiento exitoso de las plantas terrestres (Buchanan y col., 2015), lo que permite asegurar la correcta distribución de los fotosintatos hacia todos sus órganos. El xilema transporta el agua y los nutrientes del suelo desde las raíces hasta las hojas, y el floema transporta agua, elementos minerales, compuestos amino-nitrogenados y azúcares o fotoasimilados (principalmente sacarosa) desde hojas u órganos de almacenamiento (tejidos fuentes) hacia los órganos heterótrofos de crecimiento o almacenamiento (tejidos sumideros) para cumplir con los requisitos de nutrientes necesarios para su desarrollo (Figura 2).

1.2.2 Transporte entre tejidos fuentes y sumideros

La partición es un proceso clave en los tejidos sumideros, y consiste en la regulación del uso del carbono fijado en las diversas vías metabólicas posibles. Una vez que los azúcares de transporte se han descargado y entran en las células del tejido sumidero, pueden permanecer como tales o pueden transformarse en otros compuestos. En los tejidos sumideros de

almacenamiento, el carbono fijado se puede acumular como sacarosa o hexosa en vacuolas o como almidón en amiloplastos. En los sumideros de crecimiento, los azúcares se pueden utilizar para la respiración y para la síntesis de otras moléculas necesarias para el crecimiento (Taiz y Zeiger, 2010).

El tejido del floema se compone de tres tipos especializados de células: las células acompañantes (CC por *companion cells* en inglés), los elementos cribosos (SE por *Sieve elements* en inglés) y las células asociadas del parénquima del floema (PP por *Phloem parenchyma* en inglés) que rodean a las CC y SE. Debido a que los SE pierden el núcleo en la madurez, están respaldados por su CC contigua, que sustenta el metabolismo y la energía de ambas células; por lo tanto, a menudo se los denomina como complejo CC-SE. Los SE individuales se conectan a través de placas o poros (conocidas como *sieve plates* en inglés) en sus paredes finales para formar la estructura final con forma de tubo, una ruta de transporte contigua por donde los nutrientes son transportados (Braun 2022, Figura 3).

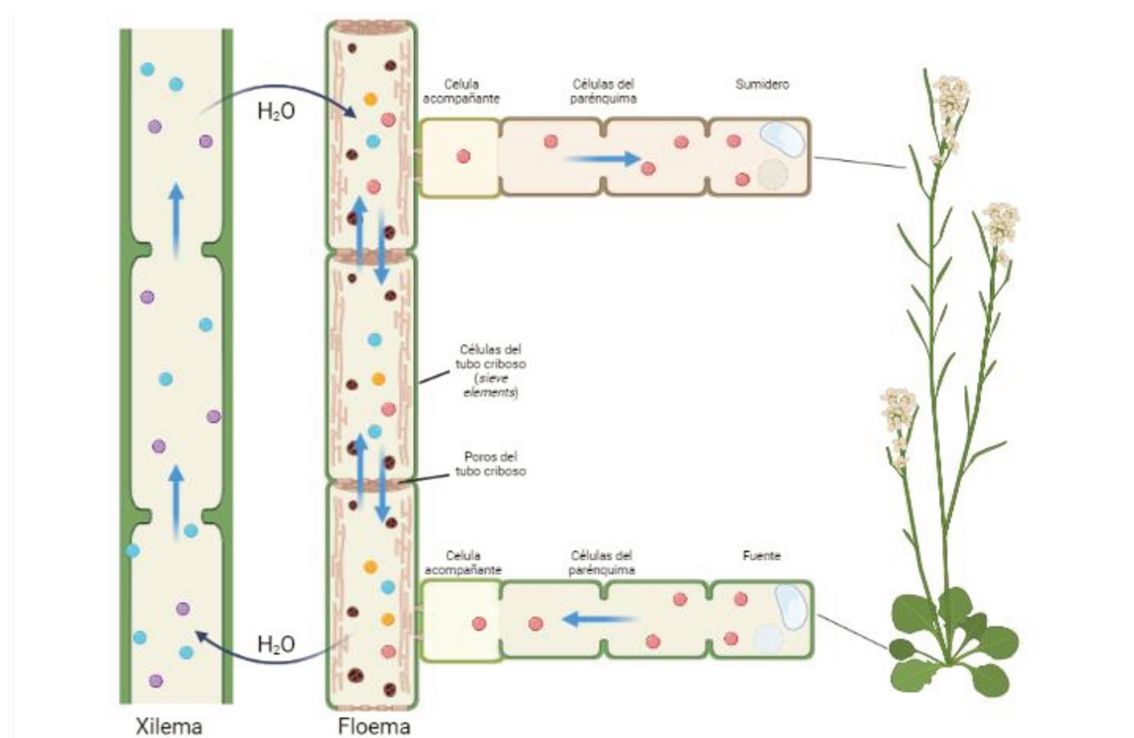


Figura 3. Esquema representativo de los componentes celulares del sistema de transporte del floema en plantas vasculares con flores. Figura creada con BioRender.

En 1930 Münch propuso que el movimiento de solutos a través de los SE puede explicarse por una diferencia de presión hidrostática entre los tejidos fuente y sumidero (Knoblauch y Peters, 2017). En las hojas, la sacarosa, los aminoácidos, los ácidos orgánicos, los iones y otros solutos se acumulan en los tubos cribosos con una osmolaridad muy alta (Ohshima y col, 1990). Esta

alta concentración de soluto atrae agua del xilema hacia los tubos cribosos, elevando la presión hidrostática dentro de las células. En los tejidos sumideros, los solutos se retiran de los tubos cribosos hacia las células del parénquima adyacentes, con el correspondiente retorno de agua al xilema, lo que reduce la presión dentro de los tubos cribosos. La diferencia de presión en los tubos cribosos entre los tejidos fuente y sumidero impulsa el flujo de solutos a favor del gradiente de presión, transportando de esta manera sacarosa y otros solutos a los tejidos sumideros (Braun, 2022).

1.2.3 Familias de proteínas importantes en el transporte intracelular de carbohidratos

Una vez cargado el floema con los fotoasimilados de los tejidos fuentes, la dirección del transporte de éstos es a favor del gradiente de concentración hacia los tejidos sumideros. La alta concentración de azúcares en el floema de transporte impulsa la entrada osmótica de agua desde el xilema y conduce a un gradiente de presión osmótica hacia los tejidos sumideros (Knoblauch y Peters, 2017).

La carga/descarga se da a través de estructuras tanto simplásticas como apoplásticas. El mecanismo de transporte simplástico no requiere ningún transportador de sacarosa específico y se basa en la conexión de las células a través de plasmodesmos, que son extensiones tubulares de la membrana plasmática que atraviesan la pared celular y conectan los citoplasmas de las células adyacentes. Debido a que la mayoría de las células vegetales están interconectadas de esta manera, sus citoplasmas forman una continuación a la que se denomina simplasto (Taiz y Zeiger, 2010). El transporte intercelular de solutos a través de los plasmodesmos se denomina "transporte simplástico". Por otro lado, el apoplasto es el sistema continuo de paredes celulares y espacios de aire intercelulares en los tejidos vegetales. El transporte a través de éste se denomina transporte apoplástico (Taiz y Zeiger, 2010). En cada uno de los límites apoplásticos se requieren tanto pasos de exportación al espacio apoplástico como pasos de importación a la siguiente capa de células aisladas simplásticas (Baud y col., 2008). El mecanismo de transporte apoplástico de sacarosa involucra varios transportadores de salida/entrada y la translocación de sacarosa a través de las membranas (Lemoine y col., 2013, Ludewig y Flügge, 2013, Kühn y Grof., 2010). Una representación de estos tipos de transporte se esquematiza en la Figura 4.

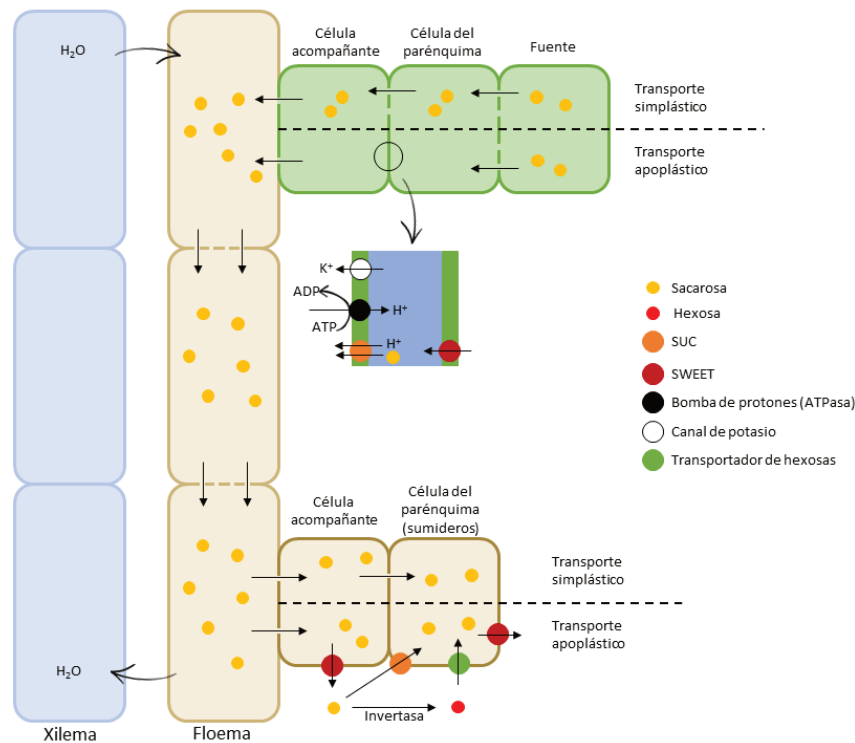


Figura 4. Esquema de los transportes simplástico y apoplástico a lo largo del transporte de larga distancia en plantas vasculares. Figura adaptada de Lemoine y col., 2013 y Zakhartsev y col., 2016.

Los transportadores de sacarosa (SUT por *Sucrose transporters*) funcionan como simportadores de sacarosa/protones, por lo tanto, en condiciones estándar (alto potencial de membrana negativo y pared celular acidificada), los SUT principalmente importan sacarosa de la pared celular a las células responsables del transporte a larga distancia, estos son principalmente transportadores de las familias SUC (del inglés, *Sucrose transporters*) y STP (transportadores de hexosas de tipo simport, del inglés, *Sugar transport protein*). Sin embargo, la sacarosa se sintetiza a partir de precursores derivados de la fotosíntesis en las células del mesófilo, en hojas. Por lo tanto, en algún momento, la sacarosa debe liberarse en la pared celular, ya sea directamente desde el mesófilo o desde las células de la vaina del haz vascular, o si la sacarosa puede moverse de una célula a otra a través de los plasmodesmos. Por esto también son necesarios los transportadores de exportación de azúcar para la secreción de los fotoasimilados en los tejidos sumideros, en este sentido juegan un rol clave los transportadores de la familia SWEET (del inglés, *Sugars will eventually be exported transporters*) (Eom y col., 2015; Figura 4).

Las familias de transportadores de sacarosa difieren en sus propiedades funcionales: los miembros de la familia SWEET facilitan el flujo de salida de sacarosa (Chen y col., 2014),

mientras que los miembros de las familias SUC y STP realizan la captación de sacarosa o azúcar de tipo *symport* con los protones, es decir, utilizan la energía almacenada en la bomba de protones para importar azúcares en contra de un gradiente de concentración desde el apoplasto hacia las células de destino, ya sea del floema o de tejido sumidero (Shiratake, 2007; Boorer y col., 1996; Gahrtz y col., 1994; Figura 4).

En promedio, los genomas de angiospermas poseen 20 proteínas SWEET que exhiben funciones y patrones de expresión distintos, y sólo unas pocas se han caracterizado hasta el momento (Eom y col., 2015). Entre ellos, SWEET11 y 12 proporcionan sacarosa a los SUT para la carga del floema y, junto con SWEET15, se expresan en semillas y juegan un papel crucial en el llenado de las mismas. Por otro lado, SWEET11 y 12 se expresan en hojas y están regulados por el fotoperíodo y el reloj circadiano. La triple mutante *sweet11/12/15* exhibe defectos severos como retraso en el desarrollo del embrión, peso reducido de la semilla y contenido reducido de almidón y lípidos (Chen y col., 2015) En *Arabidopsis*, *SWEET11* se expresa en raíces, cotiledones, hojas caulinares, tallos de inflorescencias y flores (Zakhartsev y col., 2016). La distribución en *Arabidopsis* de algunos de estos transportadores se esquematiza en la Figura 5.

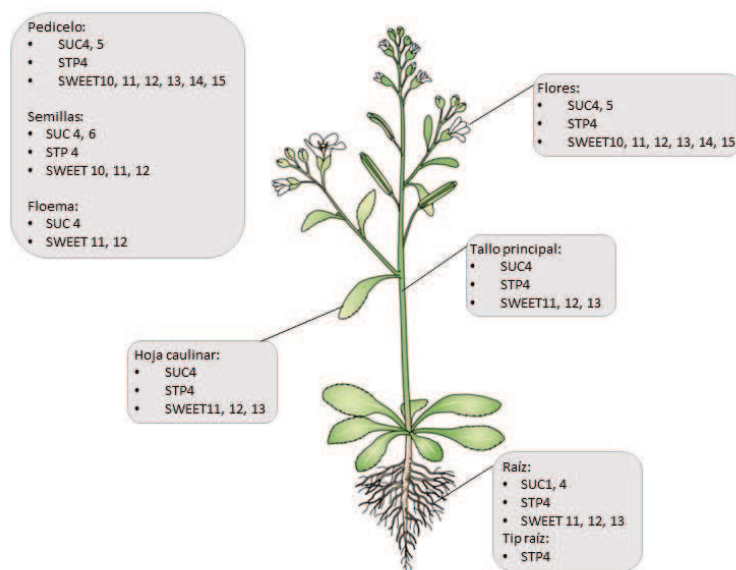


Figura 5. Expresión de genes transportadores de sacarosa en diferentes tejidos de *Arabidopsis thaliana*. Figura resumida de Zakhartsev y col., 2016.

La estructura y el papel de los transportadores de carbohidratos y su importancia para el crecimiento y desarrollo de las plantas han sido ampliamente estudiados. Sin embargo, la regulación de los genes codificantes es menos conocida. Tanto los factores de estrés biótico

como abiótico afectan los niveles de transcripción de *SWEET* y *SUC*. Por ejemplo, los genes de *Arabidopsis* *SWEET11*, *SWEET12* y *SUC2* se expresan diferencialmente en hojas de plantas y en raíces respecto a los demás transportadores de estas familias (Durand y col., 2016).

1.3 Los sumideros más distales en la planta de *Arabidopsis*

1.3.1 Silicuas y semillas

1.3.1.1 Desarrollo de silicuas y semillas en *Arabidopsis*

Las angiospermas desarrollan estructuras reproductivas complejas: las flores. A pesar de la gran diversidad en forma, color y estructura, comparten una característica común: el plan de desarrollo. La mayoría de las flores consisten en anillos de órganos florales, con órganos estériles externos que rodean las estructuras reproductivas ubicadas en el centro (Figura 6a). Una flor de una planta dicotiledónea típica se compone de cuatro anillos o verticilos de órganos. El verticilo más externo está compuesto por sépalos y dentro de este verticilo se encuentran los pétalos, luego los estambres (órganos reproductores masculinos) y finalmente los carpelos u órganos reproductores femeninos en el centro de la flor (Figura 6a). Más adelante en el desarrollo, los carpelos fertilizados darán lugar al fruto (Robles y Pelaz, 2005).

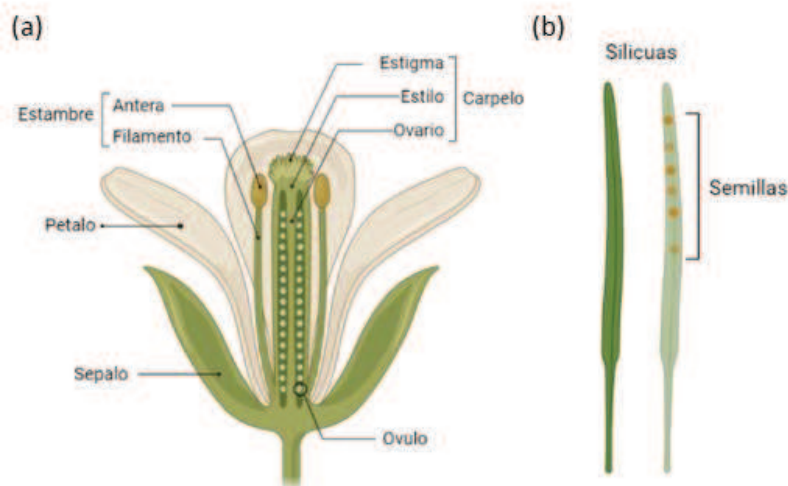


Figura 6. Estructura de la flor y el fruto de *Arabidopsis thaliana*. Figura creada con BioRender.

La evolución ha creado una amplia variedad de frutos diferentes en las angiospermas para asegurar la supervivencia de estas plantas a través de la dispersión de semillas. El fruto es

quizás el órgano más complejo de la planta, ya que está formado por muchos tipos de células y tejidos diferentes. El fruto seco dehiscente de *Arabidopsis*, también llamado silicua, es representativo del fruto de más de 3000 especies de la familia *Brassicaceae*. Su estructura refleja su doble función: proporciona una cámara protectora para las semillas durante la maduración y permite la dispersión de las semillas a través de la diferenciación de varios tipos de células especializadas que forman un mecanismo similar a un resorte que hace que la silicua se rompa al madurar, liberando así las semillas al medio ambiente (Figura 6b). El fruto simple de *Arabidopsis* se deriva directamente del gineceo, que consta de dos carpelos fusionados (Smyth y col., 1990). En la antesis, cuando se abre el botón floral y las anteras entran en dehiscencia, se pueden distinguir externamente en el gineceo dos grandes regiones: la parte apical constituida por el estilo y el estigma, y la parte basal u ovario que contiene los óvulos (Figura 7a). Dado que la vaina de *Arabidopsis* se desarrolla a partir del ovario, cualquier mutación que afecte el desarrollo del ovario tiene un efecto en el desarrollo del fruto (Robles y Pelaz, 2005).

Todas las capas de tejido del fruto maduro ya están presentes en el ovario, por lo que una vez que el gineceo ha sido fecundado por el polen, las células del ovario continúan dividiéndose y creciendo hasta que la silicua alcanza su longitud y grosor final en la madurez, alrededor de los 10 días después de la fecundación. De esta forma, el fruto maduro está constituido mayoritariamente por un ovario alargado (Vivian-Smith y Koltunow, 1999). Internamente, la silicua está formada por dos cavidades separadas por un tabique (Figura 7b). Externamente, se pueden distinguir tres elementos principales del patrón en una silicua: las vainas, el replum y los márgenes de las vainas. Las paredes de la vaina están formadas por seis capas celulares: la epidermis externa o exocarpio, con células alargadas y estomas, tres capas de tejido fotosintético o mesocarpio y el endocarpio, formado por dos capas a y b. El replum es la capa intermedia que constituye el tejido entre las vainas al que se adhieren las semillas en desarrollo a la planta, unidas a la planta madre a partir de una extensión de la placenta, conocido como funículo. El tercer componente estructural del fruto son los márgenes de las vainas que unen las mismas al replum.

La diferenciación de los tejidos requeridos para la apertura o dehiscencia del fruto es, con excepción del desarrollo de las semillas dentro de la silicua, el principal proceso que ocurre durante la formación del fruto de *Arabidopsis* (Ferrándiz, 2002).

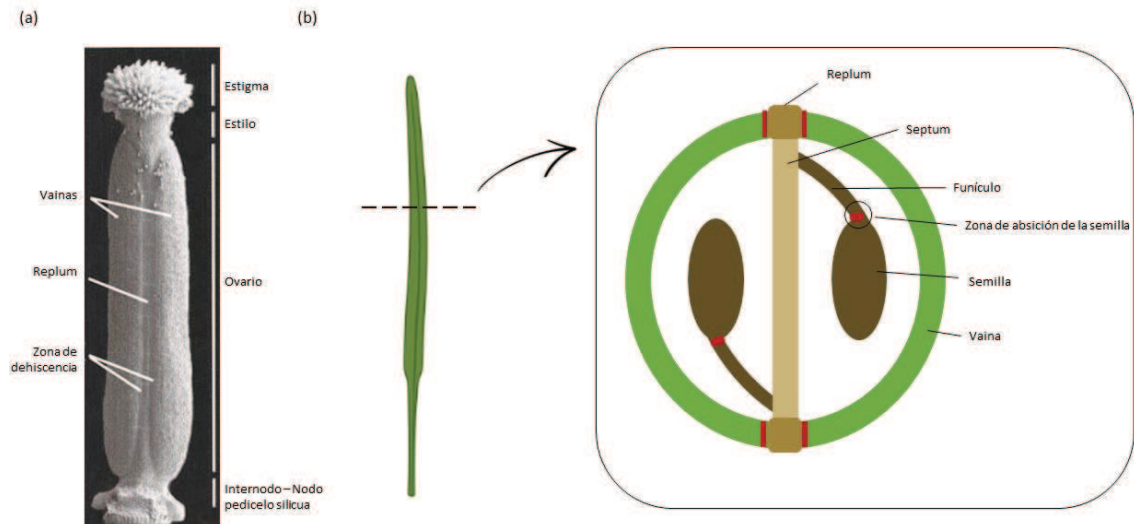


Figura 7. Estructura del fruto de *Arabidopsis thaliana* pre-fecundación (gineceo, a) y post-fecundación (silicua, b). Figuras adaptadas de Ferrándiz y col., 2002 (a) y de Balanzá y col., 2006 (b).

1.3.1.2 Dehiscencia de silicuas y abscisión de semillas

Una fruta es una unidad de dispersión de semillas, implicando un proceso de separación. La separación celular facilita varios procesos a lo largo del desarrollo vegetal, entre ellos: la aparición de radículas a partir de semillas en germinación, la penetración de raíces primarias en el suelo y la emergencia de laterales, la expansión de cotiledones y hojas y el intercambio gaseoso, la liberación de polen de anteras, vainas para sufrir dehiscencia y órganos que deben ser desprendidos. Una característica común de todos estos procesos es que la pared celular se degrada. La evidencia reciente indica que procesos como la dehiscencia de las anteras, el desmoronamiento de las vainas y el desprendimiento de las semillas involucran una secuencia similar de eventos (Jenkins y col., 1999; Sander y col., 2001).

Para dispersar las semillas, los frutos pueden escindirse de la planta o abrirse a través de un proceso conocido como dehiscencia, en el cual las células dentro de la capa de separación de las vainas de las silicuas secretan enzimas que degradan la pared celular y promueven la separación celular. A su vez, la rigidez de la capa lignificada ayuda a la separación de las valvas del *replum*. Este proceso da como resultado la dispersión de semillas (Østergaard, 2009, Spence y col., 1996). Para liberarlas, también deben separarse de los tejidos madre, proceso llamado abscisión. Estos procesos, abscisión del fruto, dehiscencia del fruto y abscisión de la

semilla, tienen algunos elementos comunes: una capa con pequeñas células unidas por la matriz extracelular formada en el punto de ruptura, y la lignificación de las células en los tejidos circundantes (Ballester y Ferrándiz, 2017). La dehiscencia de la vaina permite entonces el desprendimiento de semillas de las silicuas antes y durante la cosecha. Este fenómeno, también conocido como rotura de vainas (o *pod shattering* en inglés), puede causar reducciones sustanciales en el rendimiento de una amplia gama de especies de cultivos (Van Gelderen y col., 2016).

El desprendimiento de órganos vegetales normalmente se asocia con la senescencia del órgano distal; sin embargo, un espectro de factores ambientales puede precipitar prematuramente la caída de hojas, flores o frutos. Éstos están asociados con el estrés provocado como consecuencia de un déficit o exceso de agua, temperaturas extremas o ataques de plagas y patógenos (González-Carranza y col., 1998, Taylor y Whitelaw, 2001), entre otros.

Curiosamente, aunque los diferentes ecotipos de *Arabidopsis* exhiben una amplia diversidad genética y variaciones naturales en sus fenotipos, no se han registrado diferencias en el proceso de dehiscencia del fruto (Roberts y col., 2002).

1.3.1.3 Almacenamiento de compuestos de reserva en *Arabidopsis*

Se define “almacenamiento” como la acumulación de recursos (carbono, nutrientes, etc.) en la planta que pueden movilizarse en el futuro para promover la biosíntesis (Chapin y col., 1990). Las plantas canalizan algunos de sus recursos a compartimentos de almacenamiento (hojas, tallos, raíces), donde están disponibles para el crecimiento futuro.

Una función metabólica esencial de las semillas es la deposición de compuestos que se movilizan para impulsar el crecimiento de las plántulas después de la germinación. Dada la importancia de las semillas para la alimentación humana y animal, y considerando el interés en utilizar productos de almacenamiento de semillas como materias primas industriales sostenibles para reemplazar las reservas fósiles en disminución, la comprensión del control metabólico y del desarrollo del llenado de semillas constituye un tema importante de la investigación de plantas (Baud y col., 2008).

Una semilla debe empaquetar todo el material genético y los nutrientes necesarios para permitir la propagación exitosa de la especie. Su formación es un proceso intrincado que requiere el crecimiento coordinado de tres tejidos de distintos orígenes: embrión, endosperma

y cubierta. El embrión y el endosperma son tejidos cigóticos protegidos por tegumentos derivados de la madre que constituyen la cubierta (*seed coat*). El desarrollo se puede dividir en morfogénesis embrionaria y maduración, esta última caracterizada por la acumulación de compuestos de almacenamiento, la adquisición de tolerancia a la desecación, la detención del crecimiento y la entrada en un período de latencia interrumpido luego por la germinación (Harada, 1997, Goldberg y col., 1994).

Más allá de la diversidad de tamaño, forma y medios de dispersión, un elemento común en las semillas de las plantas es el almacenamiento de compuestos de reserva que se movilizarán para impulsar el crecimiento de las plántulas después de la germinación hasta que la fotosíntesis de las plántulas se pueda establecer de manera eficiente. Estos componentes suelen ser almidón, triacilglicéridos (TAG) y proteínas de almacenamiento especializadas (SSP por *Seed storage proteins* en inglés), cuyas proporciones relativas varían mucho según las especies consideradas. Los compuestos de almacenamiento contribuyen hasta el 90 % del peso seco de la semilla y también constituyen su valor económico en la mayoría de los cultivos extensivos. Los principales compuestos de almacenamiento acumulados en las semillas de *Arabidopsis* consisten en triacilglicéridos y proteínas (Figura 8).

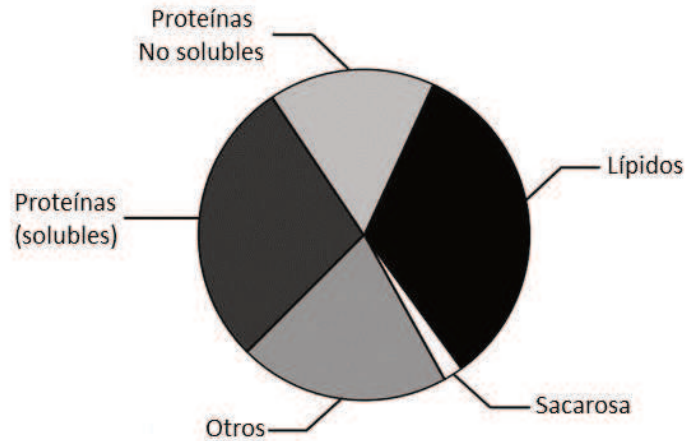


Figura 8. Composición de semillas maduras de *Arabidopsis thaliana*. Figura adaptada de Baud y col., 2008.

Dada la importancia de las semillas en la dieta humana y animal, siglos de investigación agrícola se han dirigido a mejorar las características cualitativas y cuantitativas asociadas de sus componentes. Más recientemente, se han desarrollado algunos enfoques genéticos moleculares para modificar tanto su calidad como su cantidad (Mazur y col., 1999).

Los embriones en estadio de maduración temprana tienen concentraciones elevadas de almidón, mientras se inicia la síntesis y acumulación de lípidos y proteínas (Baud y Graham, 2006; Hills, 2004). Durante la segunda fase del proceso de maduración, el nivel de almidón cae regularmente, mientras que en el embrión se pueden medir altas tasas de síntesis de ácidos grasos y proteínas. Estas actividades biosintéticas sostenidas dan como resultado un aumento constante en el peso seco a lo largo de esta fase (Baud y col., 2002). Finalmente, en la maduración tardía la síntesis de compuestos de almacenamiento finaliza mientras el embrión se vuelve metabólicamente inactivo y tolerante a la desecación. Durante la maduración tardía, el contenido de agua desciende bruscamente del 32 % a menos del 10 % (Baud y col., 2002).

Las semillas son en su mayoría órganos heterótrofos, que dependen de los nutrientes suministrados por la planta madre para su crecimiento y desarrollo (Zhang y col., 2007). Los nutrientes se importan a través del floema, y su carga es un proceso espacial y temporalmente dinámico (Patrick y Offler, 2001). La anatomía de la semilla de *Arabidopsis* es diferente de la descrita para leguminosas y cereales bien caracterizados (Weber y col., 2005). En *Arabidopsis*, el haz vascular termina al final del funículo, no hay tejido vascular dentro de la semilla.

La sacarosa representa la forma principal en la que el carbono asimilado fotosintéticamente se transporta en las plantas. Debido a la ausencia de un enlace simplástico entre los tejidos maternos y filiales en *Arabidopsis*, la sacarosa debe cruzar varios conductos de tipo apoplástico para llegar a los tejidos filiales, como la semilla.

En las semillas secas, las células del embrión y el endospermo están repletos de vacuolas de almacenamiento de proteínas y cuerpos oleosos. Las SSP y los TAG acumulados representan aproximadamente el 30-40 % del peso seco de la semilla (PS) cada uno. Los TAG almacenados en cuerpos oleosos consisten en ésteres de glicerol y ácidos grasos. El contenido de aceite medio es 38 % del PS, y la mayoría de las accesiones estudiadas se encuentran dentro del rango 33-43 % (O'Neill y col., 2003). A pesar de provenir de diversas ubicaciones geográficas, las semillas de todos los ecotipos de *Arabidopsis* analizados hasta ahora contienen ácidos grasos idénticos, pero exhiben variaciones reproducibles en las proporciones relativas de los mismos (Baud y col., 2002).

1.3.2 Las raíces

1.3.2.1 El sistema radicular de una planta

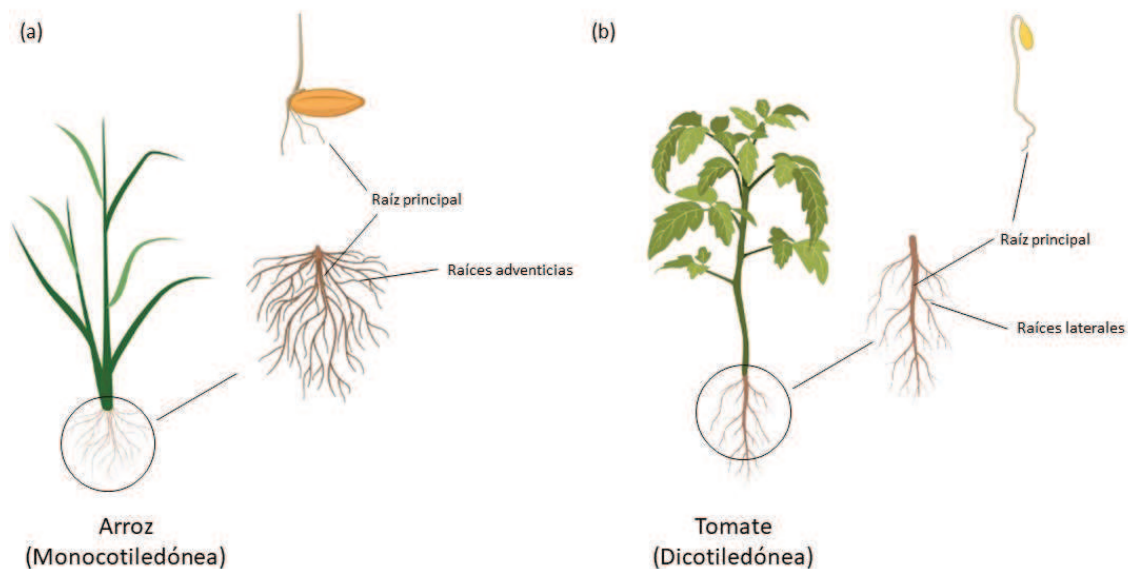
El sistema de raíces permite el anclaje de las plantas al suelo, y además les permite adquirir macro y micronutrientes esenciales y agua. Las raíces tienen también funciones secundarias, como el almacenamiento de fotoasimilados, la síntesis de fitohormonas o la propagación clonal. Durante la evolución, la organización de las raíces ha progresado gradualmente de muy simple, como los rizomas, a altamente jerárquica, incluyendo tejidos especializados (Brundrett, 2002). Es probable que esto se haya debido a que el sistema de raíces es fundamental para enfrentar las principales limitaciones para el crecimiento de las plantas y el éxito reproductivo: la disponibilidad de nutrientes y agua, y la competencia subterránea de otras plantas por estos recursos. Por lo tanto, dependiendo de la composición del suelo, las diferencias en la morfología o arquitectura del sistema radicular (RSA por *Root System Architecture* en inglés) pueden afectar la capacidad competitiva por los recursos del suelo (Fitter, 1987).

La RSA refleja la configuración espacial de las raíces de diferente edad y orden, lo que implica que la estructura general tiene un significado funcional (Lynch, 1995). Esta se puede modular de varias maneras: a través de la promoción o inhibición del crecimiento de la raíz primaria (RP), del crecimiento de las raíces laterales (RL), de la formación de raíces adventicias y de un aumento de los pelos radiculares. La RP se forma durante la embriogénesis, mientras que las RL se generan postembrionariamente de raíces preexistentes. Las RL se originan en la capa de tejido del periciclo (a veces también en la endodermis), generalmente adyacentes a las células del polo del xilema en dicotiledóneas, o células del polo del floema en monocotiledóneas (Casero y col., 1995). Las divisiones anticlinales de las células del periciclo inician las RL, cuyo desarrollo imita la organogénesis de la RP en términos de composición y organización del tejido (Dolan y col., 1993). Este proceso se puede reiterar en las RL de orden superior. En muchas especies, el sistema de raíces también se agranda a través de raíces adventicias, que pueden definirse ampliamente como raíces que se originan en estructuras de brotes, generalmente tallos. Cualquier tipo de raíz puede aumentar su superficie de absorción mediante el crecimiento de extensiones de células epidérmicas, conocidos como los pelos de la raíz (Osmont y col., 2007).

La forma del sistema de raíces difiere mucho entre las especies de plantas. En las monocotiledóneas, como maíz (*Zea mays*) y arroz (*Oryza sativa*), el desarrollo comienza con la aparición de tres a seis ejes radiculares primarios (o seminales) de la semilla en germinación. Este tipo de plantas extiende nuevas raíces adventicias, llamadas raíces nodales o raíces de

refuerzo, y se caracteriza por el desarrollo de muchas raíces adventicias paralelas a la raíz primaria (Figura 9a; Esau, 1965). Con el tiempo, los ejes primario y nodal crecen y se ramifican extensamente para formar un complejo sistema de raíces fibrosas. A diferencia de éstas, las plantas dicotiledóneas como *Arabidopsis*, tomate (*Solanum lycopersicum*) y arveja (*Pisum sativum*), desarrollan sistemas radiculares con un único eje radicular principal, llamado raíz pivotante o primaria, que puede engrosarse como resultado de la actividad cambial secundaria. A partir de este eje principal, se desarrollan las RL para formar un sistema radicular extensamente ramificado (Figura 9b; Taiz y Zeiger, 2010).

En general, una plántula produce una RP que crece hacia abajo y da lugar a RL secundarias. Estos pueden producir raíces terciarias, que pueden ramificarse a su vez, y el proceso continúa casi indefinidamente; nuevas raíces surgen endógenamente del periciclo de la RP (Barclay,



2015).

Figura 9. Imagen representativa de la morfología radicular de plantas monocotiledóneas (a) y dicotiledóneas (b). Figura creada con BioRender.

1.3.2.2 Organización tisular de una raíz: componentes y funciones

El desarrollo del sistema radicular depende de la actividad del meristema apical de la raíz, en el que una pequeña cantidad de células madre en la punta de la raíz genera todos los tipos de células a través de divisiones seguidas de diferenciación y expansión celular (Scheres y col., 2002). Este meristema da origen a los tres meristemas de la raíz: el *procambium* produce los tejidos vasculares del xilema y del floema, el *protodermo* da lugar a la epidermis y el *meristema apical* produce las células del córtex y endodermis (Taiz y Zeiger, 2010).

En el extremo inferior de la raíz de una planta se pueden identificar cuatro zonas de desarrollo (Figura 10b):

1. **Caliptra:** Protege el meristema apical de daños mecánicos a medida que la raíz se abre camino a través del suelo. Las células en esta zona tienen la capacidad de percibir estímulos gravitacionales y de secretar mucopolisacáridos que ayudan a penetrar en el suelo. A medida que las células madre de la cubierta producen células nuevas, las células más viejas se desplazan progresivamente hacia la punta, donde finalmente son desprendidas.

2. **Zona meristemática:** Se ubica en el centro del extremo de la raíz principal. Las células de esta región se dividen tanto en la dirección de la base para formar células que se diferenciarán en los tejidos de la raíz funcional, como en la dirección del ápice para formar la caliptra.

3. **Zona de elongación:** En esta región se da una elongación celular rápida y extensa. Aunque algunas células pueden continuar dividiéndose mientras se alargan dentro de esta zona, la tasa de división disminuye progresivamente al aumentar la distancia desde el meristema.

4. **Zona de maduración o diferenciación:** Es la región en la que las células adquieren sus características diferenciadas, es decir, adquieren propiedades metabólicas, estructurales y funcionales distintas de las células que les dieron origen, y particulares según la función que cada célula desarrollará. Las células entran en la zona de maduración después de que han cesado la división y el alargamiento. La diferenciación puede comenzar mucho antes, pero las células no alcanzan el estado de madurez hasta que llegan a esta zona. El patrón radial de tejidos diferenciados se hace evidente en la zona de maduración (Figura 10a).

La división celular en el ápice de la raíz propiamente dicho es relativamente lenta; por lo tanto, esta región se llama el **centro quiescente**. Después de algunas generaciones de divisiones celulares lentas, las células desplazadas del ápice comienzan a dividirse más rápidamente. La división celular vuelve a disminuir y las células se expanden por igual en todas las direcciones. Luego, en la zona de elongación, las células se alargan rápidamente y se someten a una ronda final de divisiones para producir un anillo central llamado endodermis. Las paredes de esta capa de células endodérmicas se engrosan y la suberina depositada en las paredes radiales forma la franja de Caspar, una estructura hidrofóbica que impide el movimiento apoplástico del agua o los solutos a través de la raíz (Figura 10a). La endodermis divide la raíz en dos regiones: la corteza hacia el exterior y la estela hacia el interior. La estela contiene los elementos vasculares, el floema y el xilema (Taiz y Zeiger, 2010).

Los pelos radiculares, con su gran superficie de absorción de agua y solutos, aparecen por primera vez en la zona de maduración (Figura 10b), y es aquí donde el xilema desarrolla la capacidad de trasladar cantidades sustanciales de agua y solutos al ápice/tallo (Taiz y Zeiger, 2010).

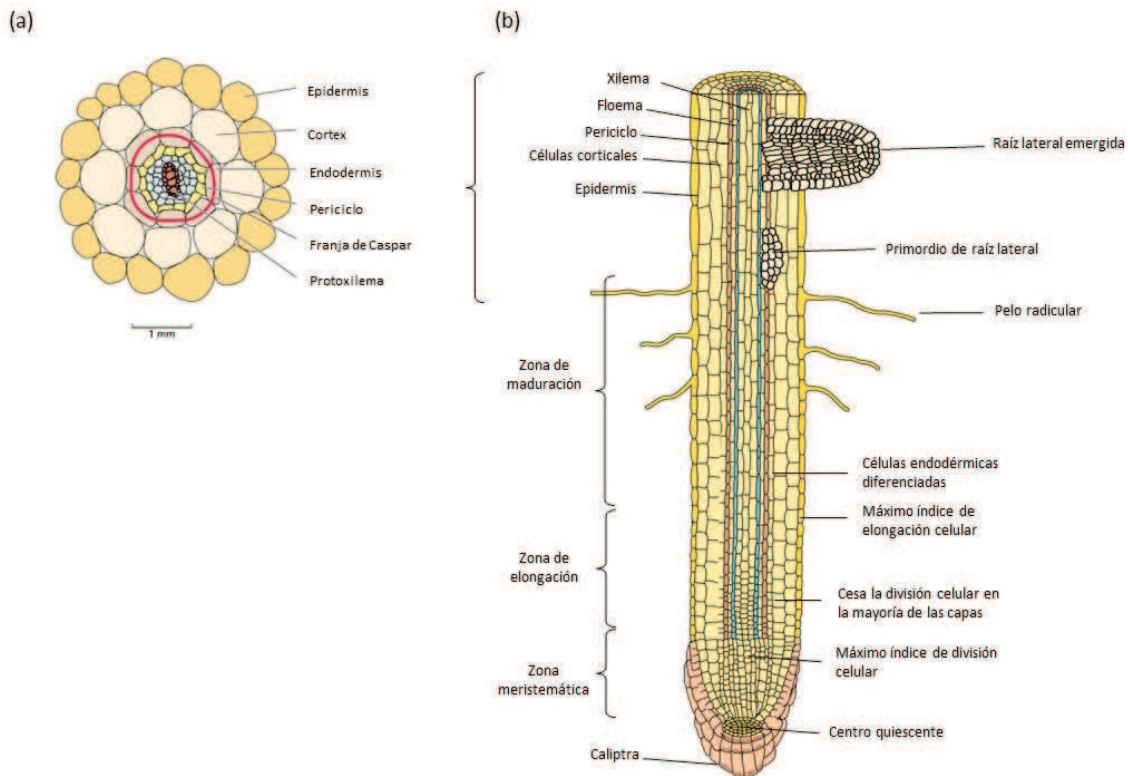


Figura 10. Esquema de la organización tisular de raíces de plantas dicotiledóneas. Corte transversal donde se observa la distribución radial de los tejidos (a); Corte longitudinal de la raíz principal en la que se observan las distintas zonas de desarrollo celular (b). Figura modificada de Taiz y Zeiger, 2010.

1.3.2.3 Formación y desarrollo de la raíz principal en Arabidopsis

Durante el desarrollo del embrión de Arabidopsis, la división celular ocurre en patrones bien definidos. Esto facilita la identificación de las células fundadoras de la RP. El origen del centro quiescente y de la cubierta de la columela se remonta a una sola célula: la hipófisis (Scheres y col., 1994). El límite entre la raíz y el hipocotilo no es evidente en la anatomía del embrión, aunque está claramente marcado luego de la etapa embrionaria por las características diferenciales de los tipos de células individuales de cada órgano, como la formación de pelo radicular y por el contenido de clorofila de las células del tejido fundamental en el hipocotilo (Scheres y col., 2002).

La disposición radial de las células se establece ya durante la embriogénesis y se mantiene a partir de entonces. La disposición de las células iniciales alrededor del centro inactivo, que se

mantiene en la raíz madura, se ha denominado promeristema (Clowes, 1954), y éste se organiza durante la embriogénesis (Scheres y col., 2002). A partir de este meristema, y tras la germinación, las células comienzan a dividirse y la raíz crece axialmente como resultado de la expansión celular. A medida que la raíz continúa creciendo, aumenta el número de células en el meristema y aumenta la tasa de producción de células (Scheres y col., 2002).

Las puntas de las raíces acumulan auxinas, generándose un máximo de esta hormona justo debajo del centro quiescente. Por lo tanto, se requieren auxinas acumuladas en la punta de la raíz para la especificación de las células dependiendo de la posición distal de las mismas (Scheres y col., 2002).

Un aspecto importante de la punta distal de la raíz es que alberga todos los meristemas iniciales, que actúan como células madre para los diferentes linajes celulares, también llamadas células iniciales, y de los cuales existen cuatro tipos (Dolan y col., 1993). Las iniciales epidérmicas o de la cápsula radicular lateral dan origen a la epidermis y la porción externa de la cápsula radicular conocida como cápsula radicular lateral (*lateral root cap*). La parte central de la raíz, la columela, tiene su propio conjunto de células iniciales. Las células del tejido fundamental, la corteza y la endodermis, se generan por división de las iniciales de la corteza, también llamadas endodérmicas. Por último, el tejido vascular y el periciclo tienen sus propias células iniciales también. En contacto con las mismas, hay un pequeño número de células centrales que son mitóticamente inactivas y se conocen en su conjunto como el centro quiescente (Figura 10b). La división de las células iniciales puede ser únicamente anticlinal (ortogonal al eje de crecimiento) que da como resultado una sola fila de células, o primero anticlinal y luego periclinal (paralela al eje de crecimiento) que da como resultado dos o más capas de células. Las células iniciales de la columela generalmente se dividen solo de forma anticlinal y su progenie experimenta una rápida expansión celular y luego se diferencia, produciendo plástidos que contienen almidón en su interior (amiloplastos) y juegan un papel fundamental en la percepción de la gravedad. Los otros tres tipos de células iniciales generalmente experimentan divisiones tanto anticlinales como periclinales, lo que da como resultado linajes celulares que adquieren diferentes identidades (Dolan y col., 1993).

1.3.2.4 La arquitectura radicular en estrés salino

Las raíces sirven como la interfaz principal entre la planta y varios factores bióticos y abióticos en el entorno del suelo: al detectar y responder a las señales ambientales, las raíces permiten que las plantas superen los desafíos que plantea su estado sésil (Smith y Smet, 2012). Es por

esto que la arquitectura radicular es considerada un rasgo altamente plástico, lo que significa que plantas genótipicamente idénticas pueden diferir mucho en su arquitectura radicular, dependiendo de su macro y microambiente (Osmont y col., 2007).

El desplazamiento de la punta de la raíz a través del suelo genera el encuentro constante con diferentes condiciones ambientales, bióticas y abióticas, que requieren la regulación de mecanismos de aclimatación apropiados a cada contexto. Algunas de estas condiciones abióticas pueden ser el contenido de nitrógeno (Gifford y col., 2008), la alta salinidad (Dinneny y col., 2008), el bajo pH (Iyer-Pascuzzi y col., 2011) y las condiciones de privación de nutrientes, como un bajo contenido de hierro o de azufre (Dinneny y col., 2008; Iyer-Pascuzzi y col., 2011). Cada condición ambiental dirige una respuesta a un conjunto distinto de capas de tejido en la raíz y regula los cambios en los estados transcripcionales que afectan el crecimiento y la fisiología del sistema radicular (Dinneny y col., 2008; Iyer-Pascuzzi y col., 2011).

Particularmente, el suelo salino es un problema agronómico importante, ya que tiene dos efectos fisiológicos principales en las plantas: (1) disminuye el potencial hídrico, lo que dificulta la absorción de agua del suelo, y (2) altera la homeostasis de los iones celulares, lo que da como resultado una inhibición de varios procesos metabólicos (Hasegawa y col., 2000). Como consecuencia, se reduce el crecimiento de las plantas, lo que conduce a una disminución del rendimiento de los cultivos. Se ha demostrado que el deterioro del crecimiento de las raíces causado por condiciones de estrés osmótico se asocia con una actividad de división celular reducida (Sacks y col., 1997, Samarajeewa y col., 1999). Esto implica un papel importante de la actividad meristemática en la respuesta del crecimiento a estas condiciones de estrés. La respuesta al estrés salino implica la inhibición de la producción celular mediante la inhibición de la progresión del ciclo celular y la reducción del tamaño del meristema.

El cloruro de sodio (NaCl) provoca cambios rápidos y dinámicos en la expresión génica, que se superponen con las respuestas a la hormona ácido abscísico (ABA) (Zhu y col., 2002). Esta hormona tiene una función tejido-específica en la regulación del crecimiento de la raíz, y, a través de ella, la sal controla la arquitectura del sistema radicular en la plántula (Figura 11). Esta regulación que ejerce ABA sobre el crecimiento del sistema radicular en condiciones de estrés salino es diferente entre la RP y las RL, ya que muestran dinámicas temporales diferentes. Esto se debe a que la señalización de ABA es específica de RL, siendo la endodermis la capa de tejido clave requerida para la represión del crecimiento de las RL mediada por esta hormona vegetal en el estrés salino (Ding y De Smet., 2013).

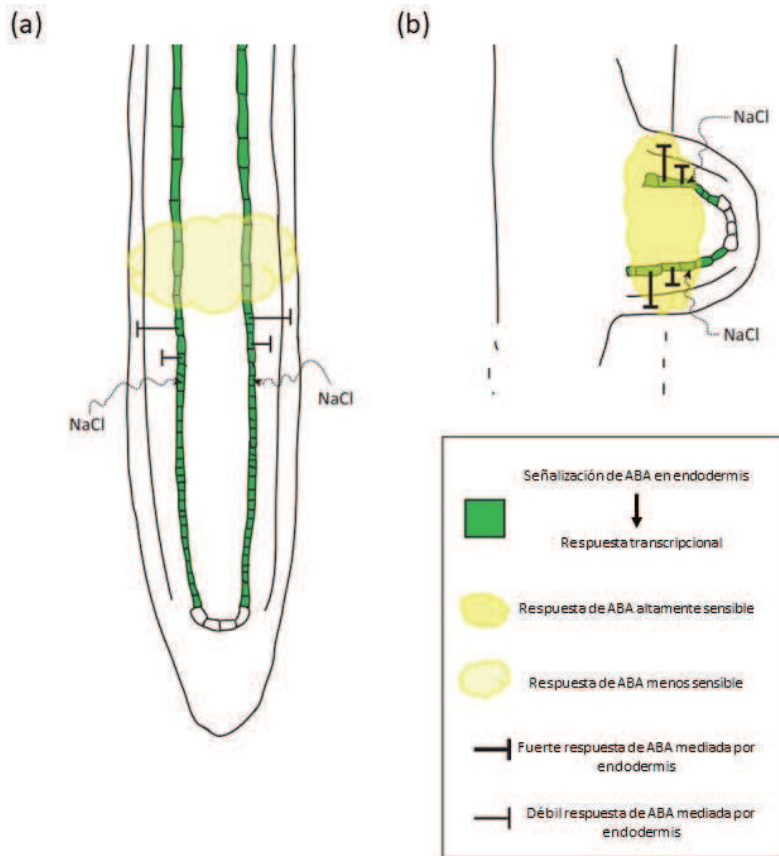


Figura 11. Regulación de la arquitectura del sistema radicular por NaCl a través de la respuesta del ABA sobre la endodermis. Figura adaptada de Ding y De Smet., 2013.

1.3.2.5 La función de los amiloplastos en raíces

Las plantas pueden reorientar su dirección de crecimiento en respuesta a diversas señales ambientales. La gravedad es una de las señales más importantes, los tallos y las raíces de las plantas crecen hacia arriba (gravitropismo negativo) y hacia abajo (gravitropismo positivo), respectivamente. La respuesta gravitrópica se da a través de cuatro pasos: primero, la detección la dirección de la gravedad; segundo, la conversión de una señal biofísica a una bioquímica (transducción de señales); tercero, la transmisión de la señal a los tejidos que responden; y cuarto, la flexión de los órganos (Tasaka y col., 1999).

Los candidatos obvios para funcionar como sensores de gravedad intracelular en plantas son los amiloplastos, plástidos grandes y densos llenos de almidón, que están presentes en muchas células vegetales. Estos amiloplastos tienen una densidad lo suficientemente alta en relación con el citosol para sedimentar fácilmente en el fondo de la célula (Taiz y Zeiger, 2010).

Los amiloplastos que funcionan como sensores de gravedad se denominan estatolitos, y las células especializadas en las que se encuentran se denominan estatocitos (Taiz y Zeiger, 2010).

En el caso del sistema radicular, estas células se ubican en la columela, o cubierta de la raíz, y, por lo tanto, ésta es la responsable de la detección de la gravedad (Tsugeki y col., 1998).

Los amiloplastos son los únicos orgánulos que sedimentan en las células de la columela de diferentes especies de plantas, y la tasa de sedimentación se correlaciona estrechamente con el tiempo requerido para percibir el estímulo gravitatorio. Las respuestas gravitrópicas de los mutantes deficientes en almidón son generalmente mucho más lentas que las de las plantas de tipo salvaje. Sin embargo, las mutantes sin almidón exhiben algo de gravitropismo. Por ejemplo, se ha visto que una mutante en la enzima fosfoglucomutasa (PGM) de *Arabidopsis* (*pgm*), que no puede sintetizar almidón, exhibe una respuesta gravitrópica aunque reducida tanto en raíces como en tallos (Kiss y col., 1989, Weise y Kiss 1999). Si bien en los estatocitos de esta mutante los amiloplastos no sedimentan en la dirección de la gravedad, las respuestas residuales sugieren que puede haber un mecanismo de detección alternativo que no involucre estatolitos. Esto permitiría pensar que, aunque se requiere almidón para una respuesta gravitrópica normal, también pueden existir mecanismos de percepción de la gravedad independientes del almidón. Otros orgánulos, como los núcleos, podrían ser lo suficientemente densos para actuar como estatolitos (Taiz y Zeiger, 2010). Además, se han descrito ensayos de gravitropismo que sugieren que se puede generar una señal gravitrópica fuera de la cubierta de la raíz, aunque ésta contribuiría menos que las señales generadas dentro de la cubierta de la misma (Morita y Tasaka, 2004).

Debido a que la cubierta de la raíz (sitio de percepción de la gravedad) está a cierta distancia de la zona de elongación donde se produce la flexión (respuesta final), se necesita de un mensajero químico que esté involucrado en la comunicación entre la cubierta de la raíz y la zona de elongación. Se ha visto que las mutantes de *Arabidopsis* deficientes en ABA tienen un gravitropismo radicular normal, mientras que las raíces de mutantes defectuosas en el transporte de auxinas, como *aux1* y *agr1*, son agravitrópicas (Morita y Tasaka, 2004). La mutante *agr* carece de un transportador de salida de auxinas relacionado con las proteínas PIN (Chen y col. 2004; Müller y col. 1998; Utsuno y col. 1998). Es así que las auxinas son consideradas como la hormona mensajera que viaja desde los estatocitos hasta la zona de elongación de la raíz (Morita y Tasaka, 2004).

Luego de la percepción de la gravedad, los transportadores de auxinas PIN3 y PIN7 se reubican en el lado inferior de las células de la columela y median la redistribución de las auxinas. Las auxinas generadas en el ápice se transportan desde la estela hasta la punta de la raíz a través de las células del protofloema. El transportador de auxinas AUX1, asimétricamente localizado

en las células del parénquima del protofloema, dirige el transporte acropétalo de auxinas desde el floema a un grupo de células en la columela. Luego, las auxinas se transportan radialmente a las células laterales de la cubierta de la raíz, donde también se expresa fuertemente *AUX1* (Taiz y Zeiger, 2010) (Figura 12).

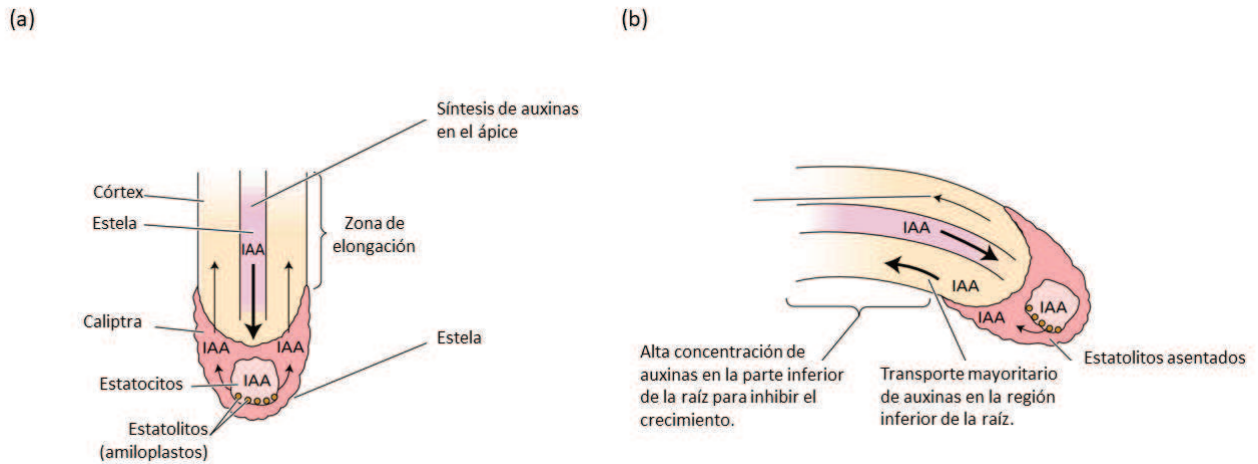


Figura 12. Representación de la respuesta gravitropica mediada por auxinas. Raíz principal en orientación vertical (a) y en orientación horizontal (estímulo gravitropico, b). Figura adaptada de Taiz y Zeiger, 2010.

Además de la importancia de esta hormona como mensajero químico, las auxinas regulan la formación de gránulos de almidón a través del par TIR1-AXR3, que regula los genes que codifican enzimas claves de la vía de síntesis de gránulos de almidón como PGM, ADG1 y SS4 (Zhang y col., 2019).

1.3.2.6 Los amiloplastos y el estrés

Como se describió más arriba, la salinidad afecta la arquitectura radicular. Para evitar el daño causado por este tipo de estrés, las plantas utilizan diferentes estrategias en todos los niveles de organización, desde los niveles celular, bioquímico y molecular hasta los niveles anatómico, morfológico y fenológico. A nivel celular y molecular, las plantas mantienen niveles bajos de Na^+ citosólico mediante la regulación de la compartimentación y la entrada y salida de iones (Zhu, 2002, 2003). Se ha descubierto la vía de señalización SOS (del inglés *Salt overly sensitive*), la vía del mecanismo regulador de señalización específica de iones más conocida que controla la salida de Na^+ y la adquisición de K^+ (Zhu, 2002, 2003; Chinnusamy y col., 2005).

La vía SOS también puede desempeñar un papel en las respuestas de órganos y tejidos al estrés salino, incluida la exclusión de iones de Na^+ de los meristemas y de las hojas de las plantas estresadas. Las raíces de *Arabidopsis* exhiben un gravitropismo reducido en estrés salino, creciendo contra el vector de gravedad, posiblemente como un mecanismo adaptativo importante a través del cual regulan su arquitectura para evitar daños por niveles elevados de sal (Sun y col., 2008). La mutación de los genes de la vía SOS también conduce a una reducción de la degradación de amiloplastos en las células de la columela y causa defectos en la expresión del gen *PIN2* en respuesta al estrés salino. Estas evidencias indican que la vía SOS puede mediar la disminución de *PIN2* en la respuesta gravitropica inducida por sal en las raíces de *Arabidopsis* (Sun y col., 2008).

Por lo tanto, la literatura indica que las raíces responden a la salinidad generando un cambio en la dirección del crecimiento de una manera que representa un compromiso adaptativo entre la estimulación gravitropica y salina (Sun y col., 2008).

1.4 Adaptación y plasticidad vegetal frente a estrés

1.4.1 Estrés y tipos de respuestas en organismos vegetales: Adaptación y aclimatación

Se define estrés como un factor ambiental que reduce la tasa de algún proceso fisiológico (por ejemplo, el crecimiento o la fotosíntesis) por debajo de la tasa máxima que la planta podría soportar. Los estreses pueden ser generados por procesos abióticos y/o bióticos, como por ejemplo la baja disponibilidad de nitrógeno, la presencia metales pesados, la alta salinidad y la sombra de las plantas vecinas. La consecuencia del estrés es generalmente una reducción del rendimiento en biomasa o semillas (Lambers y col., 2008).

Las plantas compensan los efectos perjudiciales del estrés a través de muchos mecanismos que operan en diferentes escalas de tiempo, según la naturaleza del estrés y los procesos fisiológicos que se ven afectados. Juntas, estas respuestas compensatorias permiten que la planta mantenga una tasa relativamente constante de procesos fisiológicos a pesar de la ocurrencia de estrés que reduce el rendimiento. Si una planta va a tener éxito en un ambiente estresante, debe haber algún grado de tolerancia al estrés. Los mecanismos de estas respuestas difieren ampliamente entre especies e incluyen la capacidad de evitarlo. Por ejemplo, hay especies de raíces profundas que crecen en áreas de poca lluvia, y otras mediterráneas que hacen frente a la falta de agua manteniendo un bajo contenido de agua en

las hojas. Los procesos fisiológicos más significativos a considerar son el crecimiento y la reproducción, que derivan en la supervivencia diferencial y la reproducción en un entorno competitivo. Existen tres escalas de tiempo distintas de respuesta de la planta al estrés:

1. La respuesta al estrés es el efecto perjudicial inmediato sobre un proceso de la planta. Esto generalmente ocurre en una escala de tiempo de segundos a días.

2. La aclimatación es el ajuste morfológico y fisiológico de las plantas individuales que sigue a la respuesta inicial. Ocurre en respuesta a la condición ambiental a través de cambios en la actividad o síntesis de nuevos constituyentes bioquímicos como enzimas, generalmente asociados con la producción de tejido nuevo. La aclimatación al estrés siempre ocurre durante la vida de la planta, generalmente en días o semanas.

3. La adaptación es la respuesta evolutiva resultante de los cambios genéticos en las poblaciones que compensan la disminución del rendimiento causada por el estrés. Los mecanismos fisiológicos de respuesta a menudo son similares a los de aclimatación, porque ambos requieren cambios en la actividad o síntesis de constituyentes bioquímicos y provocan cambios en las tasas de los procesos fisiológicos individuales, la tasa de crecimiento y la morfología. De hecho, la adaptación puede alterar el potencial de las plantas para aclimatarse a la variación ambiental a corto plazo. A diferencia de la aclimatación, la adaptación de una planta frente a una situación de estrés requiere cambios genéticos en las poblaciones y, por lo tanto, generalmente requiere que pasen muchas generaciones (Lambers y col., 2008).

1.4.2 Plasticidad: característica del desarrollo vegetal

Como organismos sésiles, las plantas no pueden buscar las condiciones ambientales óptimas para su crecimiento y desarrollo, sino que deben completar sus ciclos de vida en el entorno en el que crecen. Además, es probable que el entorno cambie dinámicamente durante su vida. Dadas estas limitaciones, una de sus principales características es su plasticidad. Un determinado genotipo puede dar lugar a una amplia gama de fenotipos diferentes, dependiendo de las condiciones ambientales predominantes (Bradshaw, 1965; Sultan, 2000). De esta manera, la morfología final de la planta depende del entorno en que ésta crece y se desarrolla (De Jong y Leyser 2012).

La plasticidad fenotípica, la capacidad de los genotipos para expresar diferentes fenotipos en respuesta al medio ambiente, se considera como uno de los mecanismos claves por los cuales

las plantas pueden hacer frente al constante cambio climático (Hoffmann y Sgrò, 2011; Jump y Peñuelas, 2005) y otros impulsores del cambio global (Matesanz y col., 2010).

1.4.3 Plasticidad en tejidos sumideros

En la figura 13 se muestra una representación esquemática del impacto de algunos tipos de estrés abiótico como la disponibilidad de agua, la sal, la sequía, la luz, el nitrato y el fosfato en el desarrollo de las raíces laterales de plantas dicotiledóneas, a modo de ejemplo de la plasticidad en el desarrollo del sistema radicular.

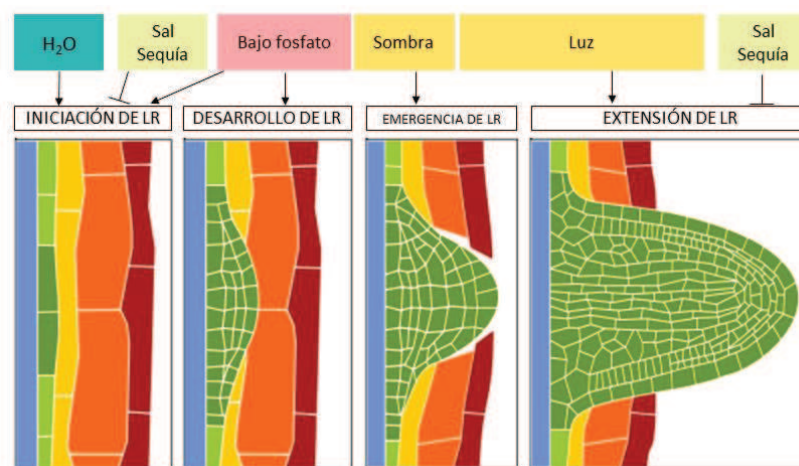


Figura 13. Esquema de la influencia de diferentes factores de estrés abiótico sobre la arquitectura radicular. Figura adaptada de Santos Teixeira y ten Tusscher, 2019.

La sequía y la sal son algunos de los estreses abióticos más extendidos para las plantas. Además del déficit de agua y nutrientes, la salinidad del suelo también genera estrés por toxicidad por iones, y su acumulación conduce a ciclos celulares obstaculizados y efectos citotóxicos (West y col., 2004). En las raíces, la señalización de ABA junto con la de auxinas median cambios en la arquitectura, la morfología y la anatomía de las raíces para minimizar la pérdida y maximizar la absorción de agua (Korver y col., 2018; Lamers y col., 2020; Li y col., 2021).

En el otro extremo de la planta, las semillas también exhiben esta plasticidad vegetal en diversos aspectos asociados a ellas, como almacenamiento de compuestos de reserva, germinación, tolerancia a la desecación, longevidad y dormancia (Leprince y col., 2017).

Un claro ejemplo de un carácter de las semillas altamente plástico es la germinación. Debido al cambio climático, la regulación temporal de la germinación de las semillas es importante y puede ser crucial para que la planta encuentre una ventana ambiental para evitar exponerse a condiciones estresantes que conducirán a su muerte por no lograr adaptarse a esas

condiciones de crecimiento. El evento extraordinario en la historia de vida de las plantas con semillas fue la evolución de la latencia, o dormancia, de las semillas (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006, Baskin y Baskin., 2004, Arc y col., 2013, Simons, 2009). La dormancia de las semillas amplía su éxito de la germinación en diferentes ambientes (Simons 2009).

Las condiciones ambientales a las que están expuestas las plantas durante la maduración de las semillas, generalmente denominadas efecto ambiental parental o materno, afectan el nivel de dormancia y el tiempo de germinación (Biere, 1991, Lacey y col., 1997, Vange y col., 2004, Daws y col., 2006). Las temperaturas más bajas que actúan sobre la planta madre tienden a aumentar la profundidad de la dormancia (Fenner, 1991, Huang y col., 2014, Springthorpe y Penfield, 2015). Otros factores ambientales experimentados durante la maduración como el estrés hídrico (Peters, 1982) o la disponibilidad de nutrientes, en particular nitrato, también afectan la dormancia (Huang y col., 2014, Alboresi y col., 2005, Matakiaadis y col., 2009).

1.5 La regulación de la expresión génica en plantas

Como se mencionó, al ser organismos sésiles, las plantas no pueden buscar las condiciones ambientales óptimas para su crecimiento y desarrollo, sino que deben completar sus ciclos de vida en el entorno en el que crecen. Es por esto que la plasticidad y capacidad de percibir señales del medioambiente les ha permitido ajustar su patrón de crecimiento y desarrollo en función de las condiciones en que se encuentran (De Jong y Leyser, 2012). De esta manera, un mismo genotipo puede dar lugar a diferentes fenotipos, generando cascadas de señalización específicas en cada caso. Éstas se encuentran finamente reguladas, ya que de ellas dependerá la respuesta frente al entorno de crecimiento, permitiendo así su supervivencia.

La regulación de la expresión génica en plantas se da a distintos niveles: transcripcional, post-transcripcional, el post-traducciona l y epigenético. El control a nivel transcripcional es uno de los mecanismos principales (Riechmann, 2002). Se ha demostrado que los cambios en la expresión génica son la base de la respuesta a las señales y tensiones ambientales (como la luz, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes), la respuesta de defensa contra los patógenos, la regulación de las vías metabólicas, de la fotosíntesis o el establecimiento de relaciones simbióticas, entre otras (Riechmann, 2002). En este proceso tienen un papel fundamental las proteínas denominadas Factores de Transcripción (FT).

1.6 Factores de transcripción de plantas

Los FT son proteínas que regulan el primer paso de la expresión génica. Generalmente contienen un dominio de unión al ADN (BD por *Binding domain*) que reconoce secuencias cortas específicas de ADN, conocidas como elementos en *cis* y ubicadas en las regiones regulatorias de los genes, y otro de interacción proteína-proteína que media, directa o indirectamente, la activación o represión de la transcripción, pudiendo actuar mediante la formación de homo- o hetero-oligómeros. Pueden interactuar también de forma directa con proteínas de la maquinaria de transcripción basal, coactivadores o complejos modificadores de la cromatina (Bornberg-Bauer y col., 2005, Morton y col., 2014).

En plantas, los FT son especialmente abundantes representando aproximadamente el 5 % de los genomas de *Arabidopsis* y arroz (Mitsuda y Ohme-Takagi, 2009). El análisis del genoma de *Arabidopsis* indica que codifica al menos 1572 FT (*Arabidopsis Genome Initiative*, 2000, Riechmann y col., 2000). Estos se clasifican en familias principalmente según sus dominios de unión al ADN, y éstas a su vez en diferentes subfamilias según la presencia de otros dominios conservados, rasgos estructurales, su función, los procesos biológicos en los que están involucrados y las vías de transducción de señales en las cuales participan (Riechmann y col., 2002).

1.7 Factores de transcripción de la familia homeodominio-cierre de leucinas

Una de las principales familias de FT de plantas se conoce como Homeodominio (HD), caracterizada por contener un dominio de unión al ADN al cual deben su nombre, extendido en todos los organismos eucariotas y codificado por una secuencia de ADN de 183 pb conocida como caja homeótica (en inglés *HomeoBox* o HB). Los genes homeóticos, identificados por primera vez en *Drosophila melanogaster*, recibieron su nombre por el efecto homeótico, una reorganización del desarrollo causada por la mutación o la expresión ectópica de estos genes. (Garberl y col., 1983). Se han descubierto genes con cajas homeóticas en invertebrados, vertebrados, hongos y plantas y en todos los casos estaban relacionados con procesos de desarrollo (Viola y González, 2016). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en animales, una mutación puntual o expresión ectópica de estos genes de plantas, estudiados hasta el momento, no generan un efecto homeótico (Ariel y col., 2007). El HD que caracteriza a los FT de esta familia está formado por 60 aminoácidos, y se pliega en una estructura formando tres hélices alfa. La segunda y la tercera forman un motivo hélice-giro-hélice con un brazo amino

terminal flexible (Mukherjee y col., 2009). La elevada conservación de este dominio proteico entre diferentes reinos indica que la estructura terciaria descrita es crucial para mantener su funcionalidad (Moens y Selleri, 2006).

Las proteínas con HD de las diferentes especies de plantas se han clasificado en diferentes familias y subfamilias según características como la similitud de secuencia dentro del HD, presencia de otros dominios conservados, tamaño de la proteína y la ubicación del HD en la molécula. De acuerdo a esa clasificación las familias son: PHD finger, ZD-HD, WOX, la superfamilia TALE (que incluye las familias BELL y KNOX), DDT, NDX, LD, PINTOX, SAWADEE, y la superfamilia HD-Zip compuesta por cuatro subfamilias denominadas I, II, III y IV (Viola y González, 2016).

Los miembros de la familia HD-Zip se caracterizan por la presencia de un dominio de cierre de leucinas (LZ, por *leucine zipper* en inglés), ubicado inmediatamente aguas abajo del HD. El LZ se pliega en una estructura tridimensional que le permite la formación de homodímeros u heterodímeros a través de interacciones hidrofóbicas entre ambos péptidos (Landschulz y col., 1988, Sessa y col., 1993). Si bien se pueden encontrar HDs y LZs en FT de otros reinos eucariotas, su combinación en una sola proteína es exclusiva de las plantas (Schena y Davis, 1992). Mientras que el HD es responsable del reconocimiento y la unión específica de ADN, el LZ actúa como un motivo de dimerización. La eliminación del LZ anula absolutamente la capacidad de unión de estos FT, lo que indica que la orientación relativa de los monómeros, impulsada por la dimerización, es crucial para el eficiente reconocimiento de las secuencias de ADN (Tron y col., 2004). Las proteínas HD-Zip se clasifican en cuatro subfamilias en función de cuatro características distintivas: 1) conservación de la secuencia del dominio HD-Zip que determina las especificidades de unión al ADN; 2) los motivos conservados adicionales fuera del dominio HD-Zip; y 3) las vías en las que participan (Capella y col., 2016).

1.8 Factores de transcripción HD-Zip I

En *Arabidopsis*, la subfamilia I de proteínas HD-Zip está compuesta por 17 miembros denominados (*Arabidopsis thaliana HomeoBox*) AtHB1/HAT5, AtHB3/HAT7, AtHB5, AtHB6, AtHB7, AtHB12, AtHB13, AtHB16, AtHB20-AtHB23, AtHB40, AtHB51-AtHB54 (Ariel y col., 2007). Las proteínas codificadas tienen un tamaño de aproximadamente 35 kDa y tienen un HD altamente conservado y un LZ menos conservado (Chan y col., 1998). Se han identificado recientemente otros motivos conservados localizados en las regiones amino y carboxilo terminales con respecto al dominio HD-Zip, aunque a la mayoría de estos motivos no se les ha

asignado una función aún (Arce y col., 2011). Sin embargo, uno de estos motivos, ubicado en la región C-terminal se caracterizó como un motivo de transactivación que contiene residuos aromáticos. Este tipo de motivos, denominados AHA, caracterizado en otros FT, forma una hélice anfipática que está cargada negativamente y es capaz de interactuar con los componentes de la maquinaria de transcripción basal (Figura 14a, Döring y col., 2000).

Las proteínas codificadas por los genes HD-Zip I forman dímeros que reconocen la secuencia pseudopalindrómica CAAT(A/T)ATTG. La afinidad del HD por su secuencia blanco de ADN, pero no su especificidad, se ve afectada por los aminoácidos del brazo N-terminal del HD (Palena y col., 2001).

Los 17 miembros de Arabidopsis se han clasificado inicialmente en seis grupos (llamados α a ϕ) según las relaciones filogenéticas y los patrones de intrones/exones (Henriksson y col., 2005). Más tarde, una nueva reconstrucción filogenética, tomando proteínas de la subfamilia HD-Zip I de diferentes especies, clasificó a estos FT en seis grupos (nombrados I a VI). Este árbol consideró la presencia y distribución de motivos conservados no caracterizados en la región C-terminal (Figura 14b, Arce y col., 2011).

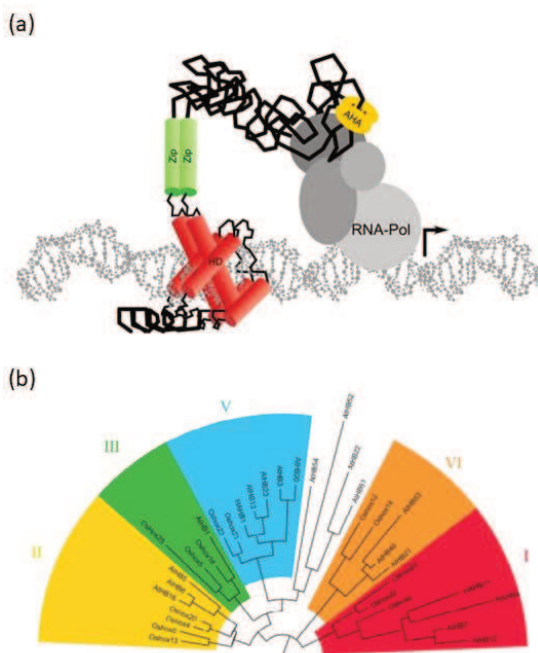


Figura 14. (a) Representación esquemática de la estructura de los FT HD-Zip I. (b) Árbol filogenético de los FT HD-Zip I de *Arabidopsis thaliana*, *Oriza sativa* y *Helianthus annuus*. (a) Las proteínas HD-Zip I reconocen el ADN por la tercera hélice (roja), formando homo o heterodímeros a través del dominio LZ o Zip (verde). La transcripción de los targets se activa por la interacción del motivo AHA (amarillo) con la maquinaria de transcripción basal (gris). (b) El árbol se construyó usando la secuencia aminoacídica completa de cada una de las proteínas mostradas. Se señalan los distintos grupos determinados por Arce y col., 2011. Figura modificada de Ribone y col., 2016.

La expresión de estos genes está regulada por factores externos como sequía, temperaturas extremas, estrés osmótico y condiciones de iluminación, y es específica de diferentes tejidos y órganos de la planta. Sus papeles como FT están relacionados con eventos de desarrollo en respuesta a condiciones ambientales, particularmente aquellas que generan estrés abiótico

(Ariel y col., 2007), aunque estudios más recientes demostraron que están involucrados en el desarrollo vegetal en condiciones normales o frente a estrés biótico (Himmelbach y col., 2002, Olsson y col., 2004, Harris y col., 2011).

Dentro de esta familia existen grupos de genes parálogos, es decir, que presentan un alto nivel de identidad en su secuencia proteica indicando una separación evolutiva reciente, a los cuales se les han asociado patrones de expresión y funciones redundantes, o no, dependiendo del tejido u órgano y condición de desarrollo. Por ejemplo, *ATHB7* y *ATHB12*, codificados por genes parálogos, comparten un 80 % de identidad en la secuencia de aminoácidos del dominio HD-Zip. Ambos genes están regulados por sequía de una manera ABA-dependiente. La expresión de *ATHB12* es detectable en primordios de RL, hojas jóvenes y tallos de inflorescencias, mientras que la de *ATHB7* no lo es, al menos en condiciones normales de crecimiento. Sin embargo, cuando se aplica ABA de forma exógena, sus patrones de expresión se superponen (Ré y col., 2014).

Otros miembros de la familia que participan del desarrollo normal de *Arabidopsis* son *AtHB13* y *AtHB23*. Estos FT, parálogos entre sí, presentan funciones diferentes. *AtHB13* participa del proceso de hidratación del polen induciendo la expresión de las proteínas críticas de la capa del polen (Ribone y col., 2015), mientras que *AtHB23* es un regulador clave del desarrollo de RL (Perotti y col., 2019) y de la RP frente a estrés salino (Perotti y col., 2022). Además, ambos regulan negativamente la elongación del tallo de la inflorescencia mediante el control de la proliferación celular (Ribone y col., 2015). Otro ejemplo es *AtHB1*; la caracterización de plantas de tabaco transformadas con una construcción que sobreexpresa a *AtHB1* indicó que este FT es un regulador de las respuestas de luz (Aoyama y col., 1995) y desarrollo de la hoja (Miguel y col., 2020).

1.9 Función de los factores de transcripción HD-Zip I en raíces de *Arabidopsis*

Los estudios funcionales de los FT HD-Zip I en raíces son escasos, sin embargo, durante los últimos años varios artículos han revelado funciones claves de estos FT en el desarrollo de las raíces de *Arabidopsis* (Figura 15).

Un ejemplo es el de *AtHB16*. Estudios previos han mostrado expresión del gen *AtHB6* en la zona de división celular de la raíz, incluido el meristema, en plántulas de un día, y en la zona de división celular de la RP y en los primeros primordios de RL en plántulas de tres días de edad. En plántulas más grandes, de 16 días, se vio expresión de este gen en las células en división de

las raíces, tanto primarias como secundarias. Este patrón de expresión de *ATHB6* en RP y RL es consistente con una función de *ATHB6* relacionada con la división o diferenciación celular (Söderman y col., 1999).

Para el caso del par de genes parálogos *AtHB12/AtHB7*, estudios han demostrado que, en condiciones normales de desarrollo, *AtHB12* se expresa en etapas tempranas de crecimiento, mientras que *AtHB7* fue detectado en etapas de crecimiento más avanzadas. Plantas que sobreexpresan *AtHB12* mostraron raíces primarias más largas que las plantas salvajes, mientras que las plantas sobreexpresantes de *AtHB7* mostraron el fenotipo opuesto (Ré y col., 2014). Notablemente, las plantas dobles mutantes *athb12/athb7* también presentan raíces principales más cortas (Ré y col., 2014). La expresión de ambos genes se induce por estrés abiótico, como estrés osmótico y déficit de agua, y también por la hormona ABA (Ré y col., 2014). En el trabajo de Liu y colaboradores (2020) se ha demostrado que estos genes presentan un rol frente a estrés por aluminio, observándose inducción de ambos en la zona de transición de la RP frente a la toxicidad por este metal. También se vio que *AtHB7* y *AtHB12* regulan antagónicamente el alargamiento de la raíz bajo estrés por aluminio, observándose que *AtHB12* regula de forma negativa la resistencia al aluminio, mientras que *AtHB7* lo hace de forma positiva (Liu y col., 2020).

Otro FT de la familia HD-Zip involucrado en el desarrollo de las raíces es *AtHB13*. Este FT se expresa durante la transición de semilla a plántula. Mutantes *athb13* mostraron una mayor longitud de la RP en comparación con las plántulas de tipo salvaje Col-0, lo que sugiere que este FT es un regulador negativo del crecimiento temprano de la raíz, posiblemente reprimiendo la división celular y/o la elongación celular o la duración del tiempo en que las células se alargan (Silva y col., 2016).

Otro miembro estudiado en raíces es *AtHB52*. Este FT regula la expresión de genes relacionados con el transporte de auxinas, incluidos *PIN2*, *WAG1* y *WAG2* al unirse a sus regiones promotoras. De esta manera, *AtHB52* media la inhibición de la elongación de la raíz por etileno mediante la regulación de la expresión de los transportadores de auxinas corriente debajo de EIN3, mecanismo en el que *AtHB52* actúa como un nodo importante entre la señalización de etileno y de auxinas durante el crecimiento y desarrollo de la planta (Miao y col., 2018).

Para el caso de *AtHB53*, se ha visto que se expresa en el meristema de las raíces de *Arabidopsis* y que juega un rol en la señalización de auxinas/citoquininas durante el desarrollo radicular (Son y col., 2004).

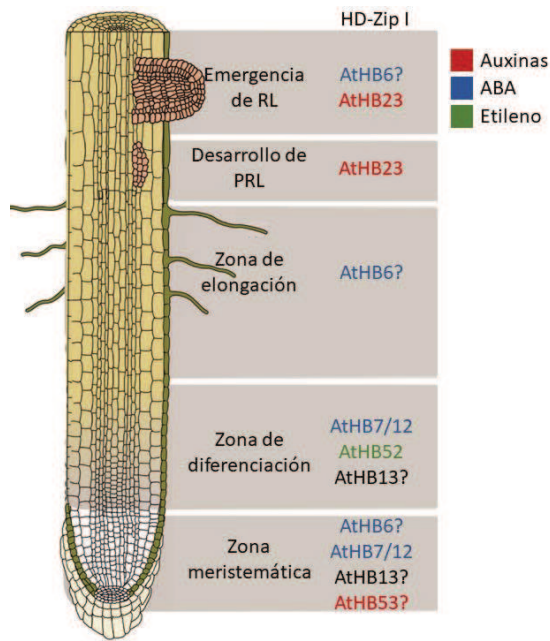


Figura 15. FT HD-Zip I tienen funciones específicas según su patrón de expresión en la raíz principal y las raíces laterales. Representación esquemática de la raíz principal, primordio de raíz lateral (PRL) y raíz lateral (RL), indicando las diferentes zonas. La función de los genes HD-Zip de las cuatro clases, según la literatura, se indica a la derecha. Los genes regulados por hormonas se indican con diferentes colores: auxina (rojo), ABA (azul), etileno (verde), citoquinina (naranja). Los signos de interrogación denotan genes que actúan en la zona indicada. Tomado y adaptado de Perotti y col., 2021.

1.10 Función de los factores de transcripción HD-Zip I en flores y frutos de Arabidopsis

Si bien el desarrollo de flores y frutos de Arabidopsis está ampliamente estudiado, poco se sabe sobre el rol que tienen los FT de la familia HD-Zip I en estos órganos. Sólo unos pocos miembros han sido estudiados en flores y silicuas de Arabidopsis. Uno de ellos es AtHB51, conocido por su función en el establecimiento de la identidad del meristema apical. También conocido como LMI1 (por *Late Meristem Identity 1*, en inglés), se une a regiones proximales del promotor de CAL (*CAULIFLOWER*, FT que regula la identidad del meristema apical) regulándolo de forma directa. Además, las mutantes *lmi1* mejoran los defectos de identidad del meristema observados para el alelo *lfy-10*, corroborando el rol que AtHB51 tiene como regulador de la identidad del meristema apical (Saddic y col., 2006).

Por otro lado, se ha visto que el par *AtHB13/AtHB23* tienen funciones en el desarrollo de silicuas de Arabidopsis. Las mutantes *athb13* y dobles silenciadas *athb13/athb23* tienen silicuas más cortas, con menos semillas y óvulos sin fertilizar, en comparación con las plantas control Col-0. Las cruza recíprocas entre *athb13* y plantas Col-0 permitieron dilucidar un defecto específicamente en los granos de polen de las plantas mutantes *athb13*. Al evaluar éstos en profundidad, se vio que los granos de polen son incapaces de germinar en los estigmas. Mientras que las plantas silenciadas en *AtHB23* presentaron silicuas normales, las dobles silenciadas *athb13/athb23* fueron similares a las mutantes simples *athb13*. Tanto *AtHB13* como *AtHB23* pudieron rescatar el fenotipo de las silicuas, por lo que se deduce que, si

bien *AtHB23* no tiene normalmente un papel funcional en el desarrollo del polen y las silicuas, puede actuar como sustituto de *AtHB13* (Ribone y col., 2015).

El grupo de Khan y colaboradores (2015) usó microdissección laser combinada con la generación de perfiles transcriptómicos para dividir la semilla en diferentes regiones y subregiones, tanto maternas como propias de la semilla, para evaluar genes expresados diferencialmente en cada una de ellas. Este estudio permitió evaluar qué genes se expresan en cada una de las regiones de la semilla y el funículo, y cuáles se encuentran diferencialmente expresados. Entre ellos, se encuentra el gen *AtHB23* perteneciente a la familia HD-Zip I, mientras que no aparece su parólogo *AtHB13*. Además de ubicarse entre los genes expresados en semillas, *AtHB23* fue uno de los genes enriquecidos en el tejido del funículo, en comparación con el resto de los tejidos maternos (Khan y col., 2015). Esto podría indicar que *AtHB23* tendría funciones asociadas específicamente al desarrollo del funículo y la semilla.

1.11 Factores de transcripción de la familia MYB

Como se mencionó antes, los FT se pueden dividir en varias familias diferentes según la especificidad del dominio de unión al ADN, y existen varios tipos de FT relacionados con la tolerancia al estrés de las plantas, entre ellos los FT de la familia MYB. Esta familia se compone de un grupo de proteínas funcionalmente diverso que se encuentran tanto en plantas como en animales. La característica distintiva de la familia es la presencia de un dominio conservado repetido consecutivamente de aproximadamente 50 aminoácidos, que funciona como dominio de unión al ADN (Rosinski y Atchley, 1997).

Estos FT están ampliamente distribuidos en las plantas superiores, son los más abundantes y funcionales, y cumplen funciones en la respuesta de las plantas en la tolerancia al estrés. Los estudios funcionales han demostrado que los FT MYB están involucrados en el metabolismo secundario de las plantas (Uimari y Strommer, 1997) las respuestas hormonales y de factores ambientales, y juegan un papel regulador importante en la diferenciación celular, el ciclo celular y la morfogénesis de la hoja (Chen y col., 2003).

Un FT MYB completo consta de una estructura de tres partes: la región de unión a la estructura del ADN (BD) ubicada en la zona N-terminal y los dominios de activación transcripcional y regulación negativa (Thompson y Ramsay, 1995, Ogata y col., 1996). El BD es el más conservado y generalmente contiene de 1 a 3 repeticiones incompletas, llamadas R, representadas por R1, R2 y R3. Cada región repetida R consta de 51 a 52 aminoácidos conservados y secuencias espaciadoras, cada una de las cuales contiene aproximadamente un residuo de triptófano u otros grupos hidrofóbicos, que forman una estructura de tipo hélice-giro-hélice. Según la cantidad de dominios MYB, esta familia de FT se puede dividir en cuatro clases, 1R, R2R3, 3R y 4R (Figura 16; Martin, 1997). Las proteínas de tipo R2R3 son las más abundantes de plantas, con más de 100 miembros en los genomas de dicotiledóneas y monocotiledóneas.

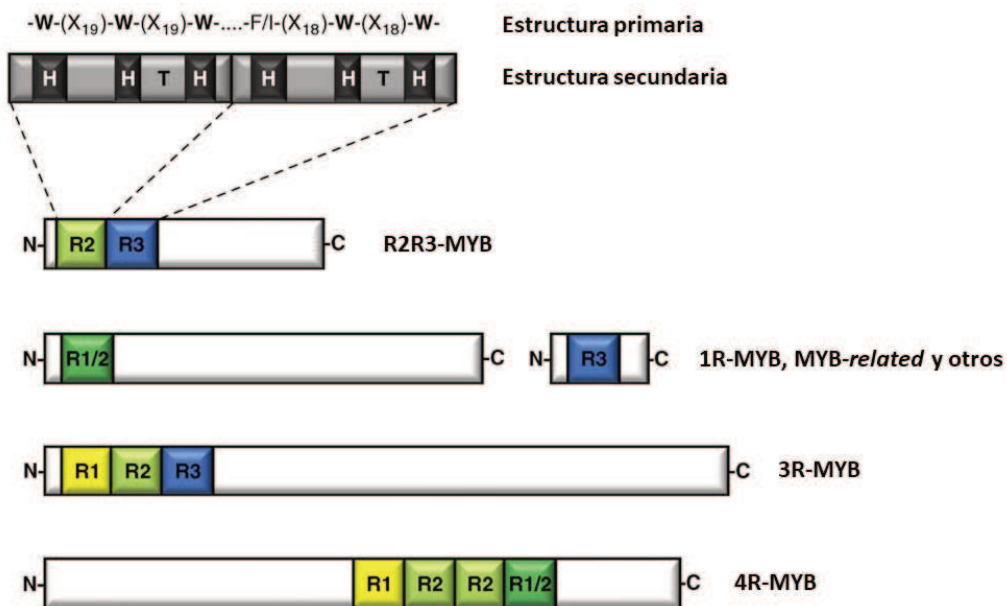


Figura 16. Clases de FT MYB en plantas. Ilustración con las diferentes clases de proteínas MYB de plantas, según el número de repeticiones de dominios MYB adyacentes (R). Se muestran las estructuras primaria y secundaria de un R2R3-MYB típico. Hélice (H), giro (T), triptófano (W), aminoácido (X). Adaptada de Jinlu y col., 2019.

Hay 196 genes MYB en *Arabidopsis thaliana* y 185 genes en arroz (Dubos y col., 2010). Una gran cantidad de genes MYB involucrados en el estrés abiótico pertenecen al grupo de tipo R2R3 y al grupo R1R2R3 (Zhang, 2009). Los estudios han demostrado que, bajo estrés, los FT MYB se unen a los elementos de unión en las regiones promotoras de muchos genes funcionales para activar la expresión de genes de respuesta a estrés.

La regulación de la tolerancia a la sal y la sequía de los FT MYB involucrados en la vía de señalización ABA tiene diferentes grados de intersección con otras vías de transducción de señales en las plantas. Cuando las plantas están sujetas a estrés salino, el contenido de ABA aumenta significativamente y la tolerancia a la sal de las plantas aumenta mediante la transducción de señales, la inducción de niveles transcripcionales y la regulación positiva de genes relacionados. AtMYB44 y AtMYB2 en *Arabidopsis thaliana* responden al estrés salino a nivel de ARNm, y la sobreexpresión de AtMYB44 y AtMYB2 aumenta la resistencia de las plantas al estrés salino (Yoo y col., 2005, Jung y col., 2007).

Como se mencionó, dentro de los tipos de FT tipo MYB, una de las clases comprende proteínas con una repetición MYB única o parcial (Figura 16). A este grupo de proteínas se las denomina colectivamente *MYB-related*, y se dividen en varias subclases. Dentro de ellas, existe una subfamilia conocida como MYB-CC, cuyos miembros contienen un dominio MYB de unión al ADN y un dominio conservado de tipo bobina enrollada (CC, por *Coiled coil* en inglés). Varios FT de esta subfamilia están involucrados en la adaptabilidad de la planta al estrés por falta de fósforo. Entre ellos, PHR1 y otros miembros de la subfamilia MYB-CC, como PHL1, PHL2, PHL3 y PHL4, son componentes cruciales del sistema central que controla y regula las respuestas transcripcionales de *Arabidopsis* a la inanición por fósforo (Bustos y col., 2010, Sun y col., 2016, Wang y col., 2018).

1.12 Factores de transcripción de la familia MYB en el desarrollo radicular

Dada la gran cantidad y diversidad de miembros de la familia MYB, numerosos estudios involucran diferentes FT miembros de esta superfamilia en una gran variedad de procesos del desarrollo vegetal, incluyendo diferentes aspectos del desarrollo del sistema radicular.

Algunos miembros de la familia MYB con funciones en raíces son AtMYB34, AtMYB51 y AtMYB122. Estos FT regulan la producción de glucosinolatos indólicos en raíces y hojas de roseta en etapas tardías (Gigolashvili y col., 2007).

En las raíces, AtMYB23 está regulado positivamente por AtMYB66 (también conocido como WEREWOLF) durante el desarrollo de la epidermis (Kang y col., 2009). Además, AtMYB23 es capaz de sustituir la función de AtMYB66. Se ha visto también que la proteína AtMYB23 se une a su propio promotor, sugiriendo su participación en un ciclo de retroalimentación positiva. La localización de los transcritos de AtMYB23 y de la proteína AtMYB23 fusionada a la proteína fluorescente verde (GFP), vincula la función de AtMYB23 con el tipo de célula del pelo radicular en desarrollo. Usando mutantes, se vio que AtMYB23 es necesario para el establecimiento

preciso del patrón epidérmico de la raíz, particularmente en condiciones que comprometen el proceso de especificación celular. Estos resultados sugieren que AtMYB23 participa en un ciclo de retroalimentación positiva para reforzar las decisiones sobre el destino de las células y garantizar un establecimiento sólido del patrón de tipo celular en la epidermis de la raíz de *Arabidopsis* (Kang y col., 2009).

Otro miembro, AtMYB77, regula la formación de raíces laterales al modular la expresión de genes inducibles por auxinas (Shin y col., 2007). En las plantas *knockout* para AtMYB77, se vio que algunos genes de respuesta a auxinas se encontraban reprimidos. La densidad de raíces laterales en estas mutantes es menor que en plantas control a bajas concentraciones de ácido indol-3-acético (IAA) y también en condiciones de privación de nutrientes. Una interacción genética sinérgica entre AtMYB77 y ARF7 resultó en una fuerte reducción en el número de raíces laterales, demostrando de esta manera cómo este FT MYB está involucrado en el control del crecimiento y desarrollo de las raíces laterales en condiciones ambientales cambiantes (Shin y col., 2007).

AtMYB72 es un regulador clave requerido en las raíces durante los primeros pasos de señalización de la resistencia sistémica inducida, mediada por bacterias y hongos beneficiosos (Van der Ent y col., 2008, Segarra y col., 2009).

AtMYB68 regula negativamente la deposición de lignina en raíces (Feng y col., 2004) y se expresa específicamente en las células del periciclo. Las raíces de mutantes *myb68* produjeron mayores niveles de biomasa y lignina en comparación con plantas control (ecotipo *Ler*). Se ha visto además que AtMYB68 es un regulador del crecimiento en condiciones desfavorables como, por ejemplo, altas temperaturas. Bajo regímenes de alta temperatura, la actividad del promotor de *AtMYB68* se induce en las raíces, mientras que el crecimiento vegetativo de las mutantes de *myb68* se reduce en comparación con el tipo salvaje. El homólogo de AtMYB68 más cercano, AtMYB84, tiene un patrón de expresión superpuesto en las células del periciclo, lo que sugiere que sus funciones podrían ser parcialmente redundantes (Dubos y col., 2010).

1.13 Factores de transcripción de la familia MYB en el desarrollo de frutos

Existen algunos estudios que involucran FT de la familia MYB en eventos relacionados al desarrollo del fruto.

La sobreexpresión del gen *AtMYB24* en *Arabidopsis thaliana* hace que la planta sea baja, los órganos florales estén poco desarrollados y el polen esté inactivo (El-Kereamy y col., 2012).

Se ha encontrado que varios FT MYB están involucrados en la regulación de las vías de síntesis de flavonoides de las plantas, que a su vez afecta la coloración de los órganos florales y frutos (Noda y col., 1994).

Algunos genes de la familia de genes MYB de la uva están implicados en la regulación de la diferenciación de los órganos florales. *VIMYBA1-3* regula la diferenciación sexual de los órganos florales. Se encontró que el FT estaba estrechamente relacionado con la coloración de los órganos florales o de la piel del fruto (Chiou y Yeh, 2008).

Otros estudios muestran el rol que tienen algunos miembros de esta familia en el desarrollo de silicuas y semillas, asociado a la vía de las auxinas. El FT *AtMYB51* (o *HIG1*) es miembro de la subclase de genes R2R3-MYB, con *AtMYB122* como el más cercano y *AtMYB34* como el siguiente homólogo. Las líneas que sobreexpresan *AtMYB34* en el fondo mutante *hig1-1* fueron incapaces de producir semillas. Este fenotipo, junto con otras evidencias, es claramente indicativo de altos niveles de IAA en las plantas. Por otro lado, la sobreexpresión ectópica de *AtMYB34* en el fondo de tipo salvaje genera un fenotipo similar de IAA alto. La mayoría de las flores de las plantas que sobreexpresan *AtMYB34* permanecieron cerradas hasta la senescencia o desarrollaron diminutas silicuas mal desarrolladas. Para el caso de *AtMYB122*, la sobreexpresión del mismo en el fondo mutante *hig1-1* no dio como resultado un fenotipo de crecimiento aberrante. Sin embargo, en el fondo de tipo salvaje (*Col-0*), varias líneas sobreexpresantes de *AtMYB122* mostraron un fenotipo de altos niveles de IAA, y esto fue menos pronunciado que en el caso de las líneas que sobreexpresan *AtMYB34*. Las plantas que sobreexpresan *AtMYB122* tuvieron un crecimiento retardado: la mayoría de las flores permanecieron sin desarrollarse y casi no pudieron producir silicuas sanas, aunque se pudieron recolectar algunas para propagar. Estos estudios dejan en claro el posible rol que tienen estos FT MYB en el desarrollo de semillas y silicuas (Gigolashvili y col., 2007).

1.14 Interacción de factores de transcripción con otras proteínas como forma de regulación del desarrollo vegetal

En el laboratorio donde se desarrolló este trabajo de Tesis se estudian los FT de la familia HD-Zip I utilizando diversas herramientas como líneas sobreexpresantes, líneas transformadas con los promotores de los genes de interés dirigiendo la expresión de genes reporteros (como *GUS* y *GFP*), líneas mutantes insercionales, líneas silenciadas transformadas con construcciones que dirigen microARNs hacia el gen en estudio, etc.

Las interacciones entre miembros de una misma familia de FT son comunes y se han estudiado durante décadas. Sin embargo, cada vez hay más informes sobre interacciones entre miembros de distintas familias en las plantas (*Arabidopsis Interactome Mapping Consortium*, 2011, Yazaki y col., 2016), también en levaduras (Yu y col., 2006) y sistemas animales (Rhee y col., 2014, Jolma y col., 2015). Estos han revelado que las interacciones entre familias de FT son abundantes y agregan otro nivel de complejidad a la maquinaria transcripcional de regulación génica. Además, se ha visto que los FT son capaces de interactuar con otras proteínas (no reguladoras) para cumplir su función. Tal es el caso del FT HaHB11, miembro divergente HD-Zip I de girasol. Este FT exhibe una similitud de secuencia con AtHB7 y AtHB12 de *Arabidopsis*. Los resultados indicaron que HaHB11 y AtHB7 pueden interactuar *in vivo* con la proteína de la familia de las kinesinas Kin13B tanto en levaduras como en hojas de plantas, y esta interacción específica es necesaria para la actividad de los FT HaHB11 y AtHB7 (Miguel y col., 2020b).

Por otro lado, un estudio ha mostrado que, de un total de 2331 interacciones entre FT identificadas, 1207 ocurrieron dentro de miembros de una misma familia, y hasta 1124 involucraron interacciones entre miembros de familias de FT diferentes. Esto destaca el hecho de que las interacciones entre FT de diferentes familias ocurren con frecuencia y deben considerarse a la hora de estudiar las redes de regulación del desarrollo de plantas (Bemer y col., 2017).

Considerando estas evidencias, se sumó la interrogante de cuáles podrían ser las proteínas con las que los FT de la familia HD-Zip I podrían estar interactuando *in planta* para cumplir la gran cantidad de funciones asociadas a cada uno de ellos en el desarrollo vegetal y en respuesta a diferentes tipos de estrés.

Para comenzar a responder esta pregunta, se realizaron ensayos de doble híbrido en levaduras (Y2H) con el objeto de identificar las proteínas putativas con las que AtHB23, miembro de la familia HD-Zip I y proteína de estudio del presente trabajo de Tesis, podría interactuar. El ensayo de Y2H permitió identificar cuatro FT pertenecientes a 2 familias diferentes: AtPHL1, AtMYB12 y AtMYB68, pertenecientes a la familia MYB, y AtWRKY43, perteneciente a la familia WRKY. Esto abre la posibilidad de estudiar interacciones entre FT de diferentes familias para entender de qué manera estas proteínas regulatorias ejercen su función en el desarrollo vegetal.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

*“La educación no es preparación para la vida,
la educación es la vida en sí misma.”*

John Dewey.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:

2.1 Hipótesis:

La hipótesis de trabajo es que los factores de transcripción de la familia HD-Zip regulan procesos del desarrollo fundamentales y para accionar necesitan interactuar con otras proteínas vegetales.

2.2 Objetivo general:

El objetivo principal del presente trabajo de Tesis es investigar las interacciones entre AtHB23, AtPHL1 y AtMYB68, así como la función de estas interacciones en diferentes procesos del desarrollo vegetal, y comprender cómo actúan estos FT en forma individual, conjunta o con otras proteínas para ejercer sus funciones.

2.3 Objetivos específicos:

En el laboratorio en el que se desarrolló el presente trabajo de Tesis ya se contaba con algunas de las herramientas necesarias para llevar a cabo este trabajo: los ADNc que codifican para AtHB23, AtMYB68 y AtPHL1, las plantas transgénicas sobreexpresantes y silenciadas en AtHB23, plantas mutantes insercionales en AtMYB68 y AtPHL1 y plantas que poseen los genes reporteros *GUS* y *GFP* bajo el control del promotor de *AtHB23*. Nos propusimos entonces los siguientes objetivos particulares:

- Generar construcciones que permitan realizar ensayos de BiFC (del inglés, *Bimolecular Fluorescence Complementation*) que permitan detectar interacciones proteicas en transformaciones transitorias en hojas de tabaco para visualizar por microscopía confocal.
- Obtener plantas homocigotas sobreexpresantes de los ADNc correspondientes como fusiones a una cola de histidinas (His-tag) con el objeto de poder inmunoprecipitarlas con un anticuerpo anti-His tag.
- Aislar y clonar como fusiones a proteínas fluorescentes las regiones promotoras de los genes *AtMYB68* y *AtPHL1*.

- Transformar plantas con estas construcciones para determinar el patrón de expresión detallado de estos genes y hacer lo mismo en paralelo con las plantas ya obtenidas que expresan los genes reporteros *GUS* y *GFP* bajo el control del promotor de *AtHB23* con el objeto de identificar en qué tejidos y estadios de desarrollo se coexpresan cada uno de los genes en estudio.
- Obtener plantas homocigotas silenciadas *amiR68* y mutantes *atph1* a partir de semillas heterocigotas obtenidas en el laboratorio y solicitadas al centro internacional ABRC, respectivamente.
- Caracterizar el fenotipo de las plantas *amiR68* y *atph1* en condiciones normales de crecimiento y sometiendo las plantas a distintos tipos de estrés ambiental y tratamientos hormonales.
- En el caso de detectar fenotipos diferenciales en alguna/s de las plantas mutantes, transformar con el gen correspondiente y observar si se revierte el fenotipo. Transformar asimismo con el gen que interactúa para evaluar si la interacción es fundamental para la diferenciación fenotípica.
- Identificar nuevos genes blancos mediante ensayos de CHIP-qPCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

*“Todo fracaso es condimento
que le da sabor al éxito.”*

Truman Capote.

3.1 Materiales:

3.1.1 Cepas bacterianas y de levaduras

En la tabla 1 se detallan los genotipos de las cepas bacterianas de *Agrobacterium tumefaciens* y *Escherichia coli*, y de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* empleadas para la realización de este trabajo de Tesis.

Tabla 1. Cepas bacterianas y de levaduras

Microorganismo	Cepa	Genotipo relevante	Referencia
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	LBA4404	Posee el plásmido Ti desarmado pAL4404, con resistencia a estreptomicina, que se obtiene al reemplazar la región del ADN-T del plásmido pTiAch5 de la cepa salvaje Ach5 por el plásmido pBR322. Presenta resistencia cromosomal a rifampicina.	Ooms y col., 1982
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	EHA105	Presenta resistencia cromosomal a rifampicina. Posee el plásmido Ti pEHA101 (pTiBo542DT-DNA) con resistencia a tetramicina.	
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	Posee una porción del gen <i>lacZ</i> (<i>lacZ</i> _M15) por lo cual presenta el sistema de selección de colonias blancas y azules disponible en ciertos plásmidos. Permite obtener ADN plasmídico de buena calidad y alto rendimiento (<i>endA1</i>). Provee mayor estabilidad al inserto presente en el plásmido con que se la transforme (<i>recA1</i>): <i>endA1 horasDR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 (Na1r) RelA1 ΔlacU169 (Φ80<i>lacZ</i>ΔM15).</i>	Hanahan, 1983
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PJ69-4A	<i>MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ</i>	James y col., 1996

3.1.2 Especies vegetales:

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia-0 (Col-0) adquiridas originalmente en Lehle Seeds y reproducidas posteriormente en el IAL para los experimentos realizados en este trabajo de tesis. Estas plantas se hicieron crecer en una cámara de cultivo que mantiene las condiciones óptimas para su germinación, crecimiento y desarrollo. Se emplearon además plantas de *Nicotiana benthamiana* para experimentos de transformación transitoria.

3.1.3 Medios de cultivo:

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de bacterias, levaduras y plantas se especifican en la tabla 2.

Tabla 2. Medios de cultivo

Medio de cultivo	Organismo cultivado	Composición	Referencia
Lysogeny Broth (LB)	<i>Escherichia coli</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Peptona de carne 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5 g/l; pH 7. Para medios sólidos, se añadieron 15 g/l de agar.	Sambrook y col., 1989
Murashige & Skoog	<i>Arabidopsis thaliana</i>	KNO ₃ 1,9 g/l; NH ₄ NO ₃ 1,65 g/l; CaCl ₂ .2H ₂ O 0,44 g/l; MgSO ₄ .7H ₂ O 0,37 g/l; KH ₂ PO ₄ 0,17 g/l; Na ₂ EDTA 37,3 mg/l; FeSO ₄ .7H ₂ O 27,8 mg/l; MnSO ₄ .4H ₂ O 22,3 mg/l; H ₃ BO ₃ 6,2 mg/l; ZnSO ₄ .4H ₂ O 8,6 mg/l; KI 0,83 mg/l; Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O 0,25 mg/l; CuSO ₄ .5H ₂ O 0,025 mg/l; CoCl ₂ .6H ₂ O 0,025 mg/l; pH 5,8. Para medios sólidos, se añadieron 8 g/l de agar.	Murashige y Skoog, 1962
Synthetic Defined (SD) Agar	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glucosa 2 g/l; agar 1,8 g/l; biotina 0,002 mg/l; ácido pantoténico 0,4 mg/l; ácido fólico 0,002 mg/l; inositol 2 mg/l; ácido nicotínico 0,4 mg/l; ácido p-aminobenzoico 0,2 mg/l; piroxidina-HCl 0,4 mg/l; riboflavina 0,2 mg/l; tiamina-HCl	James y col., 1996

0,4 mg/l; ácido bórico 0,5 mg/l; CuSO₄ 0,04 mg/l; KI 0,1 mg/l; FeCl₃ 0,2 mg/l; MnSO₄ 0,4 mg/l; Na₂MoO₄ 0,2 mg/l; ZnSO₄ 0,4 mg/l; K₂HPO₄ 1 gr/l; MgSO₄ 1.6 H₂O 620 mg/l; NaCl 100 mg/l; CaCl₂ 100 mg/l; (NH₄)₂SO₄ 5 g/l.

El medio MS se utilizó con un suplemento de vitaminas Gamborg 1µl/ml (Gamborg y col., 1968). La solución de vitaminas de Gamborg incluyó: m-inositol 100 mg/l, tiamina-HCl 10 mg/l, ácido nicotínico 1mg/l y piridoxina-HCl 1 mg/l.

3.1.4 Vectores:

El plásmido ***pGEM T-easy*** (Promega), se utilizó para el clonado de productos provenientes de reacciones de amplificación con la enzima Taq ADN polimerasa. El vector se provee digerido, con el agregado de un nucleótido de timina en los extremos 5', para permitir la ligación con los fragmentos obtenidos de PCR que tienen un nucleótido extra de adenina en sus extremos 3'. Este plásmido presenta un gen de resistencia a ampicilina.

El plásmido ***pENTR3C*** fue desarrollado por Invitrogen® y actualmente es comercializado por ThermoScientific®. Permite el clonado de fragmentos amplificados por PCR mediante el uso de enzimas de restricción y ligasas, para luego introducir estos fragmentos mediante tecnología GATEWAY® en un vector de destino. Algunos componentes importantes de este vector son los sitios attL1 y attL2 flanqueando el sitio de inserción de la secuencia deseada para permitir la recombinación específica y el gen *ccdB* para selección negativa de no transformantes. Este vector contiene un gen de resistencia a kanamicina en bacterias y un origen de replicación bacteriano pUC.

El plásmido ***pKGWFS7*** (Karimi y col., 2002) es un derivado del vector binario *pPZP200*. Este plásmido fue diseñado para clonados utilizando la tecnología GATEWAY®, particularmente para el análisis de secuencias promotoras. El promotor clonado permite controlar la expresión de la proteína de fusión GFP (proteína fluorescente verde; del inglés, *Green Fluorescence Protein*) – GUS (β-glucuronidasa). Dentro de la región de movilización de ADN, necesaria para la transformación de plantas, contiene además el gen NPTII que confiere resistencia a kanamicina en plantas. Otras secuencias relevantes dentro del vector incluyen el gen de resistencia a espectinomicina en bacterias y un origen de replicación bacteriano ColE1.

El vector **pFK247** (Laboratorio del Dr. Detlef Weigel) fue utilizado para expresar de manera ectópica y constitutiva los genes *AtHB23* y *AtPHL1* monitoreando su localización subcelular. Este plásmido es un vector binario derivado del vector pGreen (Hellens y col., 2000) diseñado para expresar constitutivamente una fusión traduccional con la proteína reportera GFP en el extremo N terminal de la proteína de fusión. Otras secuencias relevantes dentro del vector son: promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (*35SCaMV*), genes de resistencia a espectinomicina y estreptomycinina en bacterias y el gen de resistencia al herbicida BASTA que permite la selección de plantas transformadas con el T-DNA.

El plásmido **pJV117** (Laboratorio del Dr. Detlef Weigel) es un vector diseñado para expresar constitutivamente una fusión traduccional con la proteína reportera mCherry (Proteína Roja Fluorescente, del inglés, *Red Fluorescent Protein*) en el extremo N terminal de la proteína de fusión. Otras secuencias relevantes dentro del vector son: promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (*35SCaMV*), genes de resistencia a espectinomicina y estreptomycinina en bacteria y el gen de resistencia a kanamicina en plantas.

El plásmido **pK2GW7** (Karimi y col., 2002) también deriva del vector binario pPZP200 y fue diseñado para clonados GATEWAY®, pero en este caso para la sobreexpresión de un gen de interés, que se clona entre el promotor *35SCaMV* y la señal de poliadenilación 35S-Term. Dentro de la región de movilización de ADN, contiene además el gen *NPTII* que confiere resistencia a kanamicina en plantas. Tiene, además, un gen de resistencia a espectinomicina en bacterias y un origen de replicación bacteriano ColE1.

El plásmido **pAS054** (Laboratorio del Dr. Detlef Weigel) fue diseñado para clonados GATEWAY®, para sobreexpresar un gen de interés a clonar entre el promotor *35SCaMV* y el extremo N terminal de la proteína Citrina. Otras secuencias relevantes dentro del vector son: un origen de replicación bacteriano ColE1, un gen de resistencia a espectinomicina y estreptomycinina en bacterias, y un gen de resistencia a kanamicina en plantas.

El plásmido **pAS059** (Laboratorio del Dr. Detlef Weigel) fue diseñado para clonados GATEWAY®, para sobreexpresar un gen de interés que se clona entre el promotor *35sCaMV* y el extremo C terminal de la proteína Citrina. Otras secuencias relevantes dentro del vector son: un origen de replicación bacteriano ColE1, un gen de resistencia a espectinomicina y estreptomycinina en bacterias, y un gen de resistencia a BASTA en plantas.

Los plásmidos **pDest22** (para AD) y **pDest32** (para BD) (Laboratorio del Dr. Jong Chan Hong) fueron diseñados para clonados por recombinación GATEWAY® (Hellens y col., 2000), para expresar un gen de interés fusionado a los dominios de activación (AD) y de unión (BD) del gen

que codifica para el factor de transcripción de levaduras GAL4. Estos vectores fueron usados para generar construcciones para ensayos de doble híbrido en levaduras (*AD:PHL1*; *BD:PHL1*, *AD:AtHB23* y *BD:AtHB23*).

3.1.5 Plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*:

En la tabla 3 se muestran las diferentes plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en esta Tesis Doctoral.

Tabla 3. Líneas de *Arabidopsis thaliana* adquiridas por otros medios

Nombre	ID	ID del locus	Gen	Referencia
<i>promotorAUX1:GUS</i>		AT2G38120	<i>AUX1</i>	Marchant y col., 1999
<i>promotorLAX1:GUS</i>		AT5G01240	<i>LAX1</i>	Bainbridge y col., 2008
<i>promotorLAX3:GUS</i>		AT1G77690	<i>LAX3</i>	Bainbridge y col., 2008
<i>DR5:GUS</i>				Ulmasov y col., 1997
<i>promotorAtHB23:AtHB23:GUS:GFP</i>		AT1G26960	<i>AtHB23</i>	Perotti y col., 2019
<i>35S:amiR23</i>		AT1G26960	<i>AtHB23</i>	Ribone y col., 2015
<i>35S:AtHB23</i>		AT1G26960	<i>AtHB23</i>	Ribone y col., 2015

3.1.6 Oligonucleótidos:

La tabla 4 indica el nombre, la secuencia y el uso dado a los oligonucleótidos utilizados para los diferentes clonados realizados.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para clonado molecular

Nombre	Secuencia 5'→3'	Clonado
PHL1.2_F	gggggATCCATgACTCTggCTAATgATTTCgg	<i>35S:PHL1:EGFP:GUS</i> <i>35S:PHL1:Ncitrine</i> <i>35S:PHL1:Ccitrine</i>

		35S:mCherry:PHL1 35S:EGFP:PHL1
phl1RXbal	CCCTCTAgAATCTTCTCTgACACgTTTCCTTgA	35S:PHL1:EGFP:GUS 35S:PHL1:Ncitrine 35S:PHL1:Citrine 35S:mCherry:PHL1 35S:EGFP:PHL1
PrPHL1F	CACCggTACCTCTCAAATTATgACCCgTACTCA	<i>prPHL1:GUS:GFP</i>
PrPHL1R	CCCgAATTCAACTTTATgCAAAggAgATgAACC	<i>prPHL1:GUS:GFP</i>

Nota: Las regiones subrayadas corresponden a los sitios de restricción reconocidos por enzimas de uso comercial.

En la tabla 5 se detallan el nombre, la secuencia de los oligonucleótidos y el ensayo de RT-qPCR para el cual fueron utilizados los siguientes oligonucleótidos.

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para determinaciones de RT-qPCR

Nombre	Secuencia 5'→3'	RT-qPCR (Niveles de transcritos de)
Act-qPCR-F	ggTAACATTgTgCTCAGTggTgg	Normalizador ACT qPCR
Act-qPCR-R	AACgACCTTAATCTTCATgCTgC	Normalizador ACT qPCR
AtHB23qPCR-2F	gCTTCAAAGCTCAGgTAATggCA	<i>AtHB23</i>
AtHB23qPCR-2R	ggATggCCTAgggCgAATTg	<i>AtHB23</i>
qpcrPHL1F	CTCTTgAATAACCCTggCTTgA	<i>PHL1</i>
qpcrPHL1R	TCTTCTCTTgAggTTCTCCTgT	<i>PHL1</i>
SWEET10-F	AACTCCTTTgCCTTTgTCgTACA	<i>SWEET10</i>
SWEET10-R	gTCAACACgAAgATTgCgCC	<i>SWEET10</i>
AtSWEET11-F	AACAAgTgTACCTgCggAAATgAT	<i>SWEET11</i>
AtSWEET11-R	AAgAggACTgCTTgCCATgTTTAg	<i>SWEET11</i>
AtSWEET12-F	CATATggCTCCTTTATggTCTTgC	<i>SWEET12</i>
AtSWEET12-R	ACgTTTgggAAggCAACATAgATA	<i>SWEET12</i>
AtSWEET15-F	CAATgACATATgCATAgCgATTCCAA	<i>SWEET15</i>
AtSWEET15-R	ggACTCATCACgACAATACTCTTAAg	<i>SWEET15</i>

SUC3-F	CAAgAACCGCAgCCgTAATC	<i>SUC3</i>
SUC3-R	CTTgACCGCCACCggAAT	<i>SUC3</i>
SUC4-F	AgTgTCAAgCgAggAACgCATA	<i>SUC4</i>
SUC4-R	AgTCACACgAgAAgCCATTgC	<i>SUC4</i>
SUC5-F	gggCTATgggATTCCATTg	<i>SUC5</i>
SUC5-R	TAAAACgACgACgACCAAgg	<i>SUC5</i>
ADG1-F	CACCGTCTAAgATgCTTgATgC	<i>ADG1</i>
ADG1-R	gATgTgCgAgTTTTTCCAAT	<i>ADG1</i>
PGM-F	gTgAAAAGgTATTgggCgACA	<i>PGM</i>
PGM-R	CCgTgAACACAAACCgAACA	<i>PGM</i>
GWD-F	AACgAgAgAgCATACTTCAGC	<i>GWD</i>
GWD-RP	CAATCggTTTgCTTgggTAg	<i>GWD</i>
BAM1-F	ACACgAgCAGATTCTCAAggC	<i>BAM1</i>
BAM1-R	TCCCTTCACCCATTTTCTCA	<i>BAM1</i>

3.1.7 Construcciones genéticas para plantas:

3.1.7.1 Construcciones para expresar un promotor específico:

prPHL1:EGFP:GUS: Para obtener esta construcción se partió de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana*, a partir del cual se amplificó una región de 1568 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción con oligonucleótidos adecuados (tabla 1). La región amplificada fue clonada en un vector *pENTR*. Dado que en este paso la secuencia del promotor ingresó en sentido contrario, se procedió a realizar una digestión de este vector y del *pENTR3C* con las enzimas Kpn1 y EcoR1 y luego se ligó. Una vez realizados los chequeos por PCR, corte con enzimas de restricción y secuenciación para controlar el sentido de inserción del fragmento de interés, se procedió a realizar una recombinación GATEWAY empleando el vector *pKGWFS7* como vector de destino, el cual contiene la secuencia codificante de la proteína fluorescente EGFP y el gen reportero *GUS*, cuya expresión será controlada por el promotor de interés una vez realizado el clonado correspondiente.

3.1.7.2 Construcciones para sobreexpresar un gen específico:

35S:PHL1: Esta construcción fue obtenida por recombinación GATEWAY, empleando como vector de entrada el vector *pENTR223* conteniendo la región codificante (CDS, del inglés *Coding DNA Sequence*) de *PHL1*, disponible en el laboratorio y adquirido en la ABRC, y como vector de destino a *pK2GW7*, el cual tiene el promotor constitutivo *35SCaMV* corriente arriba del sitio de recombinación donde la secuencia de interés es insertada.

3.1.7.3 Construcciones para sobreexpresar un gen específico como fusión otro gen reportero (Tag):

35S:mCherry:PHL1: Esta construcción se obtuvo por recombinación GATEWAY partiendo del vector *pENTR223* el cual contenía el CDS de *PHL1*, y como vector destino a *pJV117*, el cual permite expresar a *PHL1* fusionado a la proteína fluorescente mCherry en la región N-terminal.

35S:EGFP:PHL1: Esta construcción se obtuvo de la misma manera que la construcción anterior, sólo que en este caso el vector de destino empleado fue *pFK247*, el cual permite expresar a *PHL-1* fusionado a la proteína fluorescente EGFP.

35S:PHL1:Ncitrine: Para obtener esta construcción se partió de la región codificante de *AtPHL1* clonada en el vector *pENTR223*, la cual fue amplificada por PCR y clonada en *pGEM-Teasy*. Este vector fue luego digerido con las enzimas *BamHI* y *XbaI*, al igual que el vector *pENTR3C*, donde la región codificante de *AtPHL1* fue posteriormente ligada. El vector *pENTR3C* conteniendo la región codificante de *PHL1* fue utilizado finalmente como vector de entrada para ser recombinado mediante la técnica GATEWAY con el vector *pAS054*, el cual permite expresar a *PHL-1* fusionado a la porción N-terminal de la proteína fluorescente Citrina en el extremo C terminal.

35S:PHL1:Citrine: Esta construcción fue obtenida de la misma manera que la construcción anterior, sólo que en este caso el vector final de destino fue el vector *pAS059*, el cual permite expresar a *PHL-1* fusionado a la porción C-terminal de la proteína fluorescente citrina.

35S:mCherry:AtHB23: Esta construcción ya estaba disponible en el laboratorio. Para obtenerla se partió de un molde que contenía la región codificante de *AtHB23* disponible en el laboratorio; el mismo fue amplificado por oligonucleótidos específicos e insertado en los sitios *BamHI* y *XhoI* del vector *pENTR3C*, y luego por recombinación GATEWAY, usando como vector final a *pJV117*, se obtuvo la construcción final con *AtHB23* fusionado en su extremo N-terminal a la proteína fluorescente mCherry.

35S:EGFP:AtHB23: Esta construcción ya estaba disponible en el laboratorio, y fue obtenida del mismo modo que la construcción anterior, empleando en este caso como vector de destino en la recombinación GATEWAY el *pFK247*.

35S:AtHB23:Ncitrine: Esta construcción se encontraba disponible en el laboratorio, y fue obtenida clonando la región codificante de *AtHB23* sin el codón de stop en el vector *pENTR3C* para luego poder realizar una fusión C terminal. Se empleó en este caso como vector de destino en la recombinación GATEWAY el *pAS054*.

35S:AtHB23:Citrine: Esta construcción se encontraba disponible en el laboratorio y fue obtenida de la misma manera que la construcción anterior, usando un vector *pAS059* como vector de destino en la recombinación GATEWAY.

3.1.7.4 Construcciones para ensayos de doble híbrido en levaduras:

promotorADH1:GAL4BD:AtHB23: Para obtener esta construcción se clonó el CDS de *AtHB23* en el vector *pDEST32*, el cual contiene la secuencia codificante para el dominio de unión al ADN del FT GAL4 corriente arriba del sitio donde se insertó el CDS de *AtHB23*.

promotorADH1:GAL4BD:PHL1: Para obtener esta construcción se clonó el CDS de *AtPHL1* en el vector *pDEST32*, de la misma manera que la construcción anterior.

promotorADH1:GAL4AD:AtHB23: Para obtener esta construcción se clonó el CDS de *AtHB23* en el vector *pDEST22*, el cual contiene la secuencia codificante del dominio de activación del FT GAL4 corriente arriba del sitio donde se insertó el CDS de *AtHB23*.

promotorADH1:GAL4AD:PHL1: Para obtener esta construcción se clonó el CDS de *PHL1* en el vector *pDEST22*, de la misma manera que en la construcción anterior.

3.2 Métodos:

3.2.1 Métodos utilizados para el trabajo con ácidos nucleicos:

3.2.1.1 Transformación de bacterias por electroporación:

La preparación de las células competentes y las condiciones de electroporación empleadas fueron las recomendadas en el manual del fabricante del equipo (*Gene Pulser*TM, Bio-Rad). El choque eléctrico se realizó en cubetas de 0,2 cm (Bio-Rad). Inmediatamente después del disparo se adicionó 1 ml de medio LB a la suspensión de células y la mezcla se incubó durante 1 h a 37°C en el caso de *E. coli* y 2 h a 28°C en el caso de *A. tumefaciens*. Después de centrifugar a 4000 g durante 5 min, el sedimento celular se resuspendió en 100 µl de medio LB y se sembró en placas de Petri que contenían medio LB suplementado con los antibióticos adecuados y agarizado (1,5 % p/v). Las placas fueron incubadas a la temperatura correspondiente hasta la aparición de colonias (aproximadamente 16 h para *E. coli* y 48 h para *A. tumefaciens*).

3.2.1.2 Obtención y cuantificación de ácidos nucleicos:

3.2.1.2.1 Minipreparación de ADN plasmídico:

La preparación de ADN plasmídico a partir de células de *E. coli* y *A. tumefaciens* transformadas se realizó según el método de la lisis alcalina, descrito por Birnboim y Doly (1979). Las células transformadas se cultivaron hasta saturación en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente. Para cada preparación se centrifugaron 1,5 ml del cultivo saturado a 5000 g durante 5 mins y el sedimento celular fue resuspendido en 100 µl de solución I de minipreparación. Luego de 5 min de incubación a temperatura ambiente, se agregaron 200 µl de solución II de minipreparación, los tubos se agitaron por inversión y se incubaron en hielo durante 5 min. Posteriormente, se agregaron 200 µl de Solución II, se mezcló por inversión y se incubó durante 5 min en hielo. Se prosiguió con la preparación, agregando 150 µl de Solución III y la mezcla se incubó nuevamente 5 min en hielo, antes de ser centrifugada durante 15 min a 12000 rpm y 4°C. Se recuperó el sobrenadante, se le practicó una extracción fenol/cloroformo 1:1 (v/v) y se centrifugó 10 min a 8000 rpm. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó el ADN plasmídico mediante el agregado de 2 volúmenes de etanol absoluto. Esta mezcla se incubó 60 min a -20°C y se centrifugó 15 min a 12000 rpm y a 4°C. El precipitado se lavó con etanol 70 % (v/v) y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente fue

resuspendido en 100 µl de agua destilada estéril. Para las preparaciones de ADN plasmídico utilizado en reacciones de secuenciación y en otros casos en los que se precisó de ADN plasmídico de alta calidad, se utilizó el kit comercial *Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche) siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante.

- **Solución I:** Tris-HCl 25 mM (pH 8); glucosa 50 mM; EDTA 10 mM.
- **Solución II:** NaOH 0,2 N; SDS 1 % (p/v).
- **Solución III:** KAc 5 M, pH 5,2.

Para las preparaciones de ADN plasmídico utilizado en reacciones de secuenciación y en otros casos en los que se precisaron muestras de alta calidad, se utilizó el kit comercial *Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega) siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante.

3.2.1.2.2 Minipreparación de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana*:

Para analizar mediante la técnica de PCR la población de plantas de *A. thaliana* transformadas, se realizaron preparaciones de ADN total empleando un método rápido descrito por Li y Chory (1998). Se colocó una hoja joven (de aproximadamente 29 días) en un tubo y se la maceró durante 15 s. Después de agregar 700 µl de solución amortiguadora de extracción, se agitó vigorosamente durante 10 s y se centrifugó a 18.000 g durante 1 min. Se recuperó el sobrenadante y se realizó una extracción con 1 volumen de la mezcla fenol-cloroformo 1:1 (v/v). Luego de centrifugar 10 min a 10.000 g, se recuperó nuevamente el sobrenadante y se realizó una segunda extracción sólo con cloroformo (1 volumen). Posteriormente, se centrifugó durante 10 min a 10.000 g, se tomaron 600 µl del sobrenadante y se agregó 1 volumen de isopropanol, para luego incubar 1 h a -20°C. La mezcla alcohólica se centrifugó a 10.000 g durante 10 min; el precipitado se lavó con etanol 70% y se secó a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió en 100 µl de agua destilada estéril.

- **Solución amortiguadora de extracción:** Tris-HCl 200 mM (pH 8,0), NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0,5% (p/v).

3.2.1.2.3 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa:

Cuando el objetivo de la electroforesis fue purificar un fragmento de ADN la corrida se llevó a cabo en geles de agarosa de bajo punto de fusión (Promega), empleándose solución TAE 1x tanto para la preparación del gel como para la solución de corrida. Una vez identificadas mediante visualización sobre transiluminador UV, las bandas correspondientes a los fragmentos esperados se escindieron utilizando un bisturí estéril y se incubaron con 2 volúmenes de agua bidestilada en un baño de agua a 65°C hasta observar la completa disolución de la agarosa. Posteriormente se llevaron a cabo 2 extracciones sucesivas con 1 volumen de fenol y a continuación una extracción con cloroformo, todas seguidas de una centrifugación de 10 min a 10000 rpm a temperatura ambiente a fin de separar las fases. El ADN presente en la fase acuosa fue precipitado mediante el agregado de 1/10 volúmenes de NaAc 3 M (pH 5,2) y 2 volúmenes de etanol absoluto. Para facilitar la precipitación de fragmentos de muy bajo peso molecular o que se encontraban en baja cantidad, se adicionaron 2,5 µg de ARNt (Sigma) a la solución etanólica. Tras la precipitación, el fragmento purificado fue solubilizado en 10 µl de H₂O milliQ estéril. La purificación de los vectores binarios y de clonado, posterior al corte con enzimas de restricción, fue realizada directamente por precipitación alcohólica para evitar el daño mecánico al plásmido.

3.2.1.2.4 Extracción y purificación de ARN total:

Las extracciones de ARN fueron realizadas con un reactivo similar Trizol (Invitrogen™) preparado en el laboratorio, (Chomczynski y Sacchi, 1987). Para estas extracciones, se pulverizaron 50-100 µg de tejido vegetal con N₂ líquido en un mortero o Eppendorf estéril (dependiendo del tipo de tejido vegetal), y luego se transfirió el polvo fino a un tubo de tipo Eppendorf en el cual se agregó 1 ml del reactivo de extracción. Tras mezclar varias veces por inversión, la mezcla se incubó a temperatura ambiente por 10 min antes de agregar 200 µl de cloroformo y centrifugar por 20 min a 11800 rpm a 4°C. La fase acuosa se precipitó posteriormente con 1 volumen de isopropanol, incubando 10 min a temperatura ambiente. Tras dos lavados con etanol 70 % v/v y secado, el precipitado se resuspendió en 30 µl de H₂O milliQ estéril.

3.2.1.2.5 Cuantificación de ácidos nucleicos totales:

La calidad y cantidad del ARN o ADN fueron evaluadas con el equipo Nanodrop NanoPhotometer TM (IMPLEN) midiendo la absorbancia a 260 nm (A_{260} ; Sambrook y Russell, 2000). Se consideró que un valor de A_{260} de 1 corresponde aproximadamente a 40 $\mu\text{g/ml}$ de ARN o a 50 $\mu\text{g/ml}$ de ADN. Para cada medición se utilizó un volumen de 3 μl por muestra. La contaminación de las purificaciones con proteínas fue evaluada mediante el cociente A_{260}/A_{280} , y la de carbohidratos y compuestos fenólicos mediante el cociente A_{260}/A_{230} . El valor para dichas relaciones cuando las muestras presentan una calidad aceptable debe estar comprendido entre 1,8 y 2.

3.2.2 Reacciones enzimáticas:

3.2.2.1 Digestión de ADN con endonucleasas de restricción:

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones de reacción recomendadas por los respectivos proveedores. En todos los casos se utilizaron de 1 a 5 U de enzima por cada microgramo de ADN a digerir y se incubó al menos 2 h a la temperatura recomendada para la enzima.

3.2.2.2 Ligación de moléculas de ADN:

La ligación de fragmentos de ADN se llevó a cabo utilizando 1 U de T4 ADN ligasa (Promega), en un volumen de reacción de 10 μl empleando la solución amortiguadora de reacción provista por el proveedor de la enzima. Se utilizaron cantidades de inserto y vector tales que la relación molar entre ambos fuera de 5 a 1. La incubación se realizó durante 16 h a 4°C.

3.2.2.3 Reacción de recombinación GATEWAY®:

La recombinación *in vitro* de fragmentos de ADN se llevó a cabo utilizando 1 μl de GATEWAY® *LR clonaseTM II Enzyme Mix* (InvitrogenTM), 1 μl del vector *Destination* (150 ng/ μl), 1 μl de solución amortiguadora TE pH 8, y 2 μl del vector *Entry* (150 ng/ μl). La incubación se realizó durante 3 h a temperatura ambiente, y los 5 μl fueron utilizados para transformar células competentes de *E. coli*.

3.2.2.4 Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa:

Se utilizó la solución amortiguadora de reacción provista por el fabricante de la enzima, a la cual se le agregaron los siguientes reactivos: MgCl₂ 2 mM; dNTP 0,2 mM cada uno y 0,1 μM de cada oligonucleótido específico. A esta mezcla de reacción se le incorporó una dilución apropiada del ADN molde y luego se le agregaron 0,3 U de enzima *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen) para PCRs de chequeo, o 0,15 U de *Taq* ADN polimerasa y 0,15 U de *Pfu* ADN polimerasa (Promega) para la amplificación de promotores y regiones codificantes. Los volúmenes de reacción fueron de 25 o 50 μl.

Finalmente se procedió a la reacción de amplificación. Estas reacciones se llevaron a cabo en el termociclador PXE 0.2 Thermal Cycler (*Thermo Electron Corporation*), el programa se detalla más abajo. Se estableció la temperatura de hibridación (T_a, temperatura de *annealing* o anillado) de acuerdo a la composición de bases de los oligonucleótidos utilizados, aplicando la siguiente relación para su cálculo:

$$T_a = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C) - 5^\circ\text{C}$$

Programa: (1 min a 94°C, 1 min a T_a, 1-2 min a 72°C) 30 ciclos + 10 min a 72°C.

Nota: El tiempo de extensión varió dependiendo del largo del fragmento a amplificar. En el caso de la *Taq* ADN polimerasa el tiempo se estimó en 1 min por cada 1000 pb a amplificar. Cuando se trabajó con ADN genómico como molde, se realizó una desnaturalización previa a 94°C durante 5 min.

3.2.2.5 Transcripción reversa de ARN total:

Las reacciones de transcripción reversa se llevaron a cabo cursando el siguiente protocolo en dos etapas: 1. En un volumen final de 10 μl, se colocó 1 μg de ARN con oligonucleótidos polidTV 0,1 μM (poli-dTV consiste en 1 nucleótido variable, ubicado en el extremo 5', seguido de 24 nucleótidos de timina). Esta mezcla se incubó durante 5 min a 70°C, para luego ser colocada inmediatamente en hielo (este tratamiento permite desarmar las estructuras secundarias del ARN). Terminado este proceso, se le adicionaron a la mezcla 6 μl de solución amortiguadora de la enzima, 2 μl de dNTP (20 mM), 200 U de transcriptasa reversa M-MLV (Promega) y se completó el volumen hasta 30 μl con H₂O milliQ estéril. Dicha mezcla se incubó

1,5 h a 42°C y luego se procedió a inactivar la enzima calentando la reacción 5 min a 80 °C más 30 s adicionales a 94°C.

3.2.3 Análisis de ácidos nucleicos:

3.2.3.1 Electroforesis de ADN en geles de agarosa:

Para el análisis de fragmentos de ADN en geles de agarosa se utilizó el sistema de tipo submarino (Ausubel y col., 1983). La concentración de agarosa varió entre 0,8 y 2 % (p/v), dependiendo del tamaño del fragmento que se analizaba. Los geles fueron preparados en solución TAE 1x con una concentración de GelRed 6,7x (Biotium, Cat. No. 41003) y la muestra, antes de ser sembrada, fue mezclada con solución de siembra en una relación 1/10 (v/v). La separación electroforética se realizó en solución TAE 1x, a voltaje constante entre 1 y 5 V por centímetro de gel. La visualización del ADN en el gel se llevó a cabo mediante un transiluminador de luz UV (310 nm) Fotodyne, USA. En todos los casos en los que fue necesario estimar la longitud de los fragmentos de ADN separados electroforéticamente, se empleó como marcador una muestra conteniendo fragmentos de ADN doble cadena en un rango de 100 a 1000 pb con incrementos de 100 pb y dos bandas adicionales de 1500 y 2000 pb adquirida en PB-L (Productos Bio-Logicos®).

- **Solución TAE 1x:** Tris-Ac 20 mM (pH 8,5), EDTA 1 mM.
- **Solución de siembra:** Azul de bromofenol 0,25 % (p/v), xilencianol FF 0,25 % (p/v), glicerol 30 % (v/v).

3.2.3.2 Electroforesis de ARN en condiciones desnaturalizantes:

La separación electroforética de moléculas de ARN se realizó en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes. Esta técnica se utilizó para analizar la integridad de las muestras de ARN a utilizar en diversos ensayos. La concentración de agarosa utilizada fue de 1 % (p/v) y los geles fueron preparados en solución HEPES 1X y formaldehído 6 %. Antes de la corrida electroforética, a cada muestra (entre 5 y 10 µg de ARN total) se le agregaron 3 volúmenes de solución de desnaturalización y la mezcla se incubó 5 min a 65°C. Después del calentamiento, se agregó 1/10 del volumen de solución de siembra adicionada con GelRed® (Biotium). La separación electroforética se llevó a cabo en solución HEPES 1x, empleando un voltaje constante de 3 V por cm de gel. La visualización del ARN se realizó en un

transiluminador de luz UV (310 nm) Fotodyne, USA. Esta técnica analítica se utilizó con el ARN aislado para los estudios de transcriptómica.

3.2.3.3 Cuantificación de transcritos de PCR en tiempo real:

La PCR cuantitativa en tiempo real fue llevada a cabo usando el instrumento StepOne o StepOnePlus Real-Time Systems de Applied Biosystems™. Las reacciones se realizaron en volúmenes finales 10 µl que contenían: 5 µl de *Taq*TM Universal SYBR® Green Supermix; 0,2 µl de cada oligonucleótido específico (10 pmol/µl) y 1 µl de una dilución 1/20 del producto de la transcripción reversa. La fluorescencia emitida se registró en forma continua durante 40 ciclos. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se detallan en la Tabla 5. Los niveles de expresión de los genes *ACTINA2* y *ACTINA8* fueron cuantificados conjuntamente para normalizar los niveles de expresión de los genes de interés. Estos genes han sido reconocidos previamente como genes normalizadores (Charrier y col., 2022) y son utilizados de acuerdo al método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Todas las cuantificaciones fueron realizadas con triplicados biológicos. Las diferencias obtenidas fueron consideradas significativas para un valor estadístico p inferior a 0,05 (Prueba t de *Student*). Los valores de cuantificación se expresaron en forma relativa a un control al cual le fue asignado arbitrariamente el valor uno (1).

3.2.3.4 Determinación de la secuencia de moléculas de ADN:

Para determinar la secuencia de ADN de los distintos fragmentos clonados se utilizó el servicio de *Macrogen Sequencing System* en Seúl, Corea. Para usar este servicio se enviaron 10 µl de cada plásmido 100 ng/µl y 10 µl de un oligonucleótido específico (5 µM); esto último cuando la construcción no permitía la realización de la secuencia con oligonucleótidos universales. Las muestras fueron procesadas en un secuenciador automático ABI3730XL. Los datos de las secuencias y sus respectivos cromatogramas nos fueron enviados en forma electrónica.

3.2.3.5 Análisis de las secuencias:

Para la identificación general de secuencias se consultaron las bases de datos del EMBL, GenBank y SwissProt utilizando el programa BLAST (Altschul y col., 1990) a través del servidor del *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

3.2.4 Métodos para el trabajo con material vegetal:

3.2.4.1 Obtención del material vegetal y condiciones de cultivo:

3.2.4.1.1 Desinfección y cultivo *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*:

Las semillas recolectadas de los experimentos de transformación fueron esterilizadas mediante un lavado en lavandina 25 % durante 8 min y tres enjuagues con agua destilada estéril. Luego fueron resuspendidas en 1 ml de agar 0,1 % y sembradas en placas de Petri de 150 mm de diámetro que contenían medio de cultivo 0.5x MS- 0.9% agar (Murashige y Skoog, 1962), y el antibiótico u hormona correspondiente al ensayo, según correspondiera. Las placas fueron mantenidas a 4°C durante tres días a fin de romper la dormancia de las semillas para luego ser pasadas a una cámara de cultivo con luz y temperatura controladas (16 h de luz a 24°C y 8 h de oscuridad a 22°C). Las pinzas y los bisturíes fueron esterilizados mediante calor por fuego directo mientras que el agua, el agar 0,1 % y el medio de cultivo MS fueron esterilizados en autoclave durante 20 min a 1 atmósfera de presión. Todo el proceso fue realizado en condiciones de esterilidad utilizando una cabina de flujo de aire horizontal (Forma Scientific, Inc.).

3.2.4.1.2 Cultivo de plantas en macetas:

El cultivo de plantas de *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana benthamiana* se realizó en una cámara de cultivo, con iluminación y temperatura controladas (16 h de luz a 24°C y 8 h de oscuridad a 21°C). Las condiciones de iluminación requeridas (100 – 120 $\mu\text{E}/\text{m}^2$) fueron obtenidas en forma artificial manteniendo las plantas bajo 6 tubos LED. Las plantas se sembraron en macetas de 10 cm de diámetro con el sustrato Klassman TS1 (Klasmann-Deilmann GmbH) y se regaron con fertilizante Hakaphos en una concentración de 3,5 ml/l. Se sembraron entre 5 y 10 semillas por maceta, se colocaron en una bandeja con solución Hoagland 0.5 x y se cubrieron con papel de nylon transparente. Las plantas se mantuvieron en cámara de cultivo, con condiciones de luz y temperatura controladas. Luego de una semana, cuando se observó la aparición del primer par de hojas, se retiró el papel de nylon.

- **Solución Hoagland 1x:** $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 115,04 mg/l; KNO_3 606,6 mg/l; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 656,4 mg/l; MgSO_4 240,78 mg/l; Fe-EDTA 20 μM ; H_3BO_3 2,86 mg/l; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,81 mg/l; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,22 mg/l; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,08 mg/l; $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,02 mg/l.

3.2.4.1.3 Transformación estable de *Arabidopsis thaliana*:

El método que se utilizó para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* fue el de inmersión floral (*Floral Dip*), descrito por Clough y Bent (1998). Se prepararon 8 macetas de 10 cm de diámetro con tierra sembrando entre cuatro y cinco semillas por maceta según se especifica en la sección anterior (3.2.1.2). Las plantas se cultivaron aproximadamente cuatro semanas, hasta la floración, y cuando los pedúnculos florales estaban emergiendo, se cortaron las inflorescencias sin dañar las hojas caulinares. Dos o tres días después del corte, surgieron nuevas inflorescencias de las yemas laterales; las cuales volvieron a cortarse. Esta operación se repitió 2 o 3 veces más, hasta que en todas las inflorescencias existieran al menos cuatro flores no abiertas. La transformación se realizó 2 días después del último corte. Para preparar la suspensión de transformación, se cultivaron células de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con la construcción adecuada en el vector en cada caso, en 10 ml de medio LB suplementado con rifampicina 50 µg/ml, estreptomicina 50 µg/ml y kanamicina 50 µg/ml; durante 24 h a 28°C, con agitación. Este cultivo se utilizó para inocular 300 ml del mismo medio y se dejó crecer hasta que alcanzó la fase estacionaria, entre 12 y 16 h. Las células se cosecharon por centrifugación a 4500 rpm durante 20 min y los sedimentos celulares se resuspendieron en 800 ml de solución de sacarosa al 5 % conteniendo 300 µl del detergente Silwet L-77 (OSI Specialties, Inc.). Las plantas se sumergieron en esta solución, evitando que el líquido entrara en contacto con la tierra. Luego, las macetas se colocaron en posición horizontal dentro de una bandeja, se taparon con papel de nylon y se trasladaron a la cámara de cultivo. Al día siguiente, se retiró el papel de nylon y las macetas se ubicaron en posición normal. Se regaron por subirrigación y las plantas se dejaron desarrollar hasta que las semillas estuvieran maduras, entre 4 y 5 semanas. Finalmente, se recolectaron las semillas de cada maceta por separado, se limpiaron manualmente de los restos de vainas y tierra y se conservaron a 4°C hasta el momento de su análisis.

3.2.4.1.4 Selección de transformantes de *Arabidopsis thaliana*:

Luego de esterilizar las semillas de acuerdo a lo detallado más arriba, las mismas se sembraron en placas de Petri conteniendo medio MS suplementado con kanamicina 25 µg/ml. En los primeros días en la cámara de cultivo, la mayoría de las semillas germinaron (95 – 99 %). Las plantas transformadas se pudieron distinguir de las sensibles al antibiótico según el color de

los cotiledones. Las placas se mantuvieron en la cámara de cultivo durante siete días más, hasta observar que los cotiledones se tornaran verdes. Las plantas transformadas se pasaron a macetas con tierra, y así se cultivaron hasta que las vainas estuvieron maduras. Luego se embolsó en sobres de papel cada planta de forma individual para recolectar las semillas y conservarlas a 4°C, hasta el momento de su análisis.

3.2.4.1.5 Selección de líneas transgénicas homocigotas de *Arabidopsis thaliana*:

La identificación de líneas transgénicas homocigotas se realizó en medio de cultivo MS con el antibiótico o herbicida correspondiente. Unas 40 semillas F2 de cada línea fueron sembradas en medio selectivo. El análisis de segregación del marcador de selección permitió identificar aquellas líneas transgénicas con una sola copia de T-ADN por presentar un 75 % de individuos resistentes a la selección. A partir de estas líneas F2 escogidas, se sembraron y seleccionaron las semillas F3, pero en este caso se identificaron líneas homocigotas por presentar el 100 % de sus individuos resistentes en la selección.

3.2.4.1.6 Transformación transitoria de *Nicotiana benthamiana*:

Se cultivaron células de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con las construcciones en estudio, una construcción que codifica para p19 y los controles de transformación pBI101.3 y pBI121 en frascos independientes (uno para cada construcción) conteniendo 10 ml de medio LB suplementado con rifampicina 25 mg/l, estreptomina 10 mg/l y kanamicina 50 mg/l o espectinomicina 100 mg/l, dependiendo el vector utilizado durante 24 h a 28°C con agitación. Luego se cosecharon las células por centrifugación a 2000 g durante 10 min y se resuspendieron en una DO final a 600 nm de 0,5 en 50 ml de la solución amortiguadora de infiltración, para después incubarlas 4 h a temperatura ambiente y con agitación de 100 rpm. Finalmente, se infiltró la cara abaxial de las hojas de tabaco valiéndose de una jeringa. Las plantas ya infiltradas se cultivaron durante 3-4 días más y en este momento se tomaron las muestras en nitrógeno líquido para su posterior análisis.

3.2.5 Análisis de plantas de *Arabidopsis thaliana*:

3.2.5.1 Análisis histoquímico de la actividad de la β -glucuronidasa:

Los ensayos de actividad de GUS *in situ* fueron realizados siguiendo la metodología descrita por Jefferson y col. (1987). Las plantas enteras o fragmentos de ellas fueron sumergidos en solución 1 mM de 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -ácido glucurónico (X-gluc) en 100 mM de fosfato de sodio a pH 7,0 y Triton X-100 al 0,1 % y luego de 5 min de infiltración por vacío se incubaron toda la noche a 37°C. Para una mejor visualización los tejidos se clarificaron con etanol 70 %.

Las muestras decoloradas fueron fotografiadas usando una cámara digital Coolpix 995 (Nikon) montada sobre un microscopio Eclipse E200 (Nikon) o sobre una lupa binocular SMZ800 (Nikon), y posteriormente procesadas con el programa Adobe Photoshop CS6.

3.2.5.2 Cortes histológicos:

Las muestras se fijaron en una solución de formaldehído 3,7 % v/v, etanol 50 % v/v y ácido acético 5 % v/v durante 16 h, se pasaron a etanol 70 % (v/v) y se deshidrataron por pasajes a través de una serie etanólica (80 %, 90 %, 95 % y 100 % v/v). Luego, se hicieron sucesivos pasajes a soluciones en concentraciones crecientes de xilol hasta llegar a xilol puro y finalmente se incluyeron en Histoplast (Biopack). Por medio de un micrótopo de rotación (Leica), se obtuvieron cortes transversales de 10 μ m. Finalmente, los cortes se montaron en portaobjetos, se desparafinaron y se tiñeron con los colorantes que se indican en las figuras. Las fotografías se tomaron con una cámara digital Nikon D5300 montada sobre un microscopio óptico Eclipse E200 (Nikon).

3.2.5.3 Medición de la longitud de raíces en plántulas:

Las semillas de los genotipos indicados se sembraron en placas de Petri cuadradas de 12 cm de lado conteniendo medio MS agar. Se sembraron sobre una única línea, espaciadas entre sí por 1 cm (5 semillas/genotipo) y luego del período de estratificación de tres días a 4°C y oscuridad, las placas se colocaron en posición vertical en las condiciones de cultivo indicadas anteriormente durante el período de tiempo necesario. Posteriormente se tomaron fotografías utilizando una cámara digital Nikon D5300 y se cuantificó el largo de las raíces utilizando el software libre RootNav (<https://www.quantitative-plant.org/software/rootnav>).

3.2.5.4 Cuantificación de raíces laterales en plántulas:

Las semillas de los genotipos correspondientes se sembraron en placas de Petri cuadradas de 12 cm de lado conteniendo medio MS agar. Se sembraron sobre una única línea, espaciadas entre sí por 1 cm (cinco semillas/genotipo) y luego del período de estratificación de 3 días a 4°C y oscuridad, se colocaron en posición vertical en las condiciones de cultivo indicadas anteriormente. En el caso de cuantificación de raíces secundarias, luego de 8 días de crecimiento, las plántulas fueron fotografiadas y sometidas a una tinción con Lugol por 30 min. A continuación, se observó la raíz principal de cada plántula en un microscopio Eclipse E200 a 40x de aumento. La identificación de los primordios de raíces laterales (PRL) y de las raíces laterales emergidas (RL) se hizo según lo descrito por Malamy y Benfey (1997). Finalmente, se cuantificó la longitud de cada raíz principal, utilizando el software libre RootNav para la posterior relativización del número de primordios de raíces laterales y el número de raíces laterales emergidas a dicha longitud expresados como: Densidad de PRL (Número de PRL/longitud de raíz principal) y densidad de RL (Número de RL/longitud de raíz principal).

3.2.5.5 Tratamientos con hormonas o salinidad en plántulas:

Las semillas de los genotipos especificados se sembraron en placas de Petri cuadradas de 12 cm conteniendo medio MS agar sobre una única línea, espaciadas entre sí por 1 cm (cinco semillas/genotipo) y luego del período de estratificación de tres días a 4°C y oscuridad, se colocaron en posición vertical en las condiciones de cultivo por 3 días. A continuación, cada plántula fue traspasada a la correspondiente placa de Petri conteniendo el medio MS agar suplementado con una concentración específica de la hormona correspondiente o NaCl durante un tiempo particular, según se indica en cada figura.

3.2.5.6 Observación de amiloplastos en raíces:

Las semillas de los genotipos especificados se sembraron sobre mallas dispuestas en las placas de Petri cuadradas de 12 cm de lado que contienen el medio MS-agar. Se sembraron sobre una única línea recta (20 semillas/genotipo) y luego del período de estratificación de tres días a 4°C y oscuridad, las placas se colocaron en posición vertical en las condiciones de cultivo por 5-10 días. Luego, las mallas conteniendo las plántulas fueron traspasadas a placas de Petri que contenían el medio MS agar suplementado o no con 150 mM NaCl por 8 h. Posteriormente, cada plántula fue sometida a tinción con Lugol por 10 min y luego de montada en el portaobjeto, se colocó por 3 min en forma vertical. A continuación, se realizó la observación de los amiloplastos en la punta de la raíz utilizando un microscopio óptico Eclipse E200.

3.2.5.7 Cuantificación del contenido de sustancias de reserva:

3.2.5.7.1 Cuantificación de lípidos:

Se tomaron las muestras en los tiempos y de los tejidos indicados en las figuras. El procedimiento se basa en el descrito por Siloto y colaboradores, con algunas modificaciones (Siloto y col., 2006). Una cantidad conocida de la muestra se molió finamente en nitrógeno líquido y se transfirió a un tubo de 1,5 ml. Se adicionaron 400 µl de isopropanol y se incubó la preparación durante 10 min a 64°C, luego el solvente se evaporó en una estufa hasta la eliminación del alcohol. Se realizó una primera extracción con metanol:cloroformo:H₂O (2:2:1,8). Primero se adicionaron los volúmenes correspondientes al cloroformo y al metanol hasta resuspender el precipitado. Finalmente se adicionó el agua y se agitó de forma energética para favorecer la extracción. Luego se centrifugó a 6700 g durante 5 min. Tras este paso se observaron tres fases: una fase superior acuosa, una interfase con restos del tejido y una fase inferior orgánica. La fase acuosa se eliminó y, con cuidado de no remover la interfase, se tomó la fase inferior, que contenía disueltos los lípidos (mayoritariamente triacilgliceroles (TAG)) de interés, y se la traspasó a un tubo de 1,5 ml pesado con anterioridad (P1). Se realizaron dos extracciones adicionales sobre la interfase cambiando las proporciones de metanol:cloroformo:H₂O a 1:2:0,8 y siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. Las fases orgánicas de las distintas extracciones se recolectaron en el mismo tubo de 1,5 ml y se incubaron bajo campana hasta la completa evaporación del solvente, tras lo cual se pesó nuevamente el tubo (P2). El contenido de lípidos se determinó como: (P1-P2) / mg de tejido.

En el caso de la determinación de lípidos en vainas, dado que la sensibilidad de la técnica gravimétrica descrita anteriormente no era suficiente por la escasa cantidad de tejido, se utilizó un kit de determinación de TAG en sangre (Wiener Lab.)

El análisis del perfil de ácidos grasos se realizó extrayendo los lípidos como se indicó previamente y las muestras se enviaron a un servicio especializado de medición que funciona en la Cátedra de Bromatología en la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (Director: Dr. Claudio Bernal).

3.2.5.7.2 Cuantificación de proteínas:

Las muestras se tomaron en los tejidos indicados en las figuras. Una cantidad conocida de la muestra se molió en nitrógeno líquido en mortero y se transfirió a un tubo de 1,5 ml con un volumen de solución amortiguadora de extracción de proteínas de 800-1000 μ l y a 4°C. Se centrifugó el homogenado a 12.000 rpm y 4°C durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo de 1,5 ml nuevo en el que se determinó la concentración de proteínas por el método Bradford (Bradford, 1976).

- **Solución amortiguadora de extracción de proteínas:** Na_3PO_4 50mM, EDTA 10 mM, SDS 0,1 %, Tritón 1 %, β -mercaptoetanol 10 mM.

3.2.5.7.3 Cuantificación de carbohidratos (glucosa, sacarosa y almidón):

Las muestras se tomaron en los tiempos y tejidos indicados en las figuras. Una cantidad conocida de la muestra se molió finamente en nitrógeno líquido y se transfirió a un tubo de 1,5 ml. Se agregaron 700 μ l de solución amortiguadora de homogeneización para carbohidratos y se incubó en hielo durante 30 min. Transcurrido ese tiempo, se agregaron 300 μ l de agua bidestilada y se agitó vigorosamente. Se centrifugó durante 5 min a 4°C y 16000 g. Tras este procedimiento se obtuvieron tres fases: una superior acuosa, que contiene los azúcares solubles, una interfase que contiene al almidón y una orgánica.

La fase acuosa se trasvasó a un tubo nuevo. Este tubo se incubó a 37°C hasta evaporación total. Luego, se resuspendieron los azúcares solubles en 100 μ l de agua bidestilada. La mitad de este volumen se utilizó para medir la concentración de glucosa. La otra mitad se utilizó para determinar la cantidad de sacarosa, esta muestra se trató durante tres h con 71 U de invertasa (Sigma-Aldrich), que hidroliza la sacarosa a glucosa y fructosa.

Finalmente se determinó el contenido de glucosa en ambas muestras por un método enzimático colorimétrico (Sociedad de Bioquímicos de Santa Fe). En la muestra sin tratar con invertasa se midió la concentración de glucosa como Gluc_1 (μ g glucosa/mg muestra). En la muestra tratada con invertasa se determinó el contenido de glucosa Gluc_2 (μ g glucosa/mg muestra) que incluye la glucosa proveniente de la muestra antes de ser tratada más la liberada por la hidrólisis de la sacarosa. La concentración de sacarosa se midió indirectamente y se calculó como $\text{Gluc}_2 - \text{Gluc}_1$.

La interfase insoluble, que contiene el almidón, se lavó con etanol absoluto y se secó en estufa a 70 °C durante una h aproximadamente. Luego se resuspendió en 250 μ l de hidróxido de

sodio 0,1N. Una vez que el precipitado se disolvió, se agregaron 75 µl de ácido acético 0,5 N (pH 5,1). Finalmente se tomaron 50 µl y se trataron durante toda la noche a 37°C con 2,5 U de amiloglucosidasa (Roche), que cataliza la hidrólisis de los enlaces $\alpha(1,4)$ y $\alpha(1,6)$, liberando glucosa, cuya concentración se midió como se indicó previamente.

- **Solución amortiguadora de homogeneización para carbohidratos:** metanol 62,5 % (v/v), cloroformo 26,8 % (v/v), buffer fosfato de sodio 5,4 mM (pH 7,5), EDTA 0,1mM.

3.2.5.8 Ensayo de transporte en silicuas con sonda CFDA:

Se diluyó CFDA (diacetato de 5(6)-carboxifluoresceína, 6 mg/ml en acetona) 1:10 en agua estéril inmediatamente antes del ensayo como fue informado por Jiang y col. (2019). Se cortaron silicuas completas desde el pedicelo (aproximadamente 1 cm) y se colocaron con el pedicelo en el fondo de un tubo de 1,5 ml (3 silicuas/tubo) para permitir la penetración de CFDA (6 µl/tubo). La incubación se realizó durante 15-30 min. La visualización se realizó con un láser a 488 nm, monitoreando la fluorescencia a 500–566 nm. El tejido teñido se fotografió utilizando una cámara Nikon D5300 montada sobre un microscopio óptico Eclipse E200 (Nikon).

3.2.6 Métodos para el trabajo con levaduras:

3.2.6.1 Doble híbrido en levaduras:

Para el *screening* del doble híbrido en levaduras se utilizó una versión truncada de AtHB23 (AtHB23 Δ AHA, Capella y col., 2014), y se lo enfrentó contra una biblioteca que contenía más de 1400 ADNc de longitud completa de FT de Arabidopsis en el pDEST22 compatible con GATEWAY® (Invitrogen). La versión truncada de AtHB23 se transformó primero en la cepa de levadura PJ69-4A (Tabla 1), y el ADNc de la biblioteca de FT se transformó como sugiere el fabricante (Clontech, www.clontech.com). La selección se realizó en medio de agar mínimo sintético (SD), suplementado con una solución deficiente de aminoácidos Trp/leu o Trp/leu/His, pero que incluía 0,1 mM de 3-AT, o carecía de Trp, Leu, Ade e His, a 30°C durante 4 días. Se seleccionaron aproximadamente 3×10^4 colonias. Los plásmidos se aislaron de colonias de levadura positivas putativas y se secuenciaron. La interacción entre STO y HY5 (Jiang y col., 2012) se utilizó como control positivo, y *pBDLeu* o *pDEST32-AtHB Δ AHA* con el vector *pEXP-AD502* vacío (Invitrogen) como control negativo. Las interacciones se confirmaron por cotransformación en PJ69-4A con diferentes concentraciones de 3-AT.

3.2.6.2 Cultivo y transformación de levaduras:

Se cultivaron células de *Saccharomyces cerevisiae* AH109 o Y187 (Clontech) en YPDA, o medio mínimo sintético (SD) complementado con una solución deficiente en los aminoácidos Trp o Leu/Trp (Sherman y Wakem, 1991). Las células de levadura se cotransformaron para los ensayos de doble híbrido con las construcciones indicadas en las figuras siguiendo el método del acetato de litio (Gietz y col., 1992). Las células transformadas AH109 o Y187 se seleccionaron para la auxotrofia Trp o Leu/Trp en medio SD, respectivamente. La actividad de β -galactosidasa usando ONPG como sustrato se midió como se describe en (Capella y col., 2014).

3.2.6.3 Evaluación de la transactivación en levaduras:

La activación transcripcional en levaduras fue determinada midiendo la actividad de la β -galactosidasa usando O-nitrofenil-b-D-galactopiranosido (ONPG) como sustrato como se describe en Capella y col., 2014; o evaluando la capacidad de crecimiento en medio libre de His, como sugiere el fabricante (Clontech).

Todos los ensayos de levaduras, tanto la búsqueda de *partners* candidatos mediante doble híbrido en levadura como la confirmación de las interacciones, fueron realizados en el laboratorio del Dr. Hong (*Plant Molecular Biology and Biotechnology Research Center, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam*), en la República de Corea.

RESULTADOS

*"Si buscas resultados distintos,
no hagas siempre lo mismo."*

Albert Einstein.

4. RESULTADOS:

4.1 Los factores de transcripción AtHB23, AtMYB68 y AtPHL1 interaccionan en el núcleo de células vegetales

La divergencia funcional y la neo-funcionalización de los miembros de la familia HD-Zip I pueden explicarse por la presencia de diferentes motivos en sus extremos N- y C-terminales (Arce y col., 2011). Estos motivos podrían interactuar con otros presentes en proteínas funcionales específicas, probablemente factores de transcripción (FT) (Arce y col., 2011, Capella y col., 2015). Para identificar *partners* putativos, realizamos un *screening* mediante doble híbrido en levaduras usando AtHB23 como carnada contra una biblioteca de FT de Arabidopsis. La construcción de AtHB23 utilizada carecía de su dominio de activación AHA (*AtHB23ΔAHA*) para evitar falsos positivos, ya que el ADNc completo de *AtHB23* mostró una alta actividad transcripcional en levaduras (Capella y col., 2015). Este enfoque permitió la identificación de cuatro FT como posibles proteínas interactuantes de AtHB23: *AtPHR1-like1* (*AtPHL1*, At5g29000), *AtMYB12* (At2g47460), *AtMYB68* (At5g65890) y *AtWRKY43* (At2g46130). Para validar la interacción de AtHB23 con estos candidatos, los ADNc de *AtPHL1*, *AtMYB12*, *AtMYB68*, *AtWRKY43* y *AtHB23* se clonaron como fusiones con el dominio de activación (AD) o de unión (BD) de GAL4, respectivamente, en vectores adecuados para la cotransformación de levaduras. Se hicieron ensayos independientes de Y2H, que permitieron corroborar las interacciones de AtHB23 con *AtPHL1* y *AtMYB68* (Figura 17 a y b).

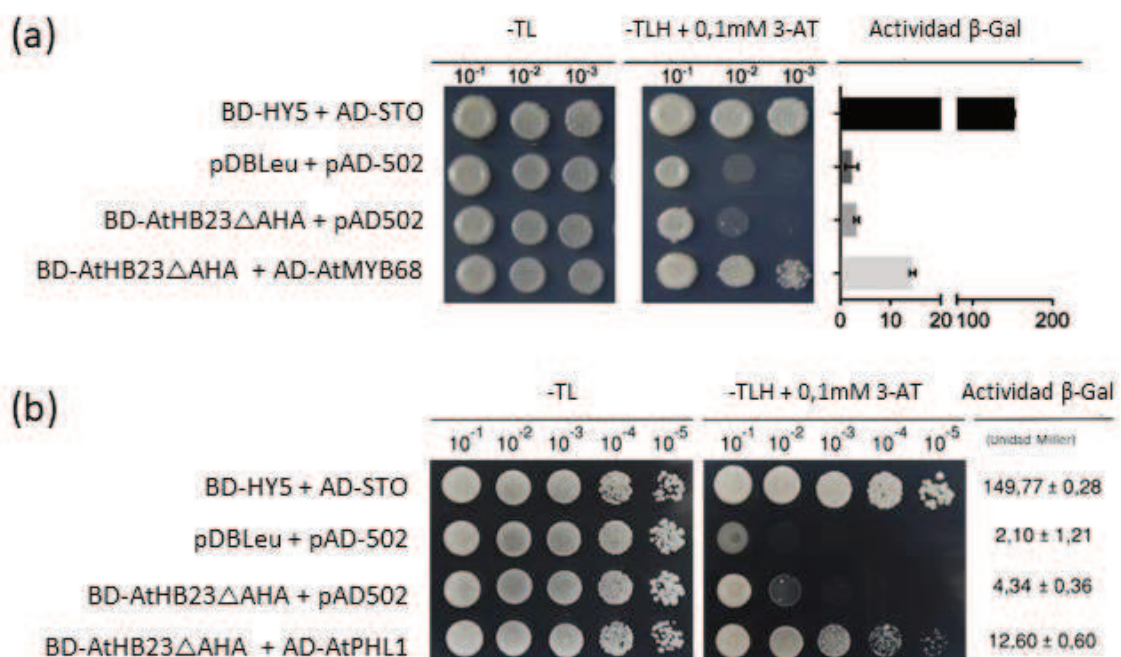


Figura 17. AtHB23 interactúa con AtPHL1 y AtMYB68 en levaduras. Ensayo Y2H para verificar interacción entre AtHB23 y AtMYB68 (a) y AtHB23 y AtPHL1 (b). Panel izquierdo: ensayo Y2H con las construcciones genéticas indicadas en un medio selectivo de baja rigurosidad (-TL significa -Trp -Leu). Panel central: lo mismo en un medio astringente (-TLH significa -Trp -Leu - His +0,1 mM 3-amino-1,2,4-triazol, 3AT). AD: dominio de activación; BD: dominio de unión. Panel derecho: cuantificación de la actividad de β -galactosidasa en unidades Miller.

Con el objeto de investigar si la interacción también se producía en plantas, se realizaron construcciones adecuadas para transformar en forma transitoria hojas de tabaco que se analizaron utilizando microscopía confocal. Las construcciones genéticas generadas (ver Métodos) eran capaces de expresar las proteínas AtHB23, AtPHL1 y AtMYB68 fusionadas a Cherry, RFP o GFP. El primer estudio indicó, como era esperado, que las tres proteínas se localizan en el núcleo (Figura 18).

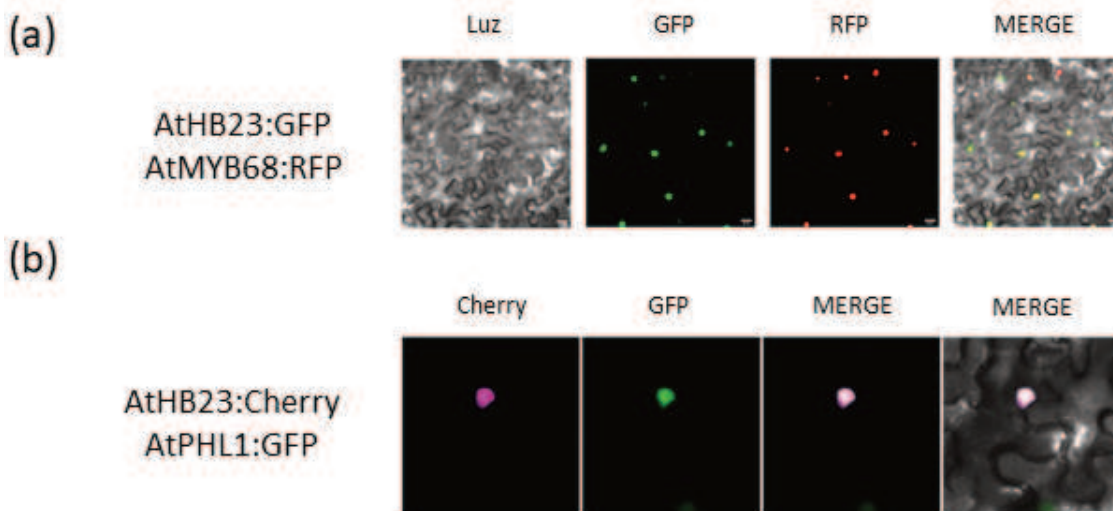


Figura 18. AtHB23 colocaliza con AtPHL1 y AtMYB68 en el núcleo de células vegetales. Expresión transitoria de *AtHB23:GFP* (verde) y *AtMYB68:RFP* (rojo) en células foliares de *Nicotiana benthamiana* transformadas transitoriamente (a), y de *AtHB23:Cherry* (magenta) y *AtPHL1:GFP* (verde, b). Cada panel representa una imagen fluorescente de una sola muestra de luz transmitida (luz), GFP, RFP, Cherry o fluorescencia fusionada (MERGE).

Los ensayos de interacción de AtHB23 con AtPHL1 y AtMYB68 de la familia MYB se hicieron por complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC) (Figura 19). Los ADNc correspondientes se fusionaron con los extremos N- o C- terminal de las proteínas fluorescentes Venus (YFP, Figura 19a) o mCitrine (Figura 19 b y c). Los análisis de microscopía confocal indicaron que estas proteínas interactúan en el núcleo de células vegetales (Figura 19a).

Para definir si la interacción de estos FT de tipo MYB era específica con AtHB23, se evaluó su interacción con el parálogo putativo de AtHB23, AtHB13. Aun localizándose en el núcleo, AtHB13 no interactúa con AtPHL1 (Figura 19b), lo que sugiere que la unión de AtHB23 con

AtPHL1 es específica, al menos en las condiciones analizadas. Para el caso de AtMYB68, el control negativo fue realizado con el vector vacío (Figura 19c).

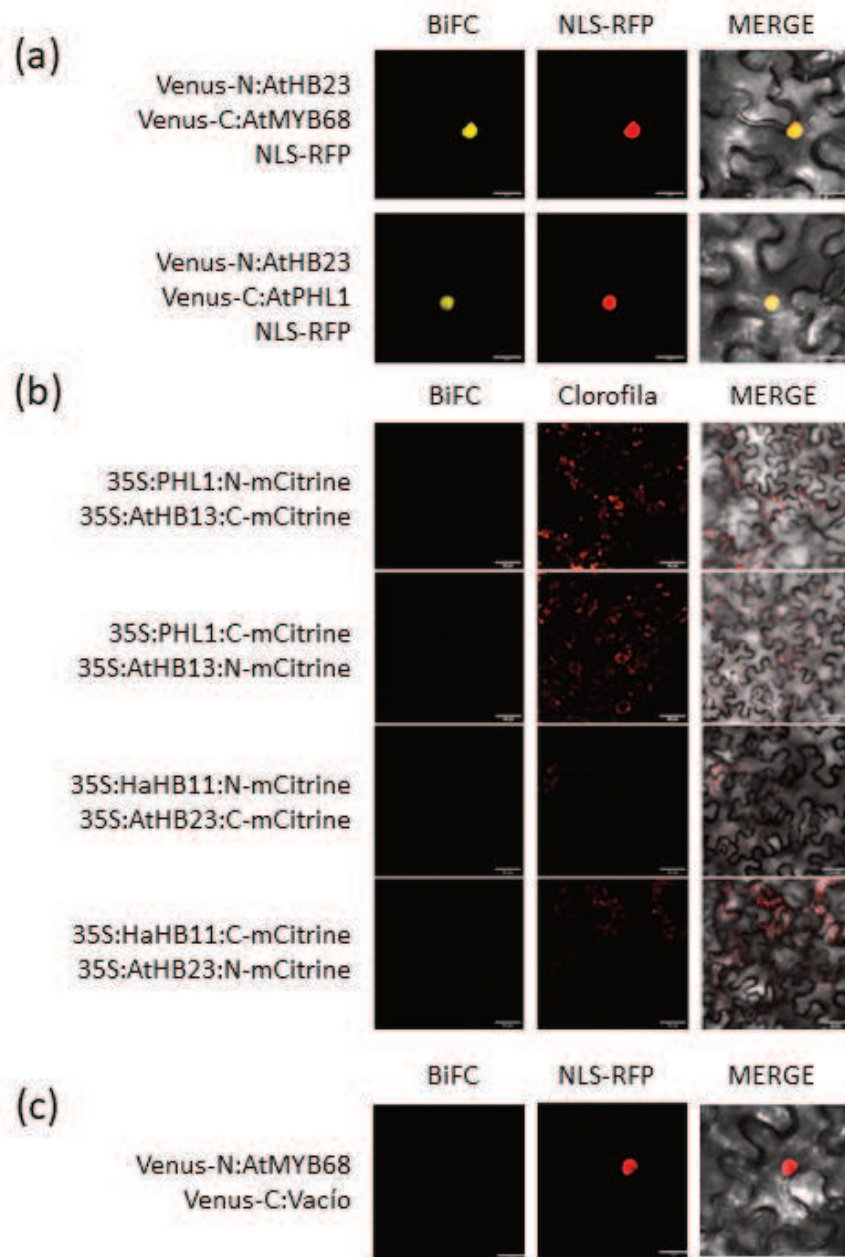


Figura 19. AtHB23 interacciona con AtPHL1 y AtMYB68 en el núcleo de células vegetales. Análisis BiFC de la interacción proteína-proteína entre AtHB23, AtMYB68 y AtPHL1, para lo cual se emplearon construcciones genéticas donde se fusionaron las mitades N y C terminal del gen codificante de la proteína reportera Venus (proteína fluorescente amarilla) a las regiones codificantes de los genes en estudio (a), utilizando hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas. Se muestran las combinaciones indicadas en cada figura. El control negativo fue hecho con AtHB13 y HaHB11 para AtPHL1 y AtHB23, respectivamente, empleando en estos casos la proteína reportera mCitrine (proteína fluorescente amarilla, b) y con el vector vacío para AtMYB68, empleándose en este caso la proteína reportera Venus (c). Como controles adicionales, se emplearon una región de localización nuclear NLS (*Nuclear localization signal*) como fusión a RFP (proteína fluorescente roja) y la fluorescencia intrínseca de la clorofila (rojo).

4.2 AtPHL1 y AtMYB68 también interactúan entre sí

Dado que las relaciones establecidas eran independientes, AtHB23 con AtMYB68 o con AtPHL1, nos preguntamos si AtMYB68 y AtPHL1 interactuaban entre ellos. Para contestar esta pregunta hicimos un Y2H entre Gal4BD-AtMYB68 y Gal4BD-AtPHL1, el cual desafortunadamente no tuvo éxito dado que Gal4BD-AtMYB68 y Gal4BD-AtPHL1 mostraron fuertes actividades de transactivación en levaduras. Por lo tanto, realizamos un ensayo BiFC usando las mitades N y C terminal de la proteína fluorescente Venus fusionadas a AtPHL1 y AtMYB68. Este ensayo arrojó resultados positivos (Figura 20a), lo cual demuestra que las proteínas socias de AtHB23 son también capaces de interactuar entre sí en el núcleo de células vegetales. Luego, realizamos ensayos de coimmunoprecipitación para confirmar los resultados obtenidos por un método independiente (Figura 20b). Para ello, se transformaron de manera transitoria plantas de tabaco con las construcciones *MYC-AtHB23* y *HA-AtMYB68*, y por otro lado con las construcciones *MYC-AtHB23* y *HA-AtPHL1*. Los extractos de proteínas totales de estas plantas se trataron con anticuerpos anti-MYC (Figura 20b, panel izquierdo). Ambos pares de proteínas coimmunoprecipitaron, lo que respaldó los resultados descritos anteriormente (Figura 20b).

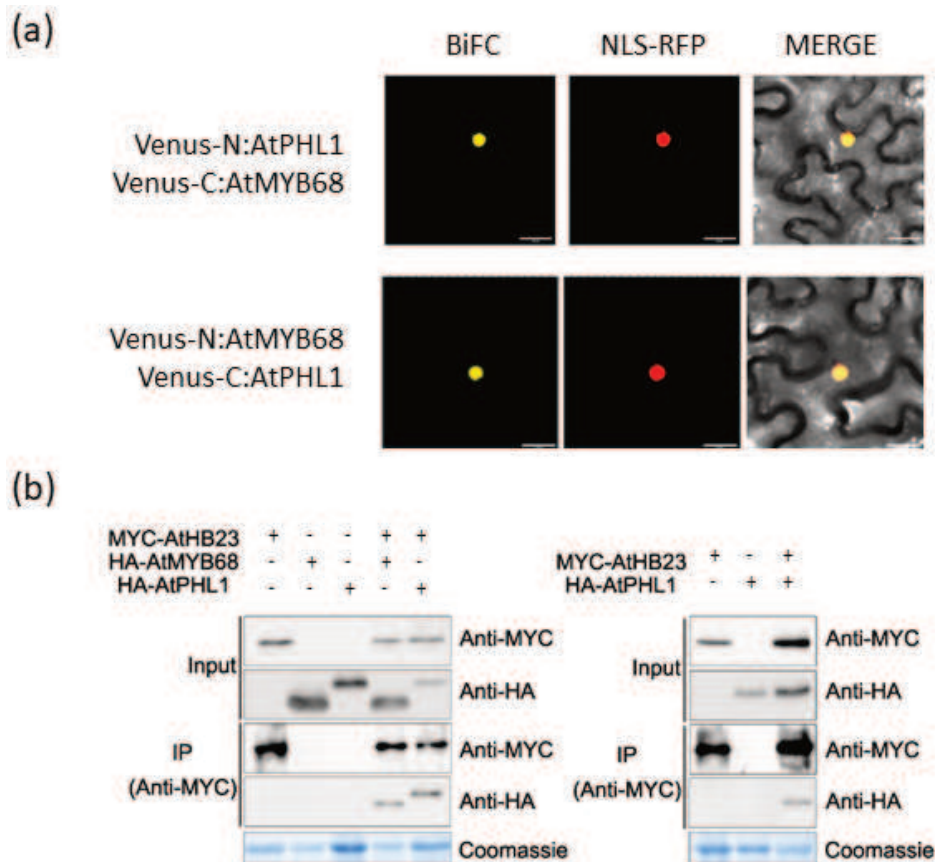


Figura 20. Los factores de transcripción AtHB23, AtMYB68 y AtPHL1 interactúan entre sí en todas las combinaciones. (a) Análisis BiFC de la interacción proteína-proteína entre AtMYB68 y AtPHL1 utilizando hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas. Se muestran las combinaciones indicadas en cada figura. (b) Ensayo de coinmunoprecipitación *in vivo*. La proteína AtHB23, la cual se expresa como fusión a la proteína *tag* MYC (MYC-AtHB23), coexpresa con AtMYB68 (HA-AtMYB68) y AtPHL1 (HA-AtPHL1). El panel derecho muestra la interacción entre MYC-AtHB23 y HA-AtPHL1.

4.3 Los patrones de expresión de AtHB23 y AtPHL1 se solapan en los nodos pedicelo-silicua y en funículos

El patrón de expresión de *AtHB23* ya se ha estudiado en profundidad (Perotti y col., 2019), pero la mayoría de los estudios sobre este FT se centraron específicamente en el sistema radicular (Perotti y col., 2019, 2022).

Para investigar en qué tejidos y etapas de desarrollo *AtHB23* interactuaría con *AtPHL1*, se analizó en primer lugar el patrón de expresión de *AtPHL1*. Para ello, se clonó una región de 1791 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción de *AtPHL1*, dirigiendo la expresión de los genes reporteros *GFP* y *GUS*. Previamente, se había obtenido una construcción similar con la región promotora de *AtHB23* (Perotti y col., 2019 y 2020). Las plantas de *Arabidopsis* transformadas con el promotor de *AtPHL1* (*prAtPHL1:GUS*) se analizaron mediante ensayos de histoquímica (Figura 21).

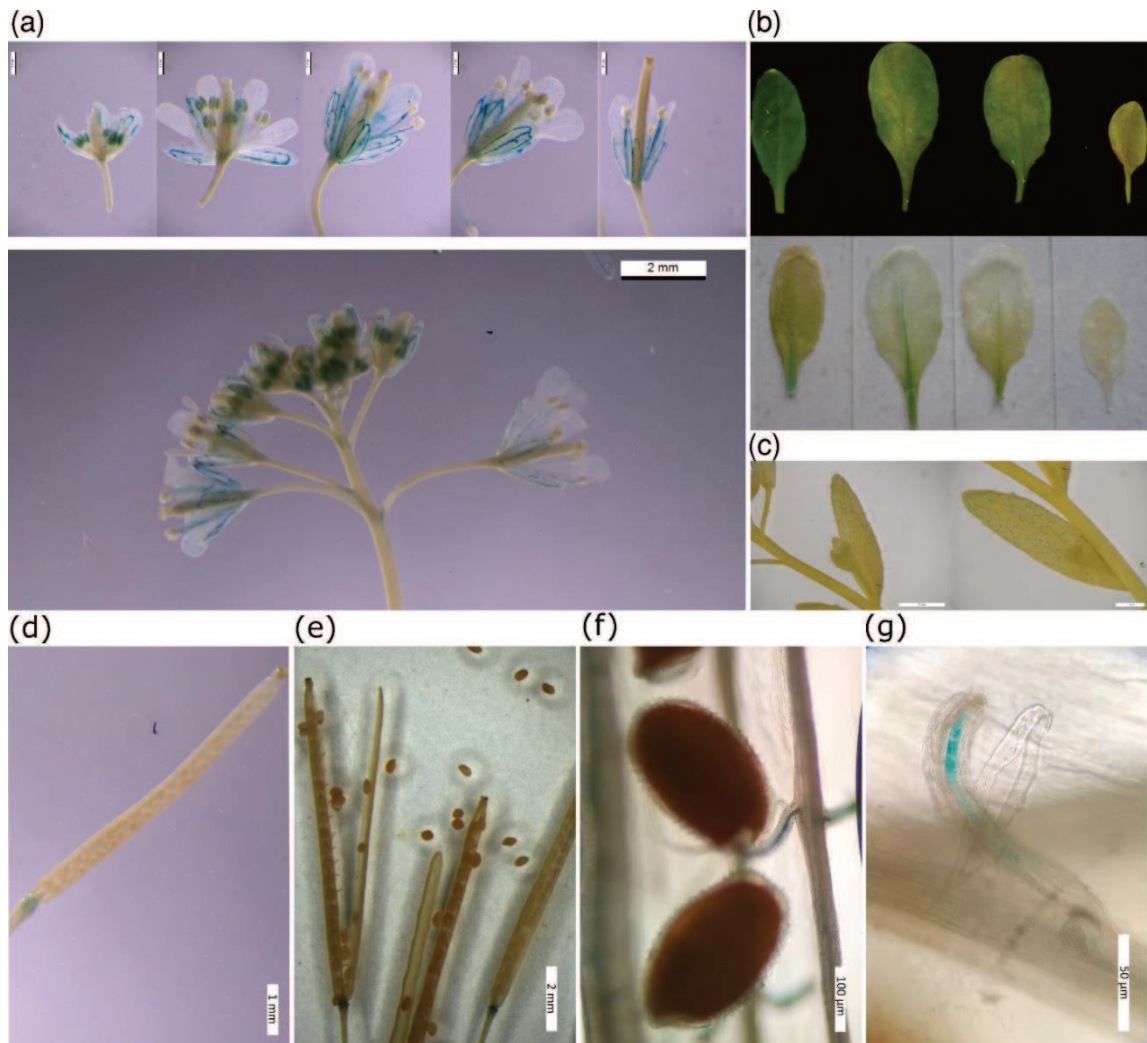


Figura 21. Patrón de expresión de *AtPHL1* en plantas crecidas en tierra. Imágenes ilustrativas de la expresión de GUS, evaluadas mediante ensayos histoquímicos, impulsadas por el promotor de *AtPHL1* en plantas de 45 días. Las plantas se crecieron en tierra en condiciones de día largo. Se muestran imágenes de flores en diferentes estadios de desarrollo (a), hojas de roseta (b), hojas caulinares (c), nodos pedicelo-silicua (d), silicuas abiertas (e y f) y funículos (f y g). La escala se indica en cada imagen.

Los resultados muestran expresión de la proteína reportera GUS bajo el control del promotor de *AtPHL1* en diferentes tejidos de la planta adulta: flores en diferentes estadios de desarrollo, específicamente en sépalos (Figura 21a), sistema vascular de hojas de roseta y caulinares (Figura 21 b y c), nodos pedicelo-silicua (Figura 21e) y por último en funículos (Figura 21g), considerado este último como un tejido particularmente importante para el transporte de nutrientes a las semillas.

Dada la particular expresión de *AtPHL1* en regiones específicas de las silicuas de *Arabidopsis*, nos preguntamos si *AtHB23* podría ejercer alguna función específica, asociada a *AtPHL1*, en estos tejidos de la planta. Para responder esta pregunta, se analizó el patrón de expresión de plantas transformadas con una región del promotor de *AtHB23* dirigiendo la expresión de *GUS* (*prAtHB23:GUS*). Los resultados de estos ensayos de histoquímica se muestran en la figura 22, en la que se puede apreciar expresión de *AtHB23* en los nodos pedicelo-silicua (Figura 22 a y b) y en funículos (Figura 22 c y d) de plantas adultas de 45 días de edad crecidas en condiciones normales, coincidente con lo visto para *AtPHL1*. Estos resultados sugirieron la posibilidad de un papel coordinado de ambos FT en estos tejidos.

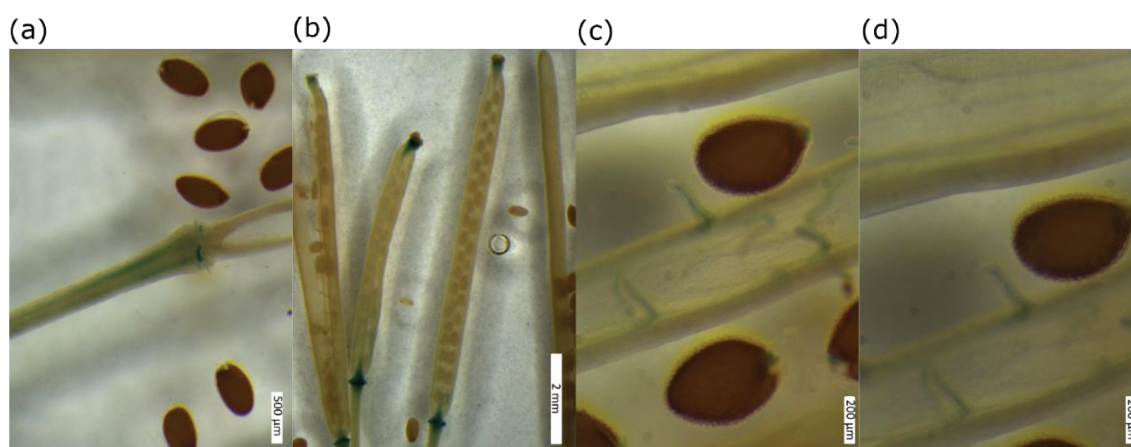


Figura 22. *AtHB23* se expresa en los nodos pedicelo-silicua y funículos. Imágenes ilustrativas de la expresión de *GUS*, evaluadas mediante ensayos histoquímicos, impulsada por el promotor de *AtHB23* en plantas de 45 días. Las plantas se cultivaron en macetas en condiciones de día largo. (a), (b), (e) y (f) son nodos pedicelo-silicua, mientras que (c), (d), (g) y (h) son funículos. La escala se indica en cada imagen, y va desde 50 µm a 2 mm.

4.4 *AtPHL1* y *AtHB23* inhiben la formación del botón floral y la apertura de silicuas

Para investigar las funciones de *AtPHL1* y *AtHB23* durante el desarrollo, se obtuvieron plantas mutantes y sobreexpresantes. Para *AtPHL1*, estaban disponibles en el repositorio ABRC dos mutantes de inserción con T-DNA independientes a partir de las cuales se generaron líneas homocigotas. En la figura 23a se muestra un esquema que indica los sitios de inserción de las mutantes *phl1-1* y *phl1-2*. Para *AtHB23*, utilizamos líneas silenciadas *amiR23-1* descritas anteriormente, ya que no hay mutantes disponibles (Perotti y col., 2019 y 2020). Las plantas sobreexpresantes de *AtPHL1* se crearon utilizando la construcción *35S:AtPHL1*, y se seleccionaron tres líneas que mostraban diferentes niveles de expresión. Los niveles de expresión de las diferentes líneas homocigotas *ATPHL1* se muestran en la Figura 24. Las plantas de todos estos genotipos se cultivaron en tierra y se evaluaron sus características durante el desarrollo. La morfología y la arquitectura, incluida la cantidad de hojas en roseta,

no difirieron entre las mutantes *phl1* y las silenciadas *amiR23*, comparadas con sus controles en las primeras etapas vegetativas (Figura 23b). Sin embargo, las mutantes *phl1* y las silenciadas *amiR23* entraron en *bolting* un día antes que los controles, aunque las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas (Figura 23c). Más tarde, el número de silicuas abiertas varió significativamente entre mutantes *phl1*, silenciadas *amiR23* y plantas Col 0 (Figura 23d). Aunque la tasa de apertura de silicuas mostró un comportamiento similar entre los diferentes genotipos estudiados, tanto las plantas mutantes *phl1* como las silenciadas *amiR23* presentaron más silicuas abiertas que las plantas Col 0 49 días después del *bolting*, y esta diferencia se mantuvo hasta el día 55 (Figura 23d), mientras que las plantas sobreexpresantes no mostraron ninguna diferencia significativa (Figura 31c). No se detectaron diferencias entre los genotipos estudiados en el número de semillas por silicua y el rendimiento total de semillas por planta (Figura 31a). Estas observaciones nos permitieron inferir que ambos FT modularían el tiempo de apertura de las silicuas, y aquellas plantas en las que estos genes se encuentran mutados presentan una apertura de silicuas prematura en comparación con las plantas control Col 0.

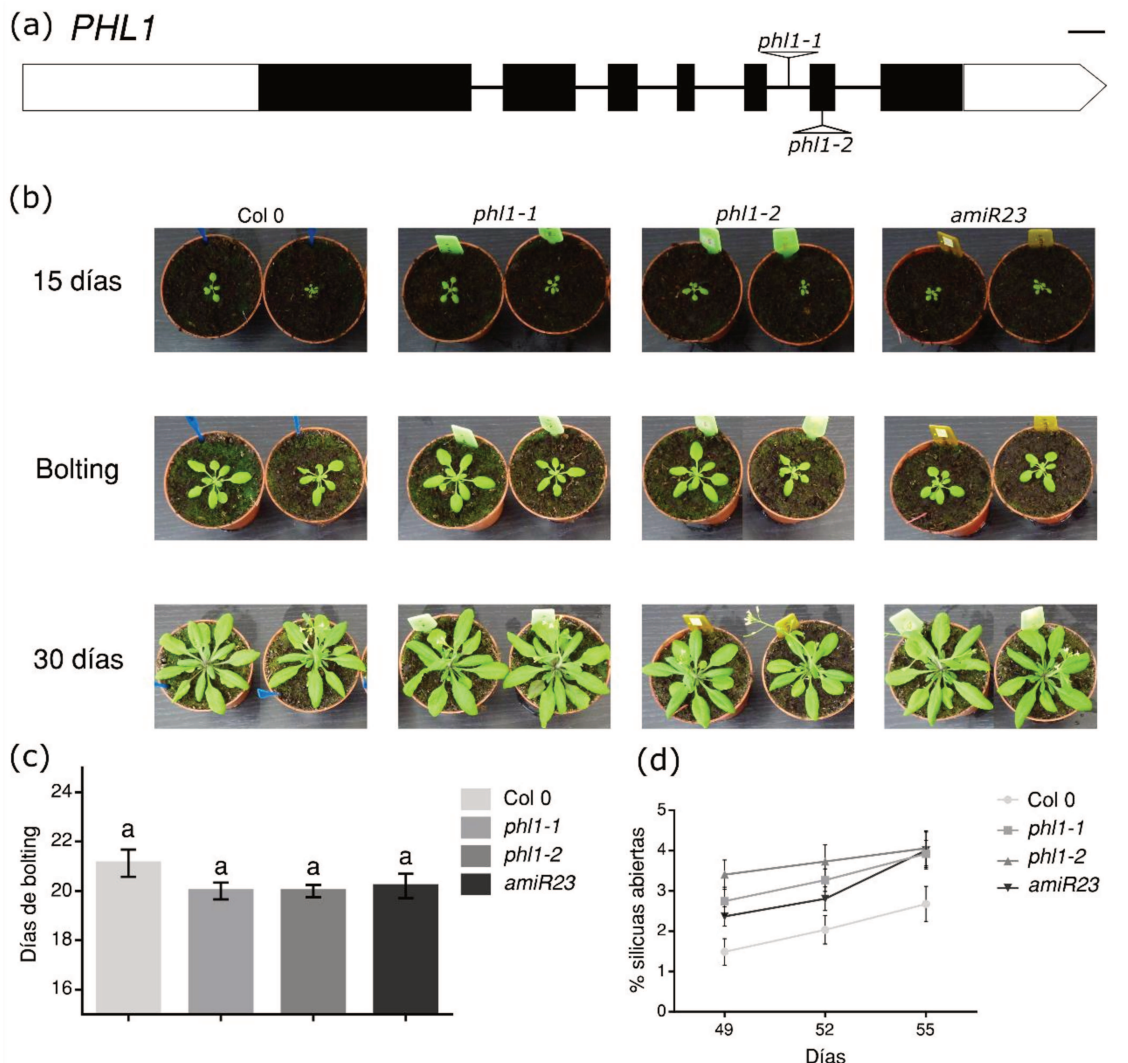


Figura 23. AtHB23 y AtPHL1 están involucrados en la determinación del día de *bolting* y en la apertura de silicuas. (a) Representación esquemática del gen *AtPHL1*, en la que se indica el sitio de inserción para las mutantes *phl1-1* y *phl1-2*. (b) Imágenes ilustrativas de plantas Col 0 (A), mutantes *phl1* (B, C) y silenciadas *amiR23* (D) en diferentes etapas de desarrollo (15 días de edad, etapa de *bolting* y plantas de 30 días de edad). Se cultivó una planta en cada maceta en tierra en condiciones de día largo. (c) Días desde la siembra hasta el *bolting* para cada genotipo. (d) Porcentaje de silicuas abiertas a diferentes días después de la siembra. Cada experimento se realizó con 10 plantas por genotipo y se repitió al menos tres veces. Las barras de error representan SEM. Las diferentes letras indican que hay diferencias significativas según la prueba *post-hoc* de Tukey.

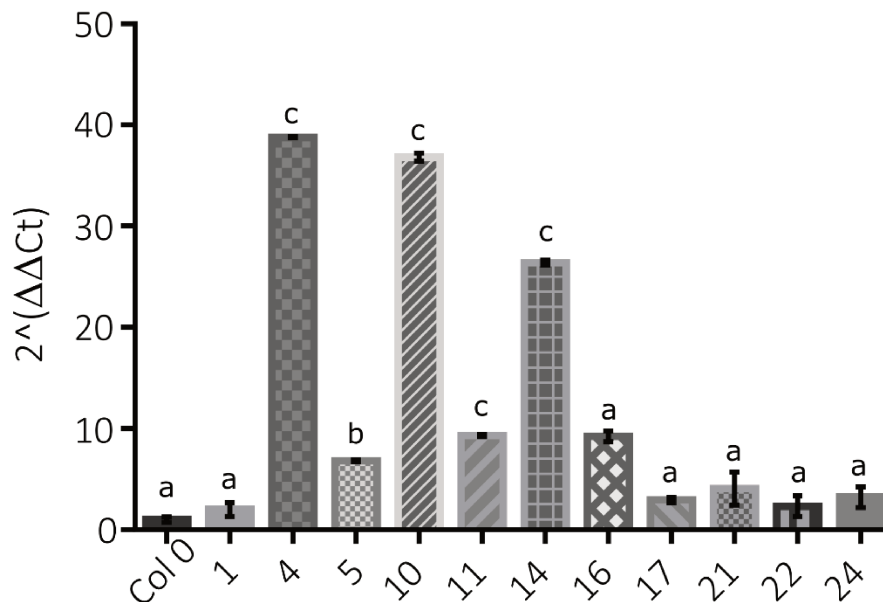


Figura 24. Niveles de expresión de líneas sobreexpresantes independientes de AtPHL1. Niveles de transcripción medidos por RT-qPCR del gen *PHL1* en muestras de ARN de hojas de roseta, tomados de plantas de 40 días de edad de plantas Col 0 y sobreexpresantes ATPHL1 (11 líneas independientes). Las barras representan SEM. Las diferencias significativas se indican con letras diferentes, según la prueba *post-hoc* de Tukey.

4.5 El contenido lipídico está reducido en semillas de plantas *phl1* y *amiR23*

Dado que se detectó coexpresión de *AtHB23* y *AtPHL1* en dos tejidos de transporte (Figuras 21 y 22), nos preguntamos si la composición de las semillas podría verse alterada por la ausencia de estos FT. Para ello, cuantificamos los niveles de sacarosa, glucosa, almidón, proteínas y lípidos en semillas de plantas Col 0 y mutantes. Si bien los contenidos de carbohidratos y proteínas fueron similares entre los genotipos (Figura 25 a y b), los lípidos totales fueron significativamente más bajos en las mutantes *phl1* y *amiR23* que en los controles (Figura 25c). A pesar de esta reducción, la composición de los lípidos no fue diferente entre los genotipos (Tabla 6). Esta reducción (sin cambios en la composición lipídica) sugirió la existencia de un problema en la disponibilidad de sustrato (carbohidratos) en lugar de una deficiencia en una ruta específica de biosíntesis de lípidos.

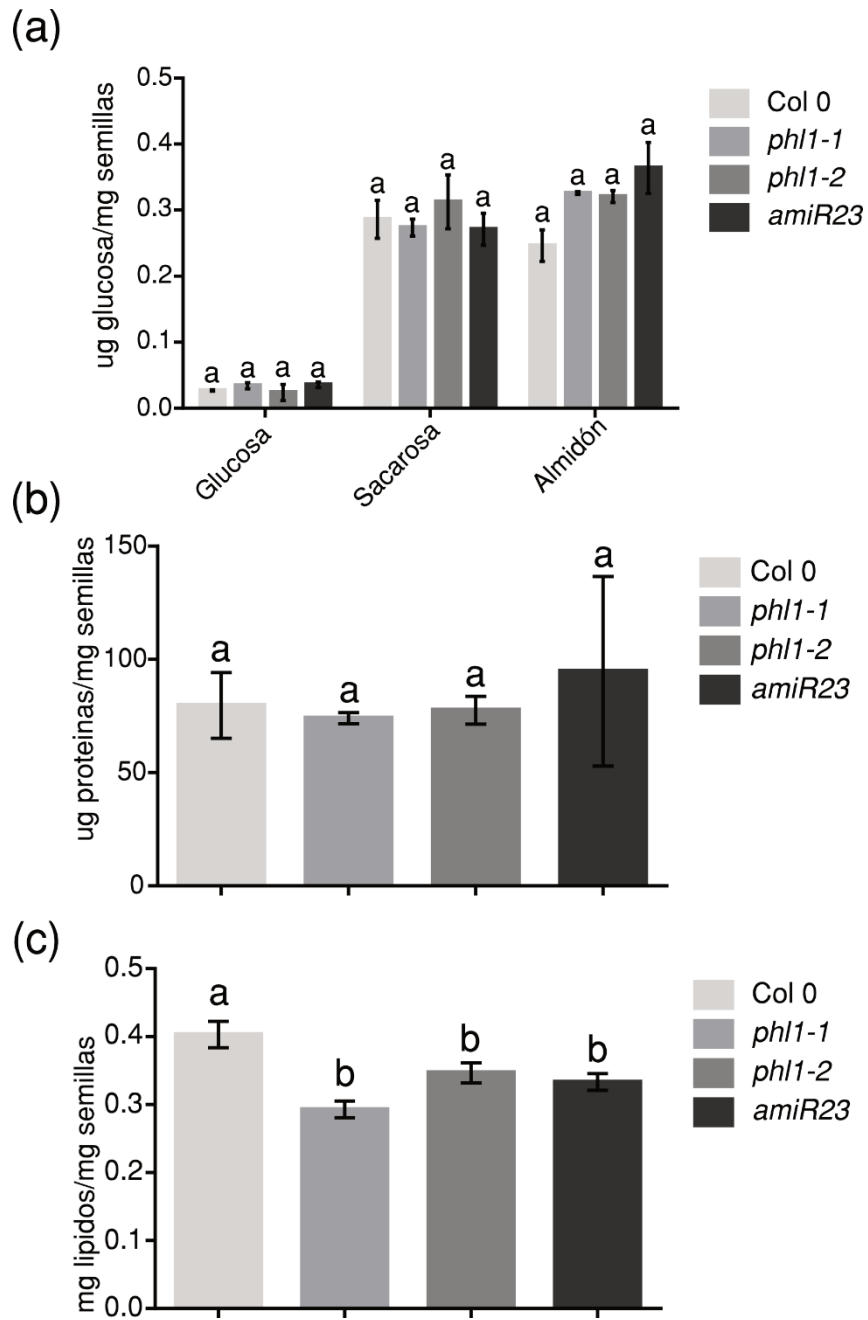


Figura 25. Plantas silenciadas *amiR23* y mutantes *phl1* presentan una disminución significativa en el contenido de lípidos de las semillas maduras. Los carbohidratos, proteínas y lípidos totales se evaluaron en semillas de *amiR23* silenciadas y 2 líneas mutantes de *phl1* independientes (*phl1-1* y *phl1-2*), así como en plantas control Col 0. Las barras de error representan SEM. Las diferencias significativas se indican con letras diferentes, según la prueba *post-hoc* de Tukey.

Tabla 6. La composición de lípidos es similar entre plantas mutantes *phl1*, silenciadas *amiR23* y Col 0.

Composición de especies moleculares de 14 triacilglicéridos de semillas secas				
Especies moleculares de TAG	Col 0	<i>phl1-1</i>	<i>phl1-2</i>	<i>amiR23</i>
Palmitico (16:0)	7,9 ± 0,9	7,3 ± 0,1	7,22 ± 0,02	7,2 ± 0,1
Palmitoleico (9c-16:1)	0,3 ± 0,3	0,17 ± 0,02	0,18 ± 0,04	0,19 ± 0,04
Stearico (18:0)	3,3 ± 0,3	3,1 ± 0,1	3,2 ± 0,1	3,1 ± 0,2
Oleico (9c-18:1)	15,7 ± 1	15,5 ± 0,1	15 ± 1	14,6 ± 0,5
Octadecenoico (11c-18:1)	1,3 ± 0,2	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,9	1,3 ± 0,1
Linoleico (9c,12c-18:2)	29,5 ± 0,3	29,2 ± 0,2	29,7 ± 0,4	29,3 ± 0,2
Linolenico (9c,12c,15c-18:3)	15,9 ± 0,9	16,0 ± 0,1	16,2 ± 0,6	16,5 ± 0,4
Eicosenoico (11c-20:1)	18,2 ± 0,9	19,4 ± 0,3	19,3 ± 0,5	19,5 ± 0,3
Eicosadienoico (11c,14c-20:2)	1,4 ± 0,2	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1
Behenico (22:0)	1,7 ± 0,2	1,65 ± 0,04	1,7 ± 0,1	1,8 ± 0,1
Eicosatrienoico (11c,14c,17c-20:3)	0,4 ± 0,1	0,32 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,36 ± 0,03
Docosaenoico (13c-22:1)	1,5 ± 0,1	1,58 ± 0,04	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,1
Tetracosanoico (24:0)	0,16 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,13 ± 0,04	0,15 ± 0,02
Docosatetraenoico (7c,10c,13c,16c-22:4)	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,13 ± 0,04	0,16 ± 0,01

Tabla 6. Los datos son la media expresada como % de ésteres metílicos ± DE.

4.6 Las plantas mutantes *phl1*, *amiR23* y *phl1xamiR23* transportan más lentamente carbohidratos desde los pedicelos hacia las silicuas

Nos preguntamos cuál sería la causa de la reducción del contenido de lípidos en las semillas mutantes *phl1* y silenciadas *amiR23*, para lo cual planteamos la hipótesis de que podría deberse a un transporte enlentecido de carbohidratos, específicamente de sacarosa, desde los tejidos fuente hacia las silicuas. Para evaluar si el transporte de carbohidratos se veía realmente afectado, usamos la sonda fluorescente CFDA (diacetato de 5(6)-carboxifluoresceína) en mutantes *phl1* y *amiR23*. Se cortaron silicuas de los genotipos estudiados y se sumergieron los pedicelos en una solución de CFDA (ver sección 3.2, métodos). Después de cierto tiempo, se visualizó y fotografió la fluorescencia del marcador. Encontramos que la sonda CFDA se movió desde la base hasta la silicua completa en plantas Col 0, mientras

que permaneció en la parte inferior en plantas mutantes, considerando el mismo período de tiempo (Figura 26a). A tiempos más largos, todos los genotipos mostraron un comportamiento similar. Estos resultados indicaron que se requieren tanto AtPHL1 como AtHB23 para el transporte correcto y coordinado de carbohidratos. La doble mutante *phl1xamiR23* presentó el mismo patrón (o incluso un poco más pronunciado) que las mutantes simples (Figura 26b), lo que permitió sugerir que AtPHL1 y AtHB23 actúan juntos.

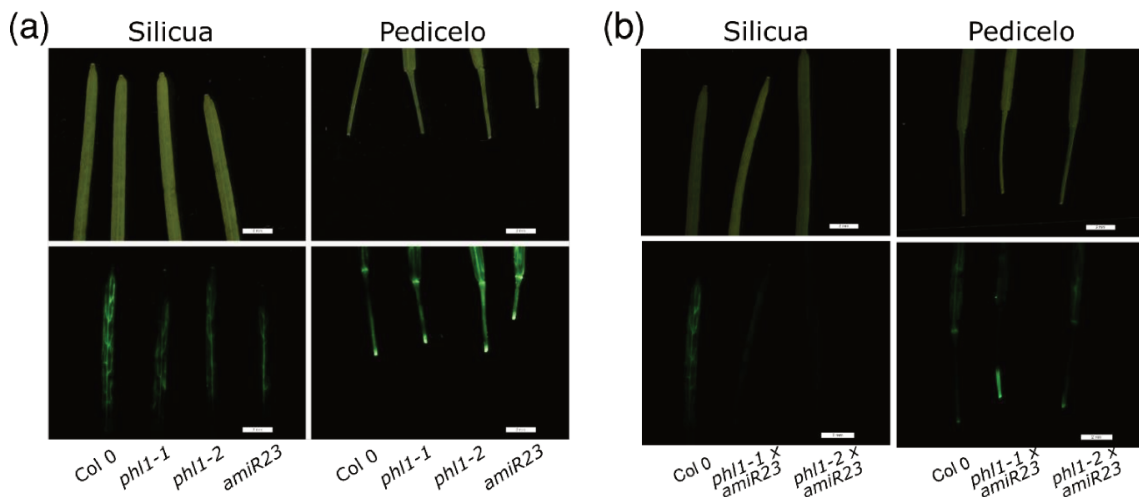


Figura 26. Las plantas mutantes *phl1*, silenciadas *amiR23* y doble mutantes *phl1xamiR23* tienen un transporte de carbohidratos defectuoso. (a y b) Imágenes ilustrativas de silicuas (izquierda) y pedicelos (derecha) de plantas de 45 días sumergidas en una solución que contiene el marcador CFDA. Los paneles inferiores muestran fotografías tomadas con un microscopio fluorescente, 20 min después de iniciar el tratamiento. Los genotipos utilizados para el análisis fueron Col 0, *phl1-1*, *phl1-2*, *amiR23* (a), y *phl1-1xamiR23* y *phl1-2xamiR23* (b).

Dado que AtHB13 es parálogo de AtHB23, y que además ha sido estudiado en tejidos aéreos como tallo y polen (Ribone y col., 2015), se evaluó el transporte en silicuas de plantas mutantes *athb13* a modo de control. Para completar el estudio, se sumaron también silicuas de plantas sobreexpresantes de *AtHB23* (AT23) y de *AtPHL1* (ATPHL1). En las imágenes obtenidas no se observaron defectos en el transporte de carbohidratos, ni en las mutantes *athb13* (Figura 27a) ni en ninguna de las sobreexpresantes (ATHB23 y ATPHL1, Figura 27b). Todos estos genotipos fueron indistinguibles de las plantas control Col 0 para la característica de transporte (Figura 27b). No se puede descartar que este ensayo está limitado por los tiempos cortos de medida que impiden visualizar diferencias para aquellas que transportan sin problemas pronunciados.

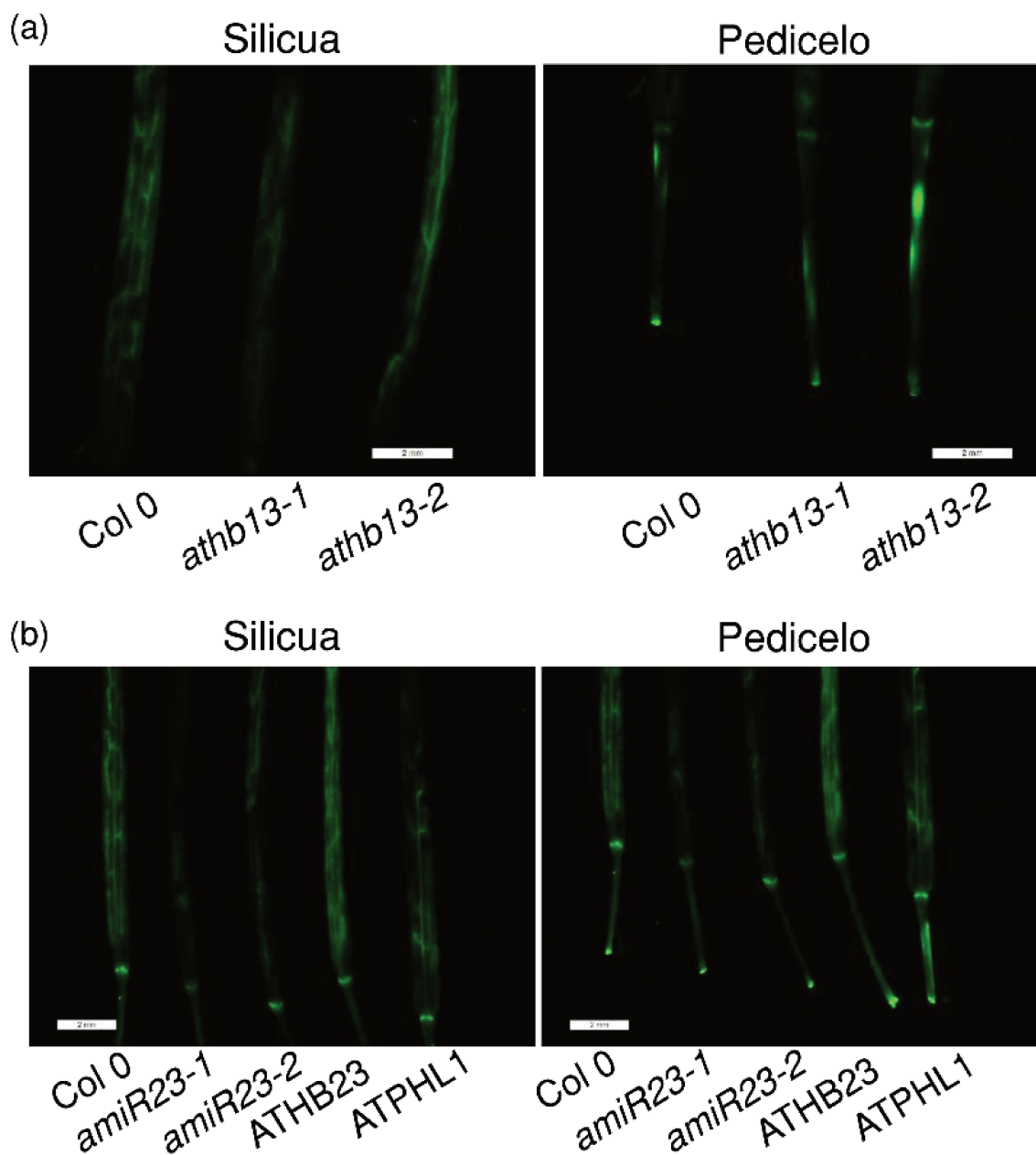


Figura 27. El transporte de carbohidratos no se ve alterado en plantas mutantes *athb13* ni en sobreexpresantes *ATPHL1* y *ATHB23*. (a y b) Imágenes ilustrativas de silicuas (paneles a la derecha) y pedicelos (paneles a la izquierda) de plantas de 45 días sumergidas en una solución que contiene el marcador CFDA. Las fotografías se tomaron con un microscopio fluorescente 20 min después de iniciar el tratamiento. Los genotipos utilizados para el análisis fueron Col 0, *athb13-1* y *athb13-2* (a), y *amiR23-1*, *amiR23-2*, *ATPHL1* y *ATHB23* (b).

Dado que los resultados demostraban que AtPHL1 y AtHB23 estarían involucrados en el transporte de carbohidratos hacia silicuas, nos preguntamos si el contenido de carbohidratos podría estar afectado en silicuas mutantes de estos genes en diferentes estadios a lo largo de su desarrollo. Para responder esta interrogante, evaluamos el contenido de glucosa, sacarosa y almidón en silicuas jóvenes y maduras, de 7 y 15 días post polinización (DPP) respectivamente, en los diferentes genotipos mutantes, *phl1* y *amiR23* (Figura 28). Los resultados mostraron que las silicuas jóvenes de 7 DPP, presentaban un contenido de glucosa significativamente más bajo (y también una tendencia constante a un contenido de sacarosa más bajo) que los controles de plantas Col 0 (Figura 28a). Estas observaciones sugirieron nuevamente un problema en el transporte de azúcares. Notoriamente, al llegar a la madurez, todas las silicuas presentaron un contenido similar de carbohidratos (Figura 28b), lo que indica que la reducción mostrada por las mutantes se produjo en una etapa específica del desarrollo de las silicuas y sugiere un problema de temporalidad o velocidad de transporte. Curiosamente, la doble mutante (*phl1xamiR23*) no mostró diferencias significativas en el contenido de carbohidratos de silicuas en comparación con las Col 0 (Figura 28 c y d). Este resultado fue un poco intrigante y tal vez pueda explicarse por algún mecanismo de compensación que se dispara cuando ninguna de las dos proteínas (AtHB23 y AtPHL1) está disponible. Otra posible explicación podría ser que estas cruza presentaron un índice de verdor aumentado (Figura 29c), lo cual podría explicar los contenidos similares de carbohidratos acumulados en las silicuas en estas plantas durante el período de verdor.

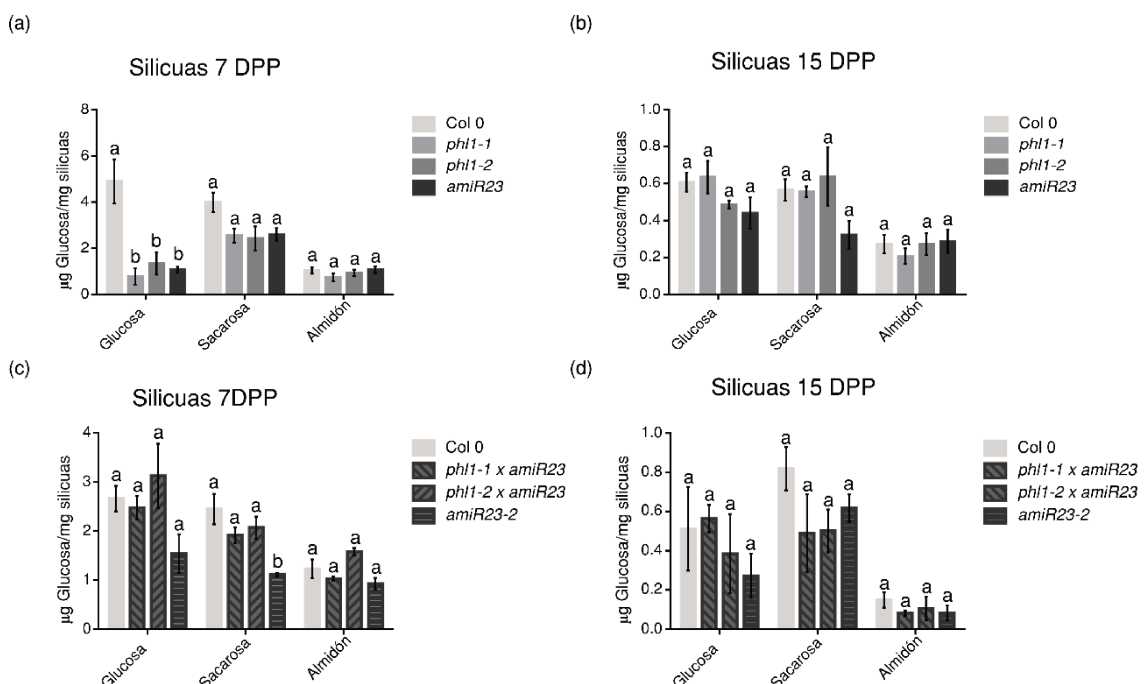


Figura 28. Las silicuas jóvenes de plantas mutantes *phl1* y *amiR23* presentan un menor contenido de glucosa y sacarosa, contrario a lo observado en la doble mutante *phl1xamiR23*. Niveles de

carbohidratos en silicuas de 7 DPP (días post polinización) y 15 DPP en plantas mutantes *phl1-1*, *phl1-2* y *amiR23* (a y b), y doble mutantes *phl1-1xamiR23* y *phl1-2xamiR23* (c y d). Las diferencias significativas se indican con letras diferentes, según el test *post-hoc* de Tukey.

Con el objetivo de caracterizar en profundidad los fenómenos observados en las plantas mutantes y poder asignar con mejor precisión un rol a los genes en estudio, se analizaron otros parámetros fisiológicos. Entre esas características se midió el índice de verdor y la biomasa de rosetas y tallos de plantas mutantes simples, *phl1* y *amiR23*, y dobles, *phl1xamiR23*. No observamos diferencias significativas entre estos genotipos en plantas de 28 y 41 días (Figura 29) en comparación con plantas control Col 0, lo que nos permitió inferir que sólo el contenido de lípidos en las semillas se ve afectado en las plantas *phl1* y *amiR23*.

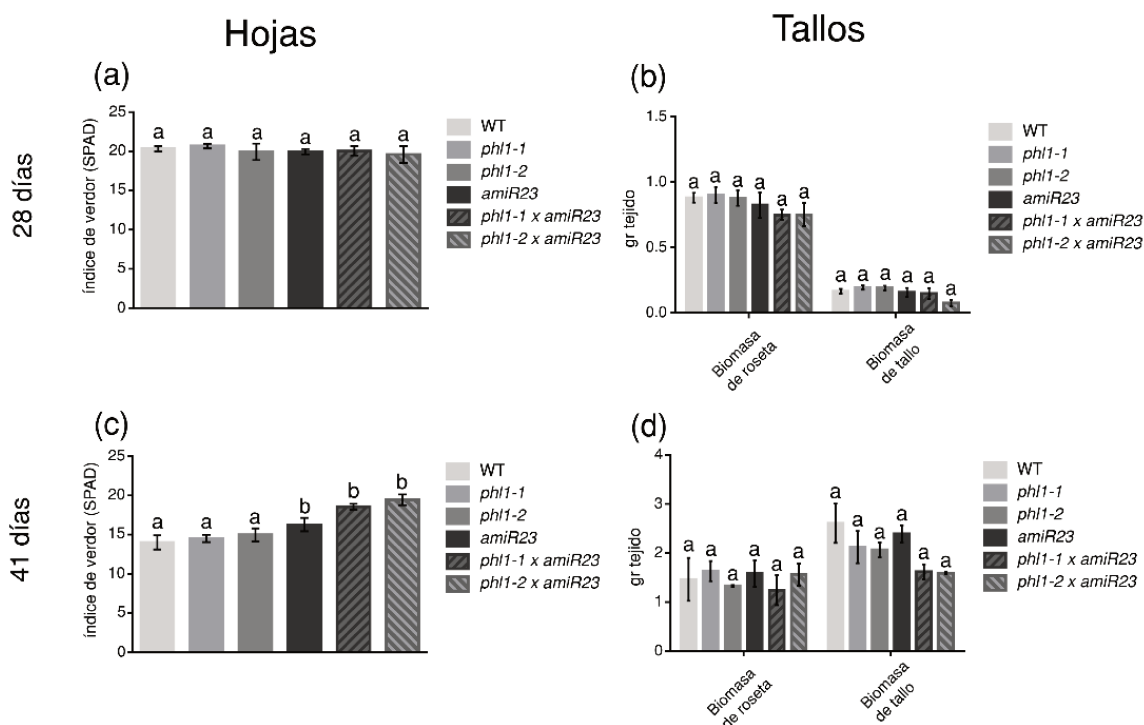


Figura 29. Las plantas mutantes *phl1*, silenciadas *amiR23* y doble mutantes *phl1xamiR23* no varían en el índice de verdor y la biomasa de hojas y tallos, en comparación con plantas Col 0. Niveles de índice de verdor en unidades SPAD (a y c). Niveles de biomasa de roseta y tallo en gramos de tejido (b y d). Las barras de error representan SEM. Las diferencias significativas se indican con letras diferentes, según la prueba *post-hoc* de Tukey.

Todos estos resultados en su conjunto sugieren que el transporte de carbohidratos se vería afectado por AtPHL1 y AtHB23, lo que redundaría en un menor contenido de lípidos en semillas de plantas mutantes *phl1* y *amiR23*.

4.7 Las mutantes *phl1*, *amiR23* y *phl1xamiR23* no presentan diferencias en el contenido de carbohidratos de sus tejidos fuente

Dado que las plantas mutantes *phl1* y *amiR23* presentaron menores niveles de glucosa y sacarosa en silicuas jóvenes, nos preguntamos si esto podría tratarse de una diferencia particular de un tejido sumidero, o si el resto de los tejidos de las plantas, particularmente los tejidos fuente, también podrían presentar estas diferencias en los niveles de glúcidos. Para analizar esto, planteamos la hipótesis de que las mutantes podrían tener una disponibilidad reducida de carbohidratos en diferentes tejidos que la planta emplea como fuente de fotosintatos, como hojas y tallos. Para responder esta interrogante, cuantificamos glucosa, sacarosa y almidón en hojas y tallos de 28 y 41 días de plantas mutantes simples *phl1* y *amiR23*, y dobles (*phl1xamiR23*). No se encontraron diferencias significativas (Figura 30). Este resultado nos permitió concluir que la disminución en lípidos observada en plantas mutantes *phl1* y silenciadas *amiR23* no se debía a una disponibilidad reducida de carbohidratos en los tejidos fuente.

Contrariamente a lo esperado, tampoco se observaron diferencias significativas en el contenido de carbohidratos de silicuas jóvenes y maduras (de 7 y 15 DPP respectivamente) entre plantas Col 0 y mutantes dobles (*phl1xamiR23*).

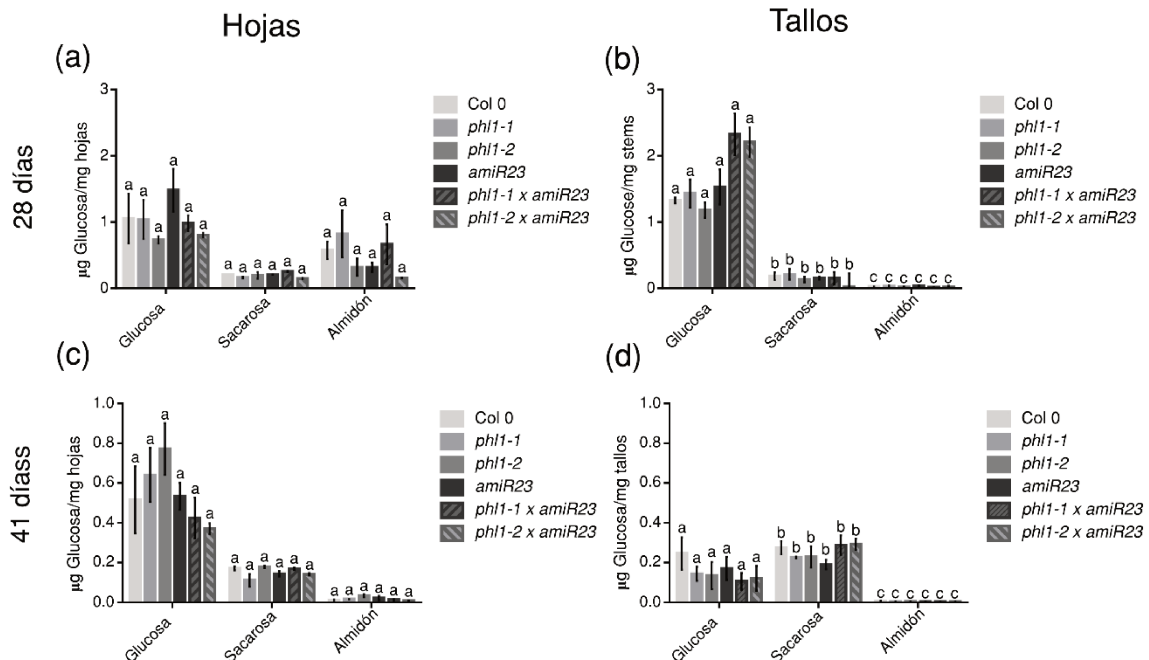


Figura 30. El contenido de carbohidratos de hojas y tallos de plantas mutantes *phl1*, *amiR23* y *phl1xamiR23* son similares. Niveles de glucosa, sacarosa y almidón en hojas y tallos de plantas de 28 (a y b) y 41 días (c y d) de edad crecidas en condiciones normales. Las barras de error representan SEM. Las diferencias significativas se indican con letras diferentes, según la prueba *post-hoc* de Tukey.

4.8 AtPHL1 y AtHB23 no están involucrados en la regulación del desarrollo de diversas características fisiológicas de Arabidopsis

Con el objetivo de evaluar si AtPHL1 y AtHB23 estarían involucrados en otros aspectos del desarrollo vegetal, decidimos profundizar en el análisis fenotípico de plantas mutantes y sobreexpresantes. Para ello, se analizaron diferentes características a lo largo del ciclo de vida de plantas de Arabidopsis mutantes *phl1* y silenciadas *amiR23*, como el número de hojas, número de tallos secundarios, número de ramas, número de semillas por silicua y producción por planta (Figura 31a). No se encontraron diferencias significativas en ninguno de estos parámetros analizados, en comparación con plantas control Col 0, lo que sugirió que ni AtPHL1 ni AtHB23 cumplirían un rol en particular asociado a estas características fenotípicas, al menos no en condiciones normales de crecimiento.

Dado que el transporte de carbohidratos se vio afectado en las plantas mutantes *phl1* y *amiR23*, decidimos analizar también la anatomía de los nodos pedicelo-silicua (Figura 31b). Los cortes histológicos que se tomaron de este tejido de plantas Col 0 y mutantes no mostraron diferencias significativas que pudieran aportar una explicación a las diferencias observadas en el transporte de carbohidratos hacia las silicuas y semillas.

Considerando que AtPHL1 inhibe la formación del botón floral y la apertura de silicuas (Figura 23 c y d), decidimos evaluar estas características en plantas sobreexpresantes (Figura 31c). Los resultados no mostraron diferencias en ninguno de estos parámetros entre plantas sobreexpresantes AtPHL1 y las plantas control Col 0 (Figura 31c), lo que nos permitió inferir que tanto la inhibición de la formación del botón floral como de la apertura de silicuas observada anteriormente en plantas mutantes *phl1* y silenciadas *amiR23* serían debidas específicamente a la mutación de los genes *AtPHL1* y *AtHB23*, respectivamente. Sin embargo, al sobreexpresar estos genes no se observó el efecto contrario, indicando que el exceso de estas proteínas podría disparar algún mecanismo compensatorio.

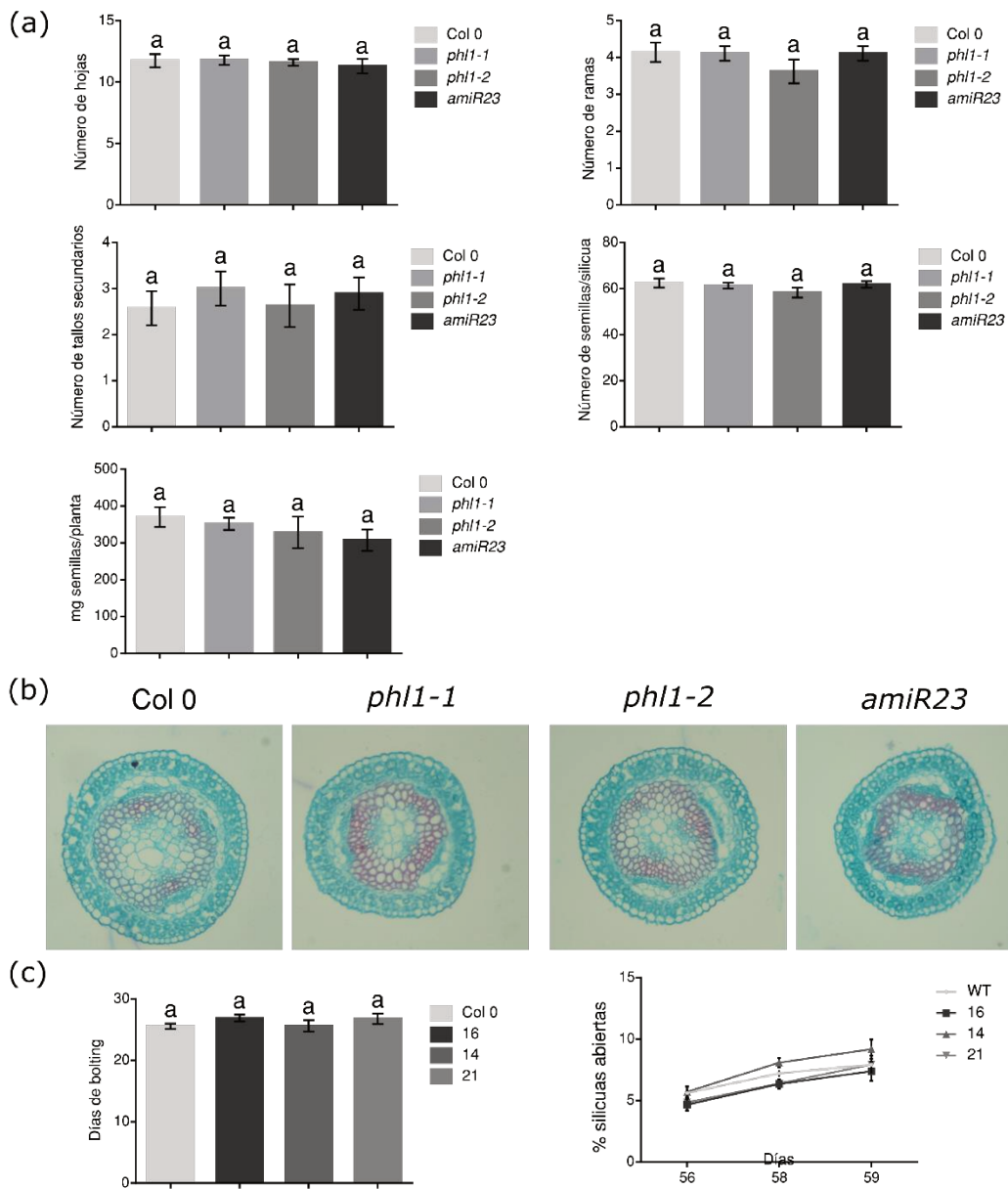


Figura 31. Las mutantes *phl1*, *amiR23* y las sobreexpresantes *ATPHL1* son muy similares a sus controles muchas de sus características fenológicas y fisiológicas. (a) Número de hojas, ramas, tallos secundarios, semillas por silicua y producción por planta en los genotipos Col 0, y mutantes *phl1-1*, *phl1-2* y *amiR23*. (b) Cortes histológicos teñidos con safranina *fast-green* de nodos pedicelo-silicua de los mismos genotipos. (c) Días de *bolting* y cinética de apertura de silicuas en plantas sobreexpresantes.

4.9 AtPHL1 y AtHB23 modulan la expresión de transportadores de carbohidratos

Una vez que determinamos que el transporte de carbohidratos se ve afectado en las plantas mutantes *phl1* y *amiR23*, investigamos la anatomía de los nodos pedicelo-silicua como se mencionó anteriormente. Las secciones histológicas de este tejido tomadas de plantas Col 0 y mutantes no mostraron diferencias significativas que pudieran explicar los fenotipos

observados (Figura 31b). Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que podrían estar afectada la expresión de los genes que codifican transportadores de azúcares. Para analizar esta hipótesis, cuantificamos los niveles de transcritos de diferentes transportadores (*SUC3*, *SUC4*, *SUC5*, *SWEET10*, *SWEET11*, *SWEET12* y *SWEET15*) que se expresan en los nodos pedicelo-silicua y/o en los funículos (Khan y col., 2015) en mutantes *phl1* y *amiR23* (Figura 32). El análisis fue hecho por RT-qPCR, en muestras de pedicelos que incluían los nodos pedicelo-silicua de plantas de 40 días de edad crecidas en condiciones normales.

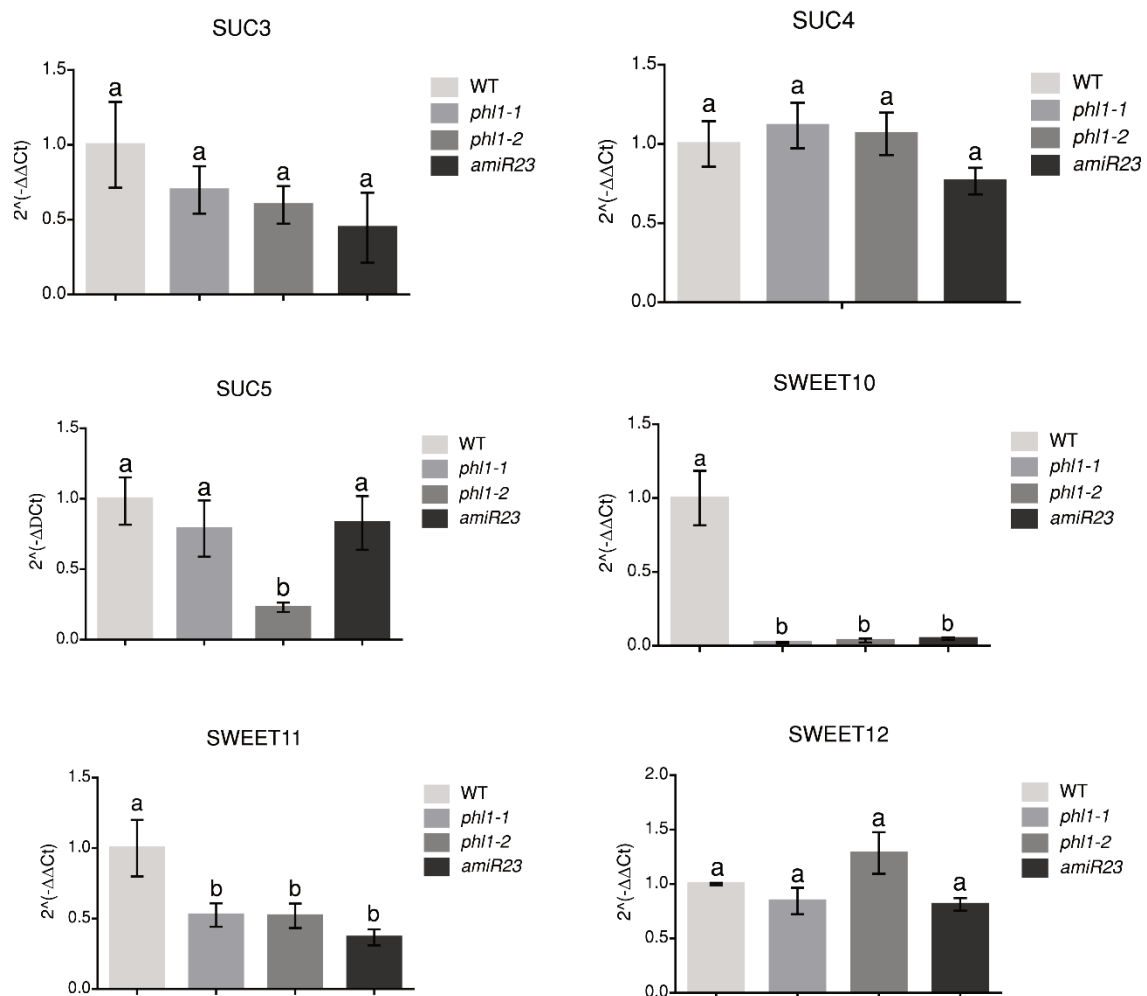


Figura 32. AtHB23 y AtPHL1 modulan la expresión de *SWEET10* y *SWEET11*. Niveles de transcripción medidos por RT-qPCR de los genes *SUC3*, *SUC4*, *SUC5*, *SWEET10*, *SWEET11* y *SWEET12* en muestras de ARN de nodos pedicelo-silicua, tomados de plantas de 40 días de edad de plantas Col 0 y mutantes *phl1* (dos líneas independientes), y plantas silenciadas *amiR23*. Los valores se normalizaron con los medidos en plantas Col 0 a los cuales se les asignó arbitrariamente el valor uno. Las barras representan SEM. Las diferencias significativas se indican con letras diferentes, según la prueba *post-hoc* de Tukey.

Los resultados de este análisis indicaron que los niveles de transcritos de *SWEET10* y *SWEET11* se encuentran reducidos significativamente en ambas plantas mutantes en comparación con plantas Col 0 (Figura 32). Los demás genes evaluados no mostraron cambios significativos en comparación con los controles. Estos datos sugirieron que *AtPHL1* y *AtHB23* podrían modular el transporte de carbohidratos al regular la expresión de *SWEET10* y *SWEET11*. Ninguno de estos dos genes presenta en sus regiones promotoras la secuencia palindrómica perfecta unida por los FT de tipo HD-Zip I (Palena y col., 1999), CAAT(A/T)ATTG, pero sí tienen elementos imperfectos en -1329 (*SWEET10*), y -1680 y -2180 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (*SWEET11*). Para determinar si estas cajas eran unidas por *AtHB23*, realizamos experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina seguida de la cuantificación de transcritos por qPCR (ChIP-qPCR); lamentablemente, los resultados no fueron concluyentes. Aunque no podemos descartar que *AtHB23* se una directamente a *SWEET10* y *SWEET11*, el bajo nivel de expresión de *AtHB23* en muestras de pedicelo-silicua y funículo de plantas transformadas con la construcción *prAtHB23:AtHB23:GUS:GFP* no nos permitió evaluar con precisión esta interacción putativa (Figura 33).

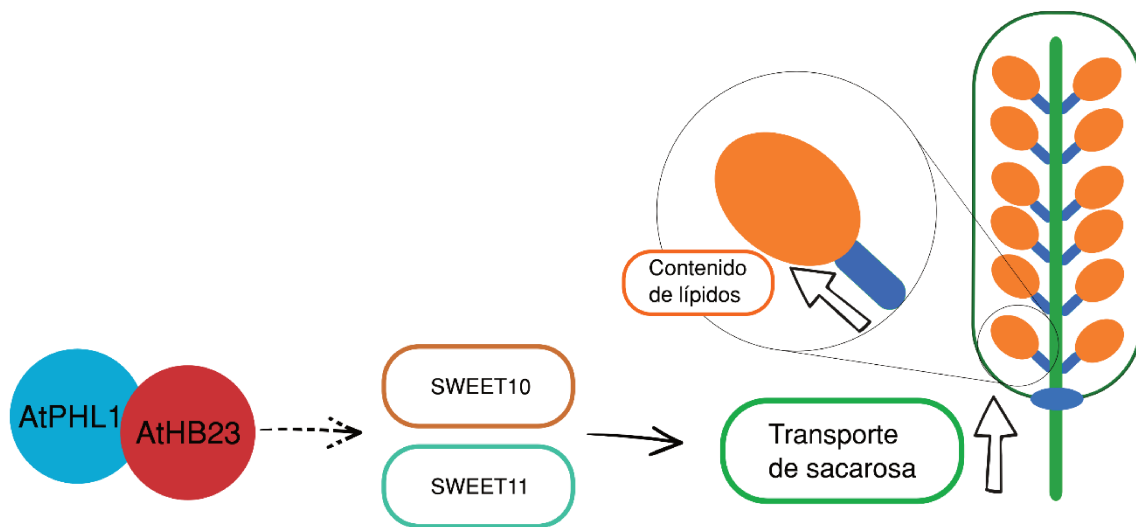


Figura 33. Modelo propuesto de la función de *AtHB23* y *AtPHL1* en el transporte de carbohidratos. El diagrama resume la función propuesta de *AtPHL1* y *AtHB23* en el llenado de semillas. El color azul en el esquema de la silicua indica la coexpresión de *AtPHL1* y *AtHB23*. Las flechas negras discontinuas representan la regulación directa, y las flechas vacías muestran la dirección del transporte de carbohidratos (desde la fuente hasta el sumidero). Las semillas se presentan como óvalos anaranjados.

4.10 *AtMYB68* y *AtPHL1* coexpresan con *AtHB23* en tejidos y estadios de desarrollo específicos de las raíces

Existen algunos estudios previos que indican que *AtHB23*, *AtMYB68* y se expresan en tejidos radiculares. *AtHB23* cumple un rol clave en el desarrollo de la raíz principal (RP) y las raíces laterales (RL; Perotti y col., 2019, 2020, 2022). Por su parte, *AtMYB68* fue asociado a la respuesta a altas temperaturas en la raíz (Feng y col., 2004) y *AtPHL1* ha sido asociado a la respuesta a estrés por falta de fosfato (Rubio y col., 2001, Bustos y col., 2010). Dado que mostramos que los tres FT interaccionan entre sí *in planta* (Figuras 19 y 20) y que además se expresan en raíces, nos preguntamos si dicha interacción era funcional. Para investigar esta hipótesis, decidimos estudiar detalladamente los patrones de expresión de *AtMYB68* y *AtPHL1* en las raíces. Para este propósito, generamos plantas transgénicas con las construcciones *prAtMYB68:GUS* y *prAtPHL1:GUS*. Los análisis de histoquímica en plántulas de 8 días indicaron que *AtPHL1* se expresa en la punta de la RP y en la base del primordio de la raíz lateral (PRL) en los estadios V a VII (Malamy y Benfey, 1997) así como en la punta de las RL. La actividad GUS impulsada por el promotor de *AtMYB68* fue evidente en el tejido vascular y en todos los PRL y RL en desarrollo (Figura 34). *AtMYB68* y *AtPHL1* coincidieron con *AtHB23* en la base del PRL, lo que sugirió un papel coordinado de estos FT en el desarrollo de RL (Figura 34). Es de hacer notar que la expresión de *AtMYB68* en el desarrollo de RL se restringió a las células circundantes del primordio, asemejándose a otros genes sensibles a auxinas involucrados en este contexto de desarrollo (Figura 34, Marin y col., 2010).

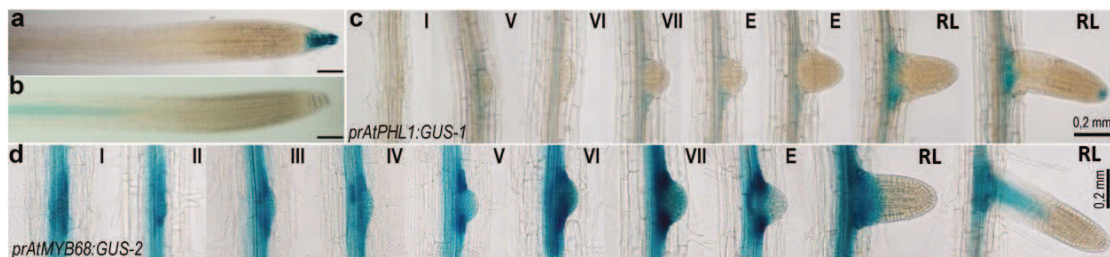


Figura 34. Los genes *AtMYB68* y *AtPHL1* se expresan en raíces principales y laterales. Expresión de *AtPHL1* (a) y *AtMYB68* (b) en la RP, evaluada en plantas transgénicas *prAtPHL1:GUS* y *prAtMYB68:GUS*. Patrón de expresión de los mismos genes durante el desarrollo de la RL (c y d). I a VII representan diferentes etapas del PRL, y RL indica raíces emergidas como lo describen Malamy y Benfey (1997). La barra negra de los paneles a y b indica 50 μ m.

4.11 AtMYB68 y AtPHL1 tienen un rol en el desarrollo de raíz principal y de las raíces laterales en conjunto con AtHB23

Dados los patrones de expresión y las interacciones descritas anteriormente, nos preguntamos si se estaba produciendo una regulación a nivel transcripcional entre estos genes en tejidos radiculares específicos. Para aclarar esta pregunta, obtuvimos plantas silenciadas en *AtMYB68* (*amiR68*; no había mutantes disponibles en el fondo Col 0) y plantas transformadas con una construcción conteniendo el promotor del virus del mosaico de la coliflor (35S) controlando la expresión de *AtMYB68* (AT68). En ambos casos se obtuvieron distintas líneas con diferentes niveles de expresión (Figura 35 a y b).

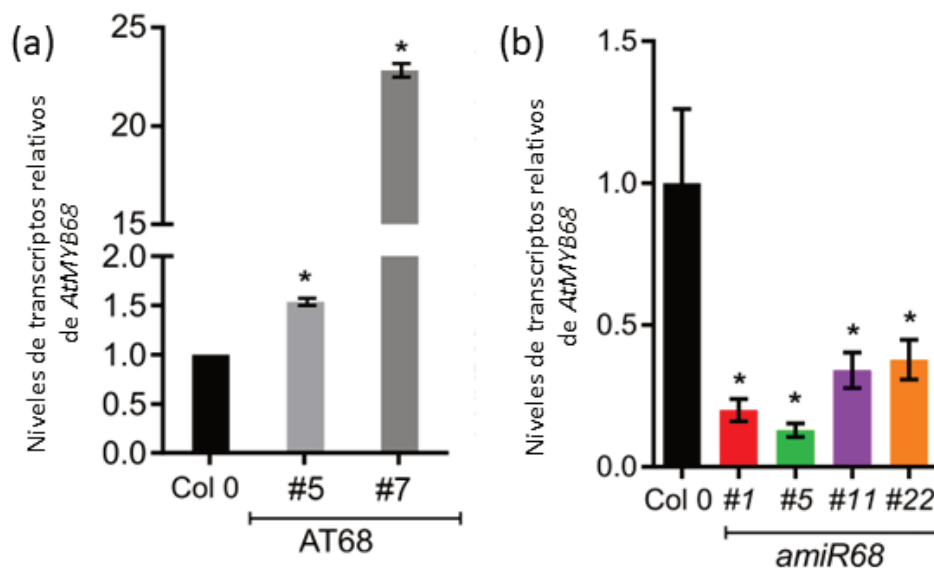


Figura 35. Niveles de transcritos relativos de *AtMYB68* en plantas sobreexpresantes y silenciadas. Niveles de transcritos de *AtMYB68* en plántulas de 10 días de edad crecidas en condiciones normales de los genotipos *AT68* (a) y *amiR68* (b). Los valores se normalizaron con los obtenidos en la Col 0. Las barras de error representan SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas al realizar una prueba t de Student (** P < 0,01, *** P < 0,001, **** P < 0,0001).

Los niveles de transcripción de *AtHB23*, *AtPHL1* y *AtMYB68* se evaluaron en los genotipos *amiR23*, *phl1*, *amiR68*, *AT23*, *ATPHL1* y *AT68* (Figura 36). A excepción de *AtMYB68* que muestra una regulación negativa muy leve en las raíces de *phl1* y *amiR23*, los niveles de transcritos no se alteraron en mutantes ni en plantas sobreexpresantes, lo que indica que la contribución de la regulación transcripcional no es relevante en este caso.

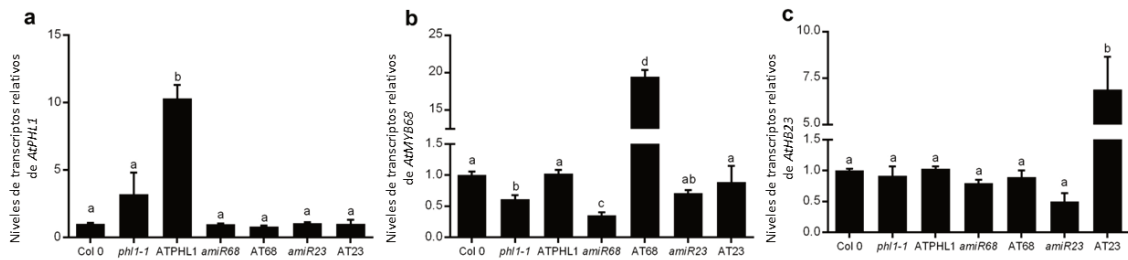


Figura 36. AtHB23, AtMYB68 y AtPHL1 no se regulan entre sí a nivel transcripcional. Niveles de transcripción de *AtPHL1*, *AtMYB68* y *AtHB23* en plántulas de 8 días crecidas en condiciones normales de los genotipos indicados en el eje x. Los valores se normalizaron con los obtenidos en las plantas control Col 0. Las barras representan SEM. Los datos se analizaron utilizando un ANOVA de dos vías considerando el genotipo y el tratamiento. Las diferencias significativas se indican con letras diferentes según la prueba de Tukey ($P < 0,01$).

Teniendo en cuenta la colocalización tisular y subcelular de *AtMYB68*, *AtPHL1* y *AtHB23*, investigamos cómo estos genes afectan la arquitectura de la raíz. Como se comentó más arriba, ya contábamos con líneas de plantas mutantes *phl1*. En vistas del patrón de expresión observado, cuantificamos el número de RL iniciadas y emergidas en plantas *amiR68* y mutantes *phl1*. El silenciamiento de *AtMYB68* no afectó la longitud de la RP, pero disminuyó significativamente la densidad de PRL (Figura 37a). Notoriamente, esta característica fue totalmente opuesta al fenotipo observado en las plantas *amiR23* (Perotti y col., 2019). Este resultado indicó una función regulatoria contraria para *AtHB23* y *AtMYB68* en la iniciación de RL. Por otro lado, las mutantes *phl1* presentaron RP más largas al igual que las plantas *amiR23*, mientras que las sobreexpresantes de *PHL1* (ATPHL1) mostraron el fenotipo contrario (Figura 37c). Estas observaciones indicaron que *AtHB23* y *AtPHL1* actuarían sinérgicamente en la elongación de RL.

En el mismo sentido, la longitud total de raíces laterales (LTRL) relativa fue menor en las plantas *amiR68* y significativamente mayor en las mutantes *phl1*, al igual que en las plantas *amiR23* (Figura 37b). Para evaluar si la diferencia en la LTRL entre los tres genotipos se debía a la variación en el número de células o al tamaño de las mismas, se analizaron las puntas de las RL mediante microscopía confocal luego de una tinción con yoduro de propidio. El análisis reveló menor cantidad de células en la zona de transición (ZT) en las plantas *amiR68*, mientras que las plantas mutantes *phl1* y *amiR23* mostraron el fenotipo opuesto (Figuras 37 d y e). En conjunto, los resultados nos permitieron pensar que existe una interacción compleja entre los tres FT en la base del PRL y la punta de la RL.

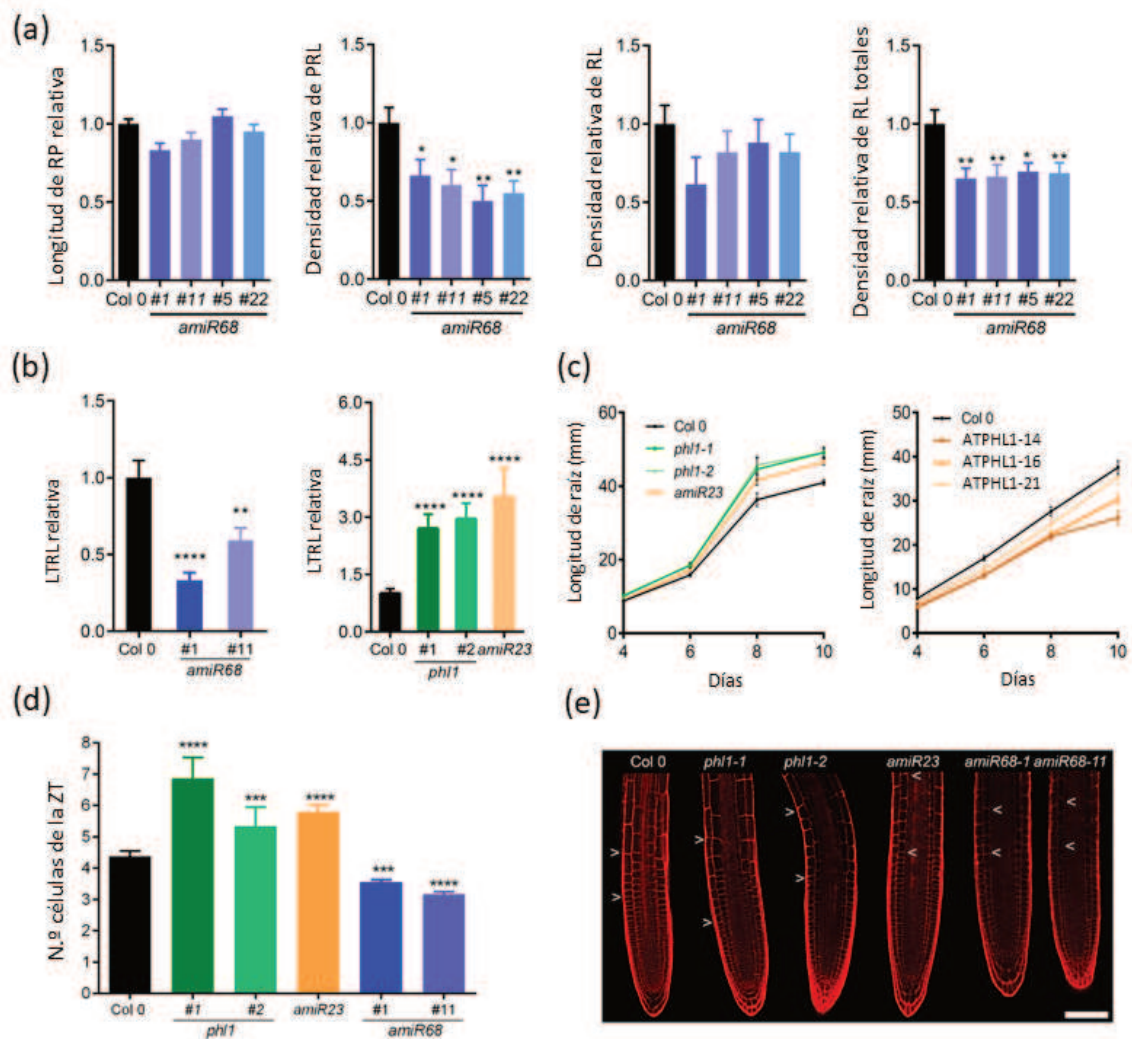


Figura 37. AtMYB68 y AtPHL1 modulan la arquitectura raíz. (a) Longitud total relativa de la RP en plantas silenciadas *amiR68* en comparación con plantas control Col 0. La densidad relativa de PRL o RL se calculó como el número de PRL o RL/mm de la RP y la densidad relativa de RL totales (PRL + RL). Los valores se normalizaron con los medidos en las plantas Col 0, tomado como 1 (uno). (b) Longitud total de RL (LTRL) relativa de las mutantes *amiR68*, *phl1* y *amiR23*, y las plantas control Col 0. (c) Evolución temporal de la elongación de la RP de *phl1* y ATPHL1 en relación con las plantas Col 0. (d) Número de células en la zona de transición (ZT) de las mutantes *amiR68*, *phl1* y *amiR23*, junto con los controles Col 0. (e) Imagen ilustrativa de microscopía confocal de puntas de RL de mutantes *amiR68*, *phl1*, *amiR23* y Col 0. Los ensayos se repitieron tres veces con N: 15/genotipo. Las barras de error representan SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas al realizar una prueba t de Student (** P < 0,01, *** P < 0,001, **** P < 0,0001).

Por otro lado, ni las plantas AT68 ni las mutantes *phl1* mostraron diferencias estadísticamente significativas en el número de PRL o RL (Figura 38). Si bien estos resultados parecieron en un principio algo desconcertantes, ambos se pueden explicar por la necesaria interacción con las proteínas socias en estos eventos.

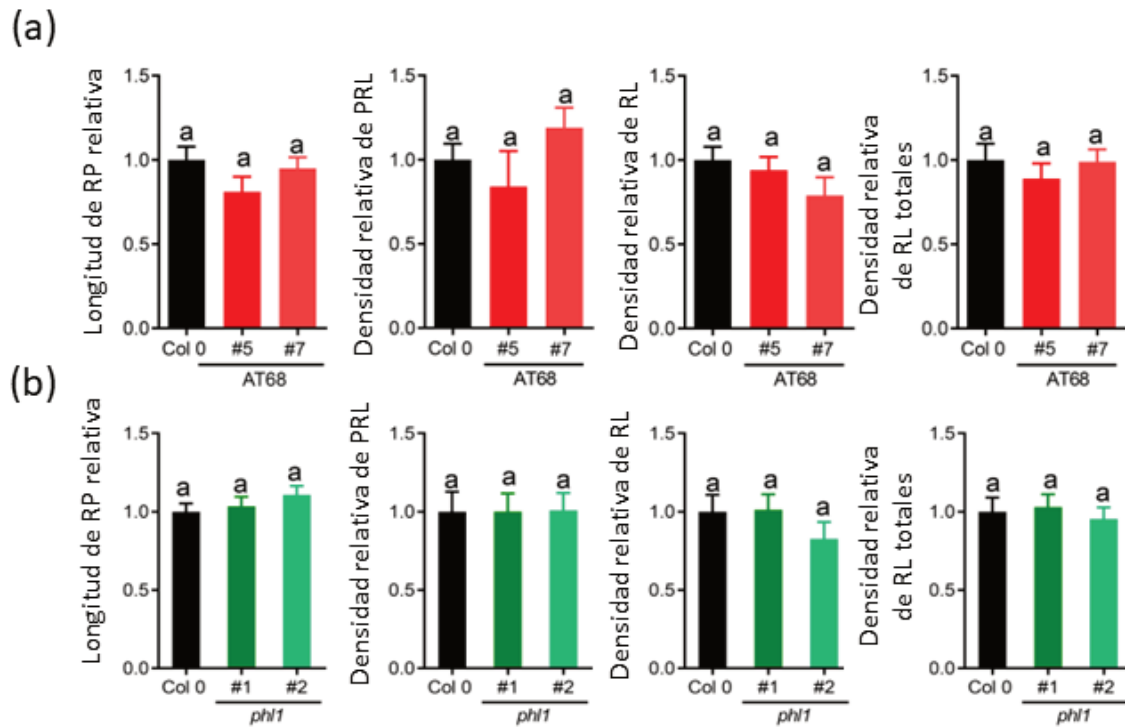


Figura 38. Las raíces de plantas AT68 y *phl1* no presentan diferencias en la longitud de la raíz principal. Longitud relativa de la RP en Col 0 y dos líneas *ATMYB68* transgénicas independientes (AT68: #5 y #7) (a). Longitud relativa de la RP en Col 0 y dos mutantes de *phl1* (*phl1-1* y *phl1-2*) (b). La densidad relativa de PRL o RL se calculó como el número de PRL o RL/mm de la RP y la densidad relativa de RL totales (LRP + LR). Los valores se normalizaron con los medidos en el control Col 0, tomado arbitrariamente como 1 (uno). Las barras representan SEM. Los datos se analizaron utilizando un ANOVA de dos vías considerando el genotipo y el tratamiento. Los ensayos se repitieron tres veces con N: 15/genotipo. Las barras de error representan SEM. Las diferencias significativas se indican con letras diferentes según la prueba de Tukey, $P < 0,01$.

4.12 El flujo de auxinas y transportadores de esta hormona se ven alterados en plantas mutantes *phl1* y *amiR68*

Dado que la expresión de *AtHB23* en RL está regulada por las auxinas, y la proteína codificada modula directamente el transportador de auxinas *LAX3*, nos preguntamos si los genes que codifican las proteínas interactuantes también estaban regulados por esta hormona. Para evaluar esta hipótesis, las plantas *prMYB68:GUS* se trataron con 1 μ M de IAA y se analizaron mediante histoquímica y RT-qPCR. Ambos ensayos indicaron una fuerte inducción de la expresión de este gen por auxinas en el sistema vascular de la raíz (Figura 39 a y b).

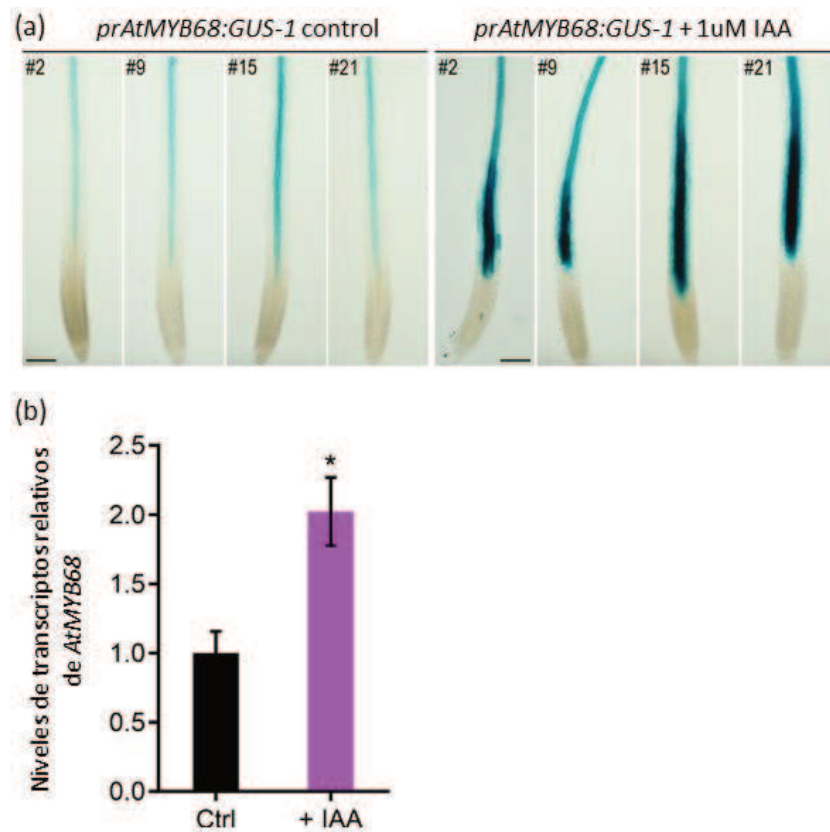


Figura 39. Las auxinas inducen la expresión de *AtMYB68*. (a) Imágenes de histoquímica de GUS de raíces *prAtMYB68:GUS* de 8 días de edad (4 líneas independientes: #2, #9, #15 y #21) crecidas en condiciones normales (panel izquierdo) o tratadas con 1 μ M IAA (panel derecho) durante 12 h. La barra negra indica 50 μ m. (b) Niveles de transcritos de *AtMYB68* en raíces de 7 días de plántulas crecidas en condiciones normales o con 1 μ M de IAA durante 12 h. El valor se normalizó con el obtenido en las plantas control Col 0. El asterisco indica una diferencia significativa según la prueba *post-hoc* de Tukey.

También analizamos el posible efecto de las auxinas sobre la expresión de *AtPHL1* y *AtHB23* en la punta de la RP. *AtPHL1* no mostró diferencias significativas en presencia de IAA, mientras que *AtHB23* mostró una fuerte inducción en el sistema vascular (Figura 40 a y b).

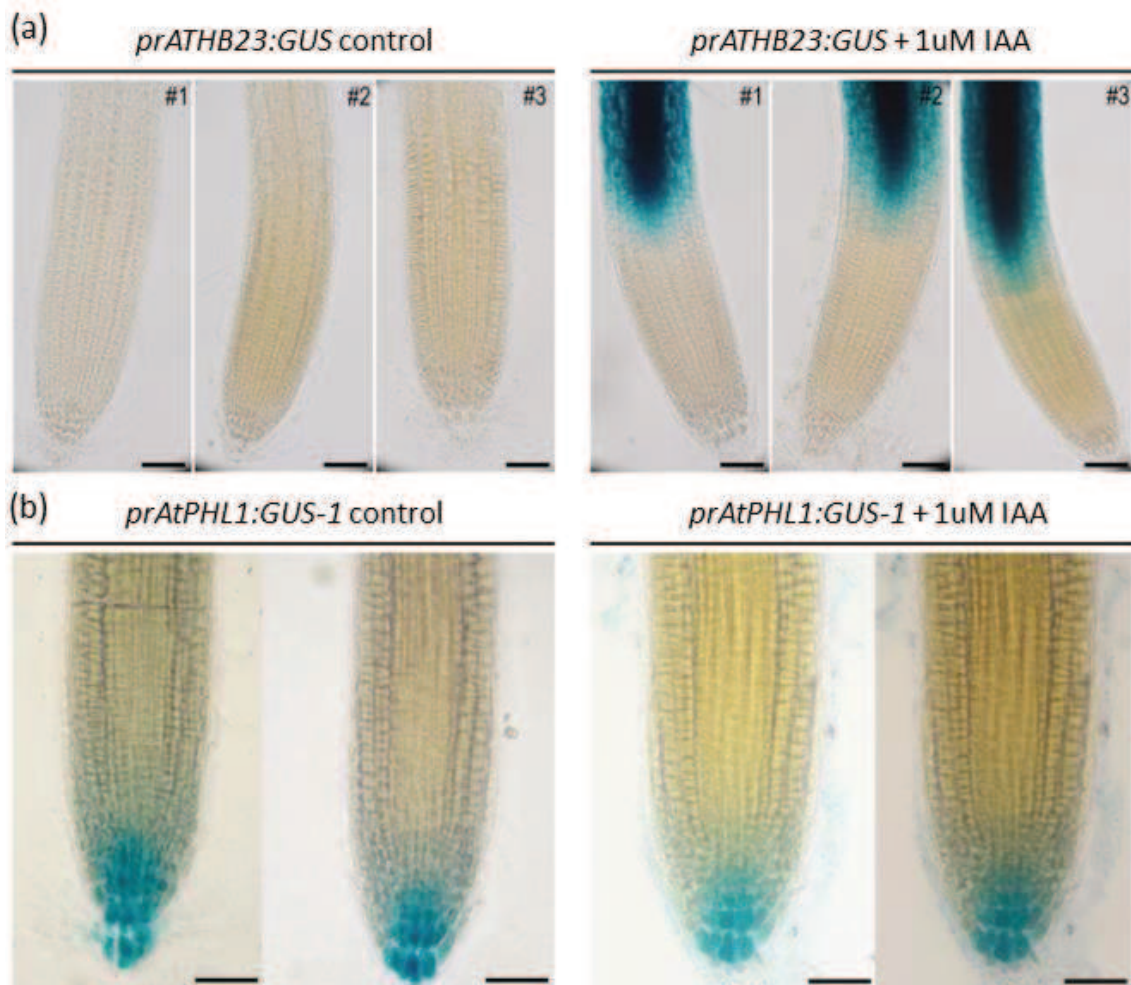


Figura 40. Las auxinas afectan la expresión de *AtMYB68* en la raíz principal, pero no la de *AtPHL1*. Histoquímica GUS de raíces *prAtAtHB23L:GUS* (a) y *prAtPHL1:GUS-1* (b) de 8 días de edad. La barra negra indica 50 μ m. Los ensayos se repitieron tres veces con N: 15/genotipo.

En vista del impacto de la regulación de IAA sobre *AtMYB68*, y con el objetivo de investigar si este FT influye en la distribución de auxinas en la raíz, cruzamos plantas transformadas con un promotor artificial sensible a la presencia de la hormona denominado DR5 (*DR5:GUS*) con plantas silenciadas *amiR68*. Los resultados fueron comparados con la expresión de GUS de plantas *DR5:GUS* (Figura 41a). La expresión de GUS en la punta de la RP desapareció en las cruza con *amiR68* (Figura 41b), lo que indicó que *AtMYB68* reprime del transporte de auxinas a este tejido. El efecto fue similar en las puntas de RL, mientras que la tinción de GUS aumentó en los PRL de estas plantas (Figura 41b). Para conocer la posible influencia de *AtPHL1* en el transporte de auxinas, generamos nuevas cruza entre las plantas *DR5:GUS* y mutantes *phl1*. En este caso, la expresión en las puntas permaneció inalterada, mientras que desapareció del sistema vascular (Figura 41c). Estos resultados indicaron que *AtMYB68* tiene una función en la regulación de auxinas en la RP mientras que *AtPHL1* actuaría en el sistema vascular.

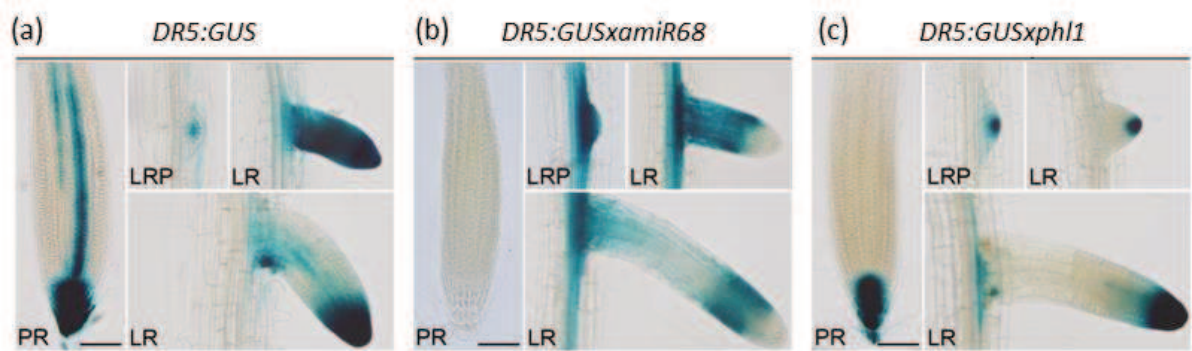


Figura 41. AtMYB68 y AtPHL1 afectan la distribución de auxinas. Histoquímica GUS de raíces *DR5:GUS* (a), *DR5:GUSxamiR68* (b) y *DR5:GUSxphl1* (c) de 8 días de edad. La barra negra indica 50 μm. Los ensayos se repitieron tres veces con N: 15/genotipo.

Habiendo visto los cambios producidos por AtMYB68 en la distribución de auxinas, nos preguntamos si este FT estaría afectando la expresión de los transportadores de esta hormona. *AUX1* se localiza normalmente en células de la RP en las que dirige el transporte acropétalo de auxinas (Taiz y Zeiger, 2010). Este transportador apareció fuertemente reprimido en las cruces *prAUX1:GUSxamiR68* mostraron significativamente menos tinción que las plantas *prAUX1:GUS* (Figuras 42 a y b), indicando que AtMYB68 sería un represor de *AUX1*.

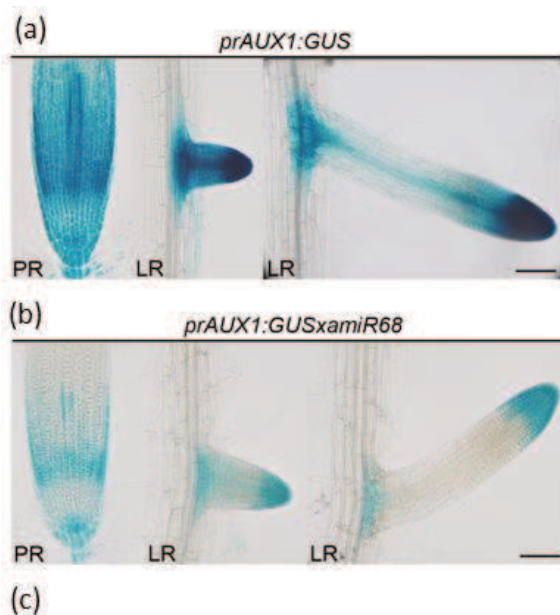


Figura 42. AtMYB68 reprime la expresión del transportador de auxinas *AUX1* en la raíz principal y raíces laterales. Histoquímica GUS de raíces *prAUX1:GUS* (a) y *prAUX1:GUSxamiR68* (b) de 8 días de edad. La barra negra indica 50 μm. Los ensayos se repitieron tres veces con N: 15/genotipo. (c) Niveles de transcritos de *AUX1* en raíces de 8 días de plántulas *prAUX1:GUS* y *prAUX1xamiR68* crecidas en condiciones normales. El valor se normalizó con el obtenido en las plantas *prAUX1:GUS*. Las diferencias significativas se indican con un asterisco según la prueba post-hoc de Tukey.

4.13 AtHB23, AtMYB68 y AtPHL1 participan en la respuesta a estrés salino con funciones cooperativas y opuestas

Teniendo en cuenta el impacto de la interacción entre AtHB23, AtPHL1 y AtMYB68 en la arquitectura de la raíz y dado el papel positivo de AtHB23 en condiciones de salinidad (Perotti y col., 2022), nos preguntamos si estos FT de la familia MYB eran necesarios para la respuesta de AtHB23. Para responder a esta pregunta, en primer lugar, analizamos la expresión de estos genes en condiciones de salinidad. Las plantas transgénicas transformadas con las construcciones de *prAtMYB68:GUS* y *prAtPHL1:GUS* se sometieron a tratamientos con NaCl y se analizaron mediante histoquímica. *AtPHL1* fue fuertemente inducido en la punta de la RP y el sistema vascular (Figura 43a), mientras que las plantas *prAtMYB68:GUS* no mostraron diferencias significativas en la tinción de GUS. Sin embargo, los niveles de transcripción de *AtMYB68* aumentaron significativamente en las plantas Col 0 tratadas con NaCl (Figura 43b), indicando que de alguna forma la región promotora aislada de *AtMYB68* no representaba con total certidumbre la expresión de este gen. Para estudiar si la modulación por NaCl afectaba los fenotipos mutantes y sobreexpresantes, contamos las plantas sobrevivientes y muertas después de 9-15 días de tratamiento. Las plantas *amiR68* y *ATPHL1* mostraron fenotipos sensibles similares (Figura 43c). Además, las plantas ATPHL1 detuvieron el crecimiento de la RP, mientras que las mutantes *phl1* mostraron el comportamiento opuesto (Figura 43d). Teniendo en cuenta la LTRL, estas mutantes tratadas con NaCl se parecían a las plantas Col 0, mientras que las plántulas *amiR68* y *amiR23*, que en condiciones normales mostraron RL más cortas, fueron menos sensibles que las Col 0 en condiciones de salinidad considerando este rasgo (Figura 43e).

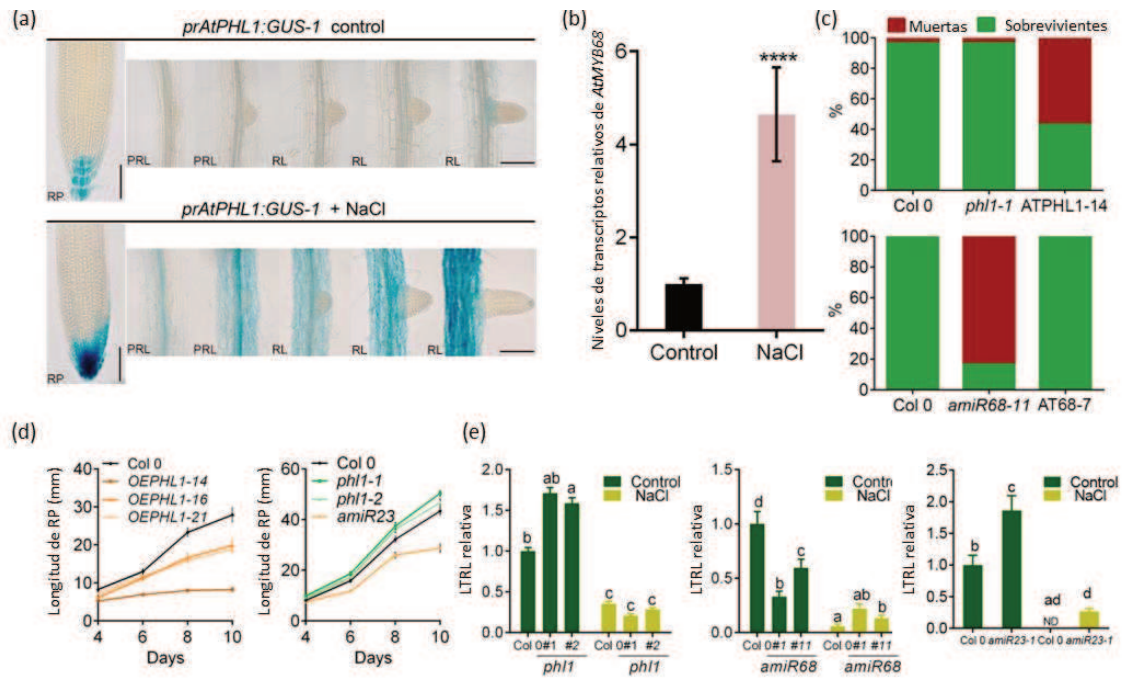


Figura 43. *AtMYB68* tiene un papel positivo frente a la salinidad, mientras que *AtPHL1* es un regulador negativo de dicha respuesta. (a) Histoquímica GUS de raíces *prAtPHL1:GUS-1* de 8 días de edad (panel superior) y después del tratamiento con 100 mM NaCl (panel inferior). (b) Niveles de transcritos de *AtMYB68* en raíces de 7 días de plántulas crecidas en condiciones normales o con 100 mM de NaCl durante 12 h. El valor se normalizó con el obtenido en el control Col 0. El asterisco indica una diferencia significativa (prueba *post-hoc* de Tukey). (c) Tasa de supervivencia de las plantas (Col 0, *phi1*, *ATPHL1*, *amiR68* y *AT68*) colocadas en placas con medio de cultivo MS y luego pasadas a 100 mM de NaCl durante 9-15 días adicionales. Las columnas rojas indican el % de plantas muertas mientras que las verdes, el % de sobrevivientes. (d) Evolución temporal de la longitud de la RP evaluada en Col 0, *ATPHL1* (tres líneas independientes: #14, #16 y #21), *phi1* (dos líneas independientes: -1 y -2) y silenciadas *amiR23* crecidas en 75 mM de NaCl. Las mediciones cuantitativas se realizaron desde el día 4 después de la siembra hasta el día 9-15. (e) LTR de las mutantes *amiR68*, *amiR23* y *phi1*, y de las plantas control Col 0, crecidas en condiciones control o tratadas con 75 mM de NaCl. Los ensayos se repitieron al menos tres veces con N: 15/genotipo. La barra negra representa 1 cm. Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de Tukey, $P < 0,01$). Las barras de error representan SEM.

4.14 La capacidad de adaptación de plantas mutantes, sobreexpresantes y cruza de *AtHB23*, *AtPHL1* y *AtMYB68* a condiciones de salinidad, se correlaciona con el estado de gránulos de almidón en la punta de la raíz principal

El gravitropismo de la raíz depende del gradiente de auxinas entre los lados superior e inferior (Zhang y col., 2019). En las células de la columela se forman agregados de almidón, denominados estatolitos o amiloplastos (Leitz y col., 2009). Un medio salino afecta gravemente el gradiente de auxinas y, en consecuencia, la formación de amiloplastos. Las plantas mutantes y sobreexpresantes de *AtHB23*, *AtPHL1* y *AtMYB68* respondieron diferencialmente frente al estrés por salinidad (Figura 43). Para entender este escenario,

analizamos el contenido de almidón tiñendo las puntas de las raíces de estas plantas con una solución de Lugol (Figura 44). Las plántulas se cultivaron en condiciones normales durante cinco días (Figura 44a) y luego se colocaron en 150 mM NaCl durante siete u ocho horas (Figura 44b). Anteriormente se demostró que las plantas *amiR23* redujeron significativamente su contenido de almidón después de este tratamiento (Figura 44b, Perotti y col., 2022). Como era de esperar, los genotipos *amiR68* y *ATPHL1* mostraron el mismo aspecto de pérdida de amiloplastos como habían mostrado las plantas *amiR23* (Figura 44b). El fenotipo diferencial de las plántulas *amiR68* se perdió al cruzarlas con plantas del genotipo AT68, lo que indicó que el silenciamiento de este gen generó la mayor sensibilidad al NaCl (Figura 44b). Posteriormente, la mitad de las plántulas se transfirieron nuevamente al medio MS mientras que la otra mitad permaneció en NaCl. Al igual que las plantas AT23, las raíces *phl1* y *AT68* se adaptaron lentamente al medio de salinidad y recuperaron sus gránulos de almidón como lo hicieron en el medio libre de NaCl (Figuras 44 c y d), mientras que los genotipos *amiR68* y *ATPHL1* no pudieron restaurar un fenotipo saludable (Figura 44 c y d).

Dados estos resultados, planteamos la hipótesis basada en la disponibilidad de AtHB23 para ejercer una acción positiva frente a la salinidad, que sería evitada por AtPHL1 o potenciada por AtMYB68. Para estudiar esto, obtuvimos plantas cruzadas y evaluamos su comportamiento realizando el mismo ensayo descrito anteriormente. Las plantas *amiR23xamiR68* perdieron sus amiloplastos y no pudieron recuperarlos incluso después de 72 h en condiciones normales (Figuras 44e-h). En particular, las plantas cruzadas *amiR68xAT23* no perdieron sus gránulos de almidón después del tratamiento con NaCl, lo que sugirió que la sobreexpresión de *AtHB23* compensó de alguna manera la baja disponibilidad de *AtMYB68* para interactuar de manera cooperativa. Por otro lado, las plántulas *phl1-1xamiR23* se comportaron como el genotipo *amiR23*, apoyando el papel esencial de AtHB23 en la respuesta positiva frente a la salinidad. En las cruces *ATPHL1xAT23*, la imagen fue intermedia entre la de los genotipos parentales (Figura 44 e-h).

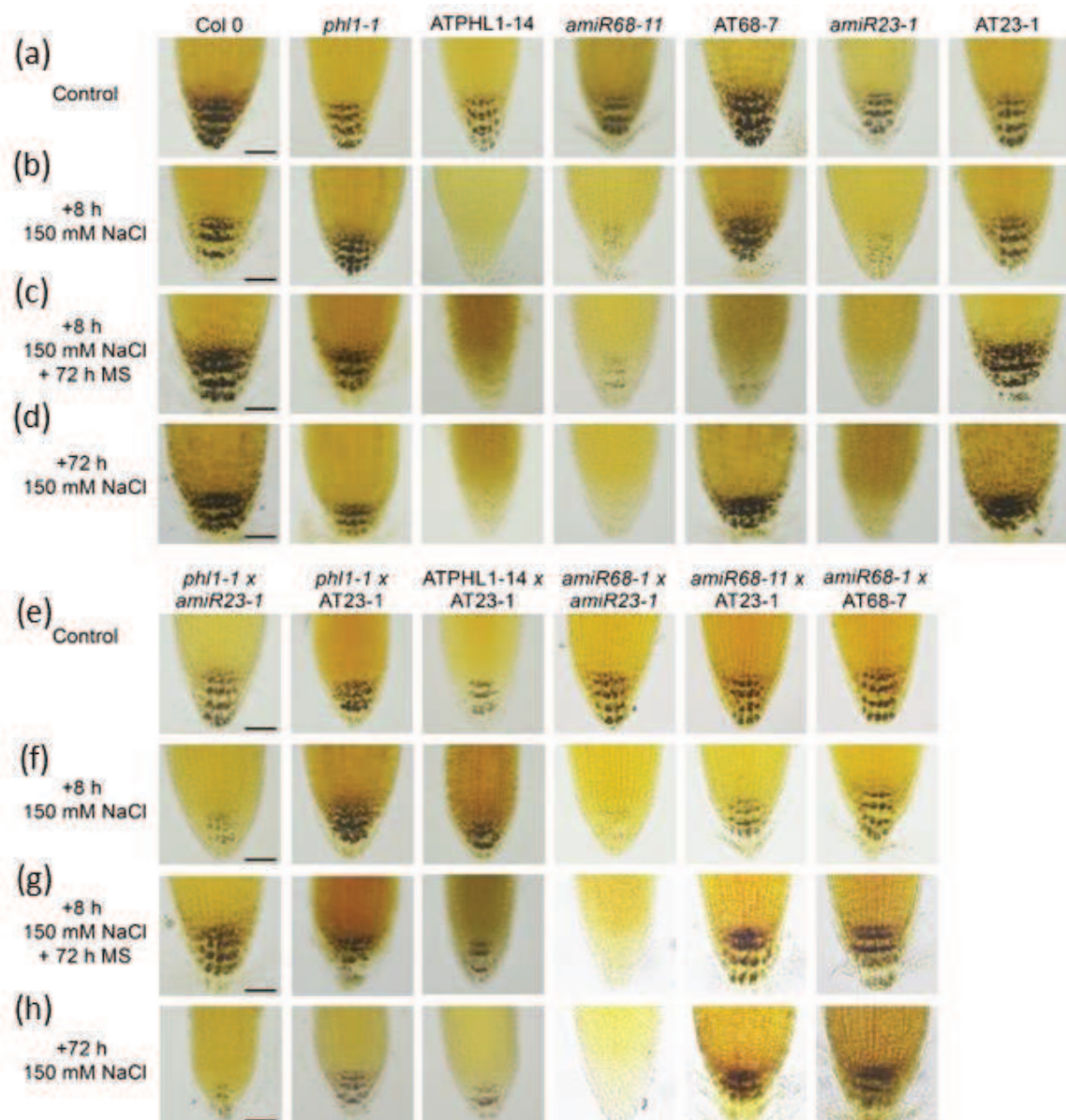


Figura 44. La capacidad de adaptación a la salinidad en función de los niveles de *AtHB23*, *AtPHL1* y *AtMYB68* se correlaciona con el estado de gránulos de almidón en la punta de la raíz. (a) Imágenes ilustrativas de puntas de RP (5 días de edad) teñidas con solución de Lugol de plántulas Col 0, *phl1*, ATPHL1, *amiR68*, *AT68*, *amiR23* y AT23 cultivadas en condiciones normales. (b) Después de 8 h de tratamiento con 150 mM NaCl. (c) Las raíces se transfirieron a condiciones normales o se mantuvieron en 150 mM NaCl durante 72 h adicionales (d). (e-h) El mismo análisis se realizó con las plantas cruzadas *phl1xamiR23*, *phl1xAT23*, *ATPHL1xAT23*, *amiR68xamiR23* y *amiR68xAT23*. (e) Condiciones de control, (f) después de 8 h en 150 mM NaCl, (g) después de 8 h NaCl 150 mM + 72 h en MS, (h) después de 8 h + 72 h en 150 mM NaCl. La barra negra representa 50 µm.

La salinidad y el estrés osmótico están estrechamente relacionados. Además, el pasaje de plantas de la condición control a un medio que contiene NaCl 150 mM puede causar estrés

osmótico. Para corroborar o descartar que los fenotipos observados en mutantes y sobreexpresantes se debieron a la salinidad y/o al estrés osmótico, analizamos los amiloplastos después de un tratamiento con manitol 150 mM (Figura 45).

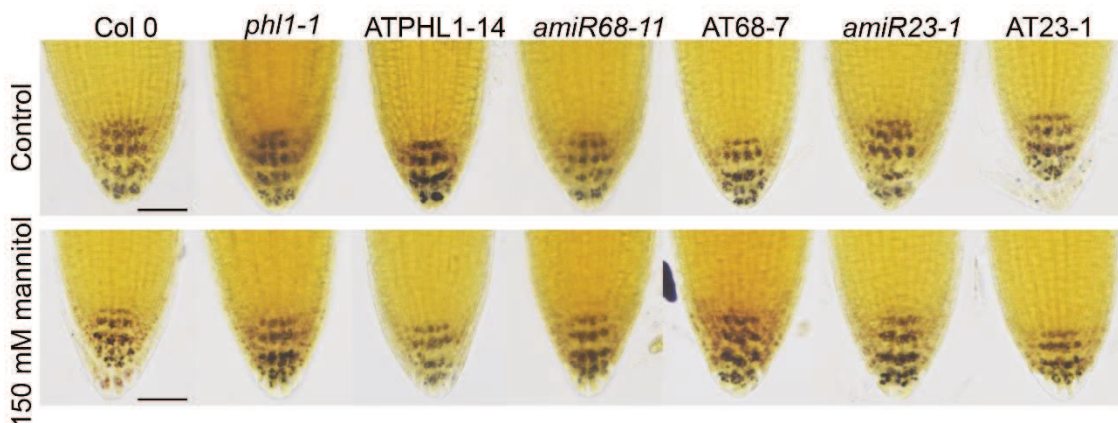


Figura 45. Los gránulos de almidón en la punta de la raíz de plantas con niveles de expresión alterados de *AtHB23*, *AtPHL1* y *AtMYB68* no se vieron afectados por el estrés osmótico. Fotografías ilustrativas de puntas de raíces (5 días de edad) teñidas con solución Lugol de plántulas Col 0, *phl1-1*, ATPHL1-14, *amiR68-11*, AT68-7, *amiR23-1* y AT23-1 cultivadas en condiciones normales (parte superior panel) o los mismos genotipos después de 7 h de tratamiento con manitol 150 mM (panel inferior). La barra negra representa 50 μ m.

Ninguno de los genotipos con niveles alterados de *AtHB23*, *AtPHL1* o *AtMYB58* se vio afectado por este tratamiento, lo que indica que los efectos observados fueron específicos de la salinidad.

4.15 La síntesis y degradación del almidón, en la columela de raíces principales, se ven afectadas por *AtPHL1* y *AtMYB68*

Con todos los resultados obtenidos en condiciones salinas, evaluamos los niveles de transcritos de genes que codifican enzimas claves que participan en la síntesis y degradación del almidón en plantas *phl1* y *amiR68*. *ADG1* y *PGM*, involucrados en la síntesis de almidón, no cambiaron significativamente, excepto en las raíces *amiR68*, donde se redujeron ligeramente en salinidad y después de la recuperación, respectivamente (Figura 46). *BAM1*, que participa en la degradación, fue inducido en plantas *amiR68* en salinidad, mientras que las mutantes *phl1* se comportaron de manera similar a las Col 0 y *GWD* no mostró diferencias. Estos resultados indicaron que el *turnover* de almidón se vio alterado por los niveles de *AtMYB68* y *AtPHL1* (Figura 46). Sin embargo, por sí solos no pueden explicar la falta absoluta de almidón

observada en las plantas *amiR68* y la integridad de los amiloplastos en las mutantes *phl1*, lo que indica que otros mecanismos deben estar modulando este proceso.

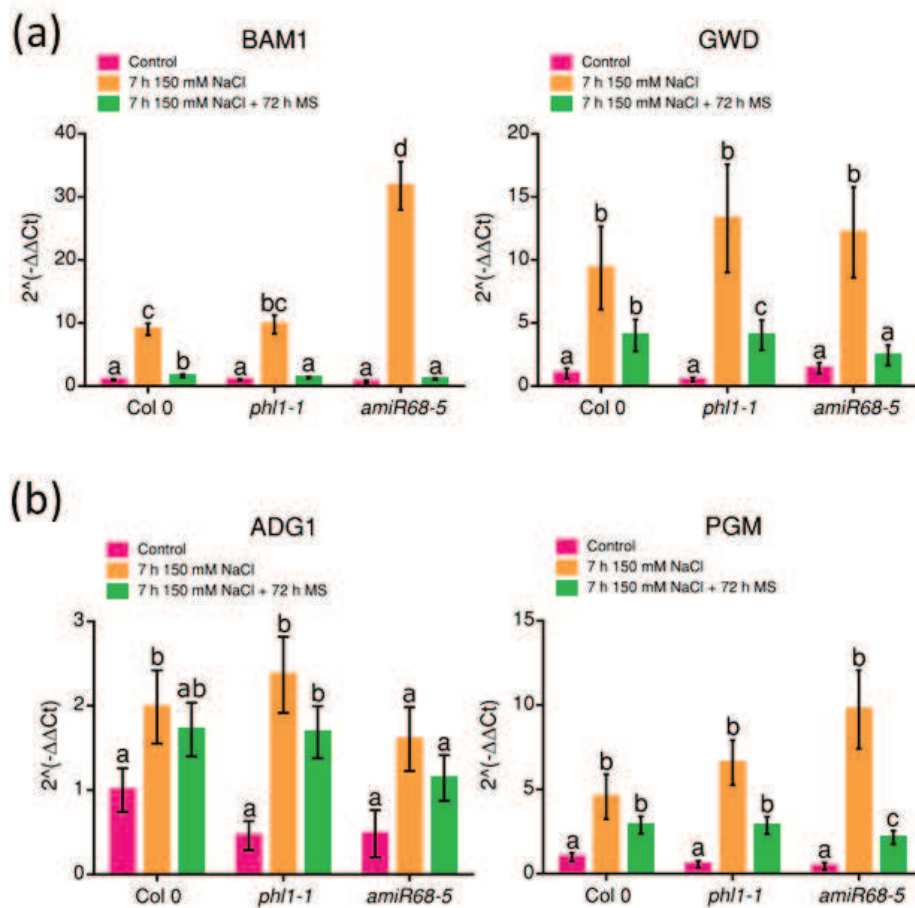


Figura 46. La síntesis y degradación del almidón se ven afectadas por AtPHL1 y AtMYB68. Niveles de transcritos de genes clave en plantas Col 0, *phl1-1* y *amiR68* crecidas en condiciones normales durante 5 días, tratadas 7 h con 150 mM NaCl y colocadas para recuperarse en medio MS durante 72 h adicionales. Los genes evaluados que participaron de la degradación fueron *GWD* y *BAM1* (a), y de la síntesis *PGM* y *ADG1* (b). Todos los valores se normalizaron con el obtenido en las Col 0. Las barras representan SEM. Los datos se analizaron utilizando un ANOVA de dos vías considerando el genotipo y el tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de Tukey, $P < 0,01$).

En conjunto, nuestros resultados indicaron una regulación fina del desarrollo de la RP y de RL en condiciones de crecimiento normales y en condiciones de salinidad mediada por los FT AtHB23, AtMYB68 y AtPHL1 interactuando entre sí (Figura 47).

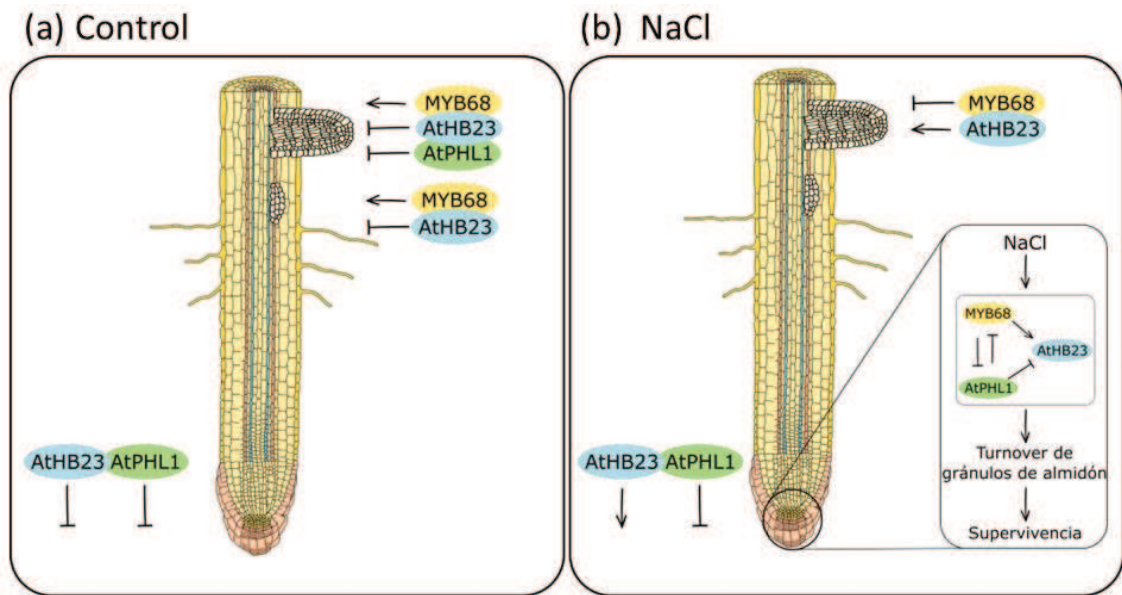


Figura 47. Modelo propuesto para la interacción entre AtHB23, AtPHL1 y AtMYB68 en condiciones normales y de salinidad en raíces de Arabidopsis. Modelo propuesto para las funciones de AtHB23, AtPHL1 y AtMYB68 en el desarrollo de raíces primarias y laterales de Arabidopsis en condiciones normales (a) y salinidad (b). Las regulaciones directas entre las diferentes proteínas regulatorias son indicadas con flechas.

DISCUSIÓN

*“Cualquiera puede hacer historia,
sólo un gran hombre puede escribirla.”*

Oscar Wilde.

5. DISCUSIÓN

5.1 AtHB23 y AtPHL1 actúan en conjunto promoviendo el transporte de carbohidratos desde los nodos pedicelo-silicua a las semillas

Los factores de transcripción (FT) tienen funciones reguladoras en diversos eventos morfológicos, fisiológicos y de desarrollo de las plantas. Algunos de ellos se expresan en pocas células en etapas específicas y tienen una función precisa y genes *target* determinados. Por el contrario, otros FT se expresan en varios tejidos y etapas de desarrollo, desempeñan funciones variadas y, con frecuencia, son modulados por las condiciones ambientales.

Éste es el caso de AtHB23 y AtPHL1, cuya expresión es modulada por factores externos. En trabajos previos a la realización de esta Tesis, el primero se asoció con funciones en respuesta a la luz azul y a las auxinas en la iniciación de raíces laterales (Choi y col., 2014, Perotti y col., 2019, 2020), mientras que el segundo con respuestas de estrés por inanición de Pi (Bustos y col., 2010, Varala y col., 2018). En el presente trabajo de Tesis, mostramos que estos FT actúan juntos y tienen un papel crucial en la regulación del transporte de carbohidratos en etapas avanzadas del desarrollo, sin relación con condiciones de estrés. Estos hallazgos respaldan el hecho de que muchos FT exhiben funciones y objetivos específicos, asociados con un tejido u órgano particular y una etapa de desarrollo específica.

El funículo es la ruta directa a las semillas: transporta nutrientes y señales desde los tejidos fuente y funciona anclándolos a la planta. Aunque el conocimiento sobre este órgano es limitado, en estudios recientes se reveló que, en la última etapa de desarrollo del funículo, se encontraron enriquecidos genes asociados a la biosíntesis de triacilglicerol (Khan y col., 2015). Usando microdissección láser combinada con perfiles de transcriptomas, el funículo se dividió en regiones y subregiones, con diferentes funciones durante el desarrollo de la semilla. En comparación con otras subregiones maternas de la semilla, el funículo se vio enriquecido en genes relacionados con la bioenergética celular (Khan y col., 2015). Este estudio mostró que los transcritos de *AtHB23* y *AtPHL1* se inducen en el funículo en comparación con las semillas, mientras que *AtHB13* y *AtPHR1*, considerados parálogos putativos, no están regulados de manera diferencial y no tienen un papel en este órgano (información suplementaria en Khan y col., 2015).

En este trabajo de Tesis, encontramos que AtHB23 se une a AtPHL1 en levaduras y hojas de tabaco transformadas en forma transitoria, mientras que el parálogo putativo AtHB13 no lo hace. A pesar de la gran similitud de secuencia entre AtHB23 y AtHB13 (Arce y col., 2011), esta observación fue consistente con las funciones no redundantes mostradas para ambos FT

(Ribone y col., 2015, Perotti y col., 2019). AtPHL1 y su supuesto parólogo AtPHR1 mostraron un escenario similar, por un lado tienen varias funciones redundantes, como la respuesta a inanición por Pi (Bustos y col., 2010), mientras que otras funciones son específicas. Por ejemplo, AtPHL1 juega un papel no redundante en la respuesta a N (Chutia y col., 2019, Varala y col., 2018).

En el trabajo presentado aquí, varias evidencias experimentales indicaron que AtPHL1 y AtHB23 actúan juntos. Apoyando esta afirmación, la interacción específica entre estas proteínas se demostró mediante dos técnicas independientes, Y2H y BiFC, mientras que no se detectó interacción en los mismos sistemas entre AtPHL1 y AtHB13. Se vio expresión de *AtHB23* y *AtPHL1* en los nodos pedicelo-silicua y en funículos, aunque su expresión no fue exclusiva de estos órganos (Figuras 21 y 22), y podrían tener funciones adicionales asociadas con otras proteínas o cuando las plantas están sujetas a factores externos. Aunque las plantas mutantes *phl1* y *amiR23* no mostraron fenotipos diferenciales significativos durante la etapa vegetativa, el día de *bolting* y el número de silicuas abiertas se vieron igualmente afectados por la falta de alguno de estos FT, lo que indica que cada uno necesita de su pareja para actuar (Figura 23). En concordancia con esta afirmación, la sobreexpresión de *AtPHL1* no afectó el tiempo de *bolting* ni la apertura de las silicuas, ya que el exceso de uno no implica el del otro FT, necesario para la función (Figura 31). En particular, el contenido de lípidos en las semillas también se redujo en las mutantes *phl1* y *amiR23*, mientras que las proteínas y los carbohidratos se mantuvieron en niveles similares a las plantas Col 0 (Figura 25). Estas observaciones nos llevaron a investigar dónde y cuándo se alteraron los eventos bioquímicos o fisiológicos en tales mutantes. Si bien el contenido de carbohidratos y otros parámetros fisiológicos como la biomasa de rosetas y tallos o el rendimiento de semillas no se vieron afectados, los contenidos de sacarosa y glucosa se redujeron significativamente en las silicuas jóvenes, aunque se equilibraron con los controles en las silicuas maduras (Figura 28). Todas estas observaciones sugirieron una limitación o enlentecimiento en el transporte de azúcares en una etapa de desarrollo específica. De hecho, encontramos que las plantas mutantes presentaron una reubicación de carbohidratos alterada (Figuras 26 y 27), lo que afectó significativamente el contenido de lípidos en las semillas (Figura 25). Los azúcares sintetizados se exportan desde los tejidos fotosintéticamente activos (fuentes) a los tejidos de consumo (sumideros). Se utilizan para el crecimiento y el desarrollo y se convierten en compuestos de almacenamiento (Julius y col., 2017). En plantas como *Arabidopsis*, el azúcar transportado de forma predominante es la sacarosa y, como toda semilla oleaginosa, las moléculas de almacenamiento son los lípidos. El contenido de lípidos en los cultivos de semillas oleaginosas

es un rasgo de selección importante para los mejoradores. La sobreexpresión de *LEAFY COTYLEDON1 (LEC1)* y *LEC1-LIKE (L1L)*, moduladores cruciales de la biosíntesis de ácidos grasos, generó niveles de lípidos mejorados entre un 2 % y un 20 % en las semillas de canola (Tan y col., 2011). En particular, la expresión de los transportadores de carbohidratos aumentó en esas plantas, lo que respalda el efecto del flujo de carbono en la biosíntesis de lípidos (Tan y col., 2011). La relación entre la disponibilidad de carbohidratos y la acumulación de lípidos también se demostró en plantas que sobreexpresan *Wrinkled1 (WRI1)*, un FT perteneciente a la familia APETALA2. BnWRI1 (*Brassica napus* WRI1) se une a la caja AW de genes involucrados en la biosíntesis y ensamblaje de ácidos grasos (Li y col., 2015). Su sobreexpresión conduce al mismo tiempo a la inducción de la glucólisis y la biosíntesis de lípidos durante el desarrollo temprano de la semilla, lo que respalda la relación entre la acumulación de aceite y la homeostasis del azúcar (Li y col., 2015). Consistentemente, la interrupción de la síntesis de almidón resultó en un aumento de la síntesis de lípidos. El mecanismo por el cual las vías metabólicas del almidón y los lípidos se relacionan con la modulación de la asignación de carbono se ha revelado mediante el uso de mutantes defectuosos en la biosíntesis del almidón y el bloqueo de la β -oxidación de los ácidos grasos peroxisomales (Yu y col., 2018, Fan y col., 2019). Se describieron varios FT más, involucrados en la acumulación de ácidos grasos durante el desarrollo de las semillas. Por ejemplo, AtWRKY6 regula el tamaño de la semilla, el contenido de ácidos grasos y la composición (Song y col., 2020). Otro ejemplo es FUCSA3, que promueve la acumulación de ácidos grasos mediante la regulación de genes implicados en la biosíntesis de estas moléculas (Wang y col., 2007, Zhang y col., 2016). SPATULA inhibe la expresión de genes de proteínas de almacenamiento de semillas, promoviendo concomitantemente la síntesis de ácidos grasos (Liu y col., 2017).

Sin embargo, ni la composición de lípidos ni el almacenamiento de proteínas mostraron diferencias en las semillas de *phl1* y *amiR23* (Figura 25 y Tabla 6). Eso indica que no se alteraron rutas de biosíntesis en particular, sino más bien la disponibilidad de sacarosa, el sustrato para la biosíntesis de lípidos. De hecho, se informó que el FT HD-Zip IV GLABRA2 promueve la formación de mucílago en la cubierta de la semilla, lo que evita que las semillas produzcan más aceite al disminuir la asignación de carbono al embrión (Shi y col., 2015).

Después de descartar un problema con la biosíntesis de ácidos grasos o las proteínas de almacenamiento, nos preguntamos qué vías moleculares estaban involucradas en las plantas mutantes *phl1* y *amiR23*. Los datos experimentales indicaron que el transporte de carbohidratos se retrasó y probablemente se redujo. Se detectaron varios transportadores de carbohidratos en los nodos pedicelo-silicua y en funículos, los tejidos donde se coexpresan

AtPHL1 y *AtHB23*. Entre ellos, los miembros de las dos grandes familias (SWEET, del inglés *Sugar will eventually be exported transporters* y SUC, *Sucrose transporters*), *SWEET10*, *SWEET11*, *SWEET12*, *SUC3*, *SUC4* y *SUC5* se expresan en pedicelos (Gibon y col., 2006, Mizzotti y col., 2018) y también en el funículo (Información suplementaria 1 en Khan y col., 2015). Es importante remarcar que en este tejido no se detectaron ni *AtHB13* ni *AtPHR1*. *AtHB13* (el parólogo de *AtHB23*; Henriksson y col., 2005, Arce y col., 2011) está involucrado en la germinación de semillas (Silva y col., 2016), lo que sugiere un papel en la degradación de reservas, a diferencia de *AtHB23* que participa de la síntesis de reservas, un evento de desarrollo contrastante al de su parólogo. La prueba de los niveles de transcripción de los transportadores de carbohidratos en el ARN obtenido de los pedicelos, incluidos los nodos pedicelo-silicua, resultó en la represión de *SWEET10* y *SWEET11*, mientras que otros presentaron diferencias sutiles que no resultaron estadísticamente significativas. *SWEET11* fue el primer transportador de esta clase que se caracterizó como transportador de glucosa (Chen y col., 2010). Junto con *SWEET12*, se les asignó un papel clave en la salida de sacarosa de las células del parénquima del floema, capaces de transportar glucosa, fructosa y sacarosa (Chen y col., 2012, Le Hir y col., 2015). Por otro lado, la expresión de *SWEET10*, también presente en las células del parénquima del floema, se reduce drásticamente en las hojas después de la transición floral y aumenta en los órganos reproductivos (Andrés y col., 2020). Este gen está regulado por *FLOWERING LOCUS T* durante la transición floral (Andrés y col., 2020). *SWEET10* y *SWEET11* podrían ser *targets* directos de *AtHB23* y *AtPHL1*. Sin embargo, ninguno de ellos exhibe un elemento *cis* perfecto reconocido por FT HD-Zip I en sus promotores. Por lo tanto, es probable que estos transportadores estén modulados indirectamente por *AtHB23* y *AtPHL1*, con la participación de otra proteína aún desconocida hasta el momento. Serán necesarios más estudios para dilucidar este punto. En particular, *SWEET11* se ha descrito como esencial para el llenado de granos en plantas de arroz (Yang y col., 2018, Fei y col., 2021). Curiosamente, la regulación del desarrollo de semillas que comprende la acumulación de reservas de almacenamiento, la latencia, la tolerancia a la desecación y la longevidad se propuso como una función coordinada de múltiples FT y no como una tarea individual (Alizadeh y col., 2021). Además, recientemente se ha revisado un número significativo de interacciones entre FT pertenecientes a diferentes familias (Bemer y col., 2017). Nuestros resultados sobre la interacción de *AtPHL1* y *AtHB23*, están de acuerdo con esta teoría.

5.2 AtHB23, AtMYB68 y AtPHL1 regulan en conjunto la respuesta a salinidad en raíces de Arabidopsis mediante una compleja interacción tejido-específica

La plasticidad de la raíz es crucial para la adaptación de la planta al suelo e implica el crecimiento o la detención de las raíces primarias (RP), laterales (RL) y de mayor orden. Estos eventos están finamente modulados por muchas biomoléculas, como los factores de transcripción (FT) y las fitohormonas. Muchos estudios detallados informaron la caracterización funcional de FT en la iniciación, emergencia y elongación de RL, así como en el crecimiento de la RP (Banda y col., 2019). Estos estudios se realizaron en condiciones normales de crecimiento y bajo diferentes factores de estrés (Ambastha y col., 2020, Verma y col., 2022). Sin embargo, la participación de un FT individual en la determinación de la arquitectura global, incluidas las RP y RL, es menos abundante. En el presente trabajo de Tesis informamos cómo interactúan tres FT, uno de tipo HD-Zip y dos miembros de la familia MYB, para activar o reprimir el desarrollo de la RP y RL, según las condiciones ambientales.

Previamente se demostró que AtHB23, la proteína más estudiada de estas tres, no es redundante con su supuesto parólogo AtHB13 en las raíces (Perotti y col., 2019). AtPHL1 se estudió sólo frente a la inanición de Pi en un papel secundario en comparación con su parólogo AtPHR1 (Bustos y col., 2010). AtMYB68 se expresa en el periciclo de la raíz del ecotipo Ler, en respuesta a señales ambientales (Feng y col., 2004), y se detectó expresión de la proteína en la raíz de Arabidopsis (Petricka y col., 2012). También se estudió en la etapa reproductiva, siendo determinante en el rendimiento de semillas, la tolerancia a sequía y a las altas temperaturas (Deng y col., 2020).

Varios miembros de la familia HD-Zip I se expresan en diferentes tejidos de la raíz (Perotti y col., 2021), y algunos se caracterizaron funcionalmente como involucrados en el desarrollo de la raíz (Miao y col., 2018, Mora y col., 2022). Las proteínas MYB-CC se estudiaron en varias especies, particularmente asociadas con la inanición de Pi (Bai y col., 2019, Bhutia y col., 2020). La gran familia MYB tiene muchos miembros bien caracterizados que actúan en las raíces. Por ejemplo, se demostró que AtMYB77 regula un subconjunto de genes sensibles a las auxinas durante el desarrollo de RL e interactuó *in vitro* con proteínas de tipo ARF. La mutante *knockout atmyb77* exhibe una menor densidad de RL que plantas Col 0 (Shin y col., 2007). Además, *AtMYB93* es un gen inducible por auxinas que actúa como un regulador negativo del desarrollo de RL en Arabidopsis, formando parte de un bucle de retroalimentación negativa desencadenado por auxinas, asegurando que las RL sólo se desarrollen cuando sea necesario (Gibbs y col., 2014). Finalmente, *AtMYB36* fue reportado como un regulador de la transición de

proliferación a diferenciación en la endodermis. La caracterización de las mutantes de *atmyb36* sugirió que este FT actúa como un regulador positivo de la diferenciación y negativo de la proliferación en los meristemas de la raíz (Lieberman y col., 2015).

Aunque existen diferencias significativas en el desarrollo de raíces dependiendo del ecotipo (Perotti y col., 2020), el patrón de expresión reportado en plantas de ecotipo Ler (Feng y col., 2004) fue similar al informado en este trabajo de Tesis.

Existe abundante literatura sobre la regulación transcripcional, postranscripcional y postraduccional de los FT, que influye en su estabilidad o actividad (Deribe y col., 2010, Nelson y Millar, 2015, Zhang y col., 2022, Zhu, 2016). Sin embargo, es difícil encontrar literatura que describa el funcionamiento de FT tanto en el desarrollo de RP como en el de RL y también sobre la asociación entre miembros de diferentes familias que actúan cooperativamente o de manera opuesta mediante asociaciones proteína-proteína. La partición de FT entre el núcleo y el citoplasma es un mecanismo esencial que regula los eventos de desarrollo y la adaptación (Allen y Strader, 2021). Tal es el caso de la interacción entre el FT HD-Zip I HaHB11 de *Helianthus annuus* y AtHB7 de *Arabidopsis*, modulada por la Kinesina13B (Miguel y col., 2020). Recientemente se informó que el módulo OsFTIP6-OsHB22-OsMYBR57 modula la tolerancia a sequía en arroz (Yang y col., 2022). En particular, OsHB22 es un FT HD-Zip I previamente informado como un regulador negativo en la tolerancia a la sal y la sequía mediada por ABA en arroz (Zhang y col., 2022). En los árboles filogenéticos se resuelve muy cerca de los miembros de *Arabidopsis* AtHB7 y AtHB12 (Agalou y col., 2008). Las mutantes de arroz en este gen se comportaron mejor que sus controles bajo estrés por sequía y no mostraron penalización en el rendimiento (Zhang y col., 2022). OsMYBR57 es una proteína de tipo MYB-*related*; su mutante mostró un fenotipo sensible a la sequía. Yang y col. (2022) revelaron que interactúa con el FT HD-Zip OsHB22, y ambos FT juntos modulan la expresión de varios FT bZIP que participan en la respuesta a la sequía. Otro ejemplo es la interacción en el núcleo entre XIW1 (proteína 1 WD40 que interactúa con XPO1) y ABI5 (ABA INSENSITIVE 5), modulando la respuesta ABA (Xu y col., 2020).

La coexpresión de FT en el mismo tejido, etapa de desarrollo y condición ambiental es un requisito absoluto para sugerir una interacción proteína-proteína. En el presente trabajo de Tesis demostramos que AtHB23, AtMYB68 y AtPHL1 se expresan en la punta de la RP y en etapas específicas del desarrollo de RL (Figura 34). Sorprendentemente, las mutantes *amiR68* exhibieron menos PRL, el fenotipo opuesto de las plantas *amiR23* (este trabajo de Tesis y Perotti y col., 2019), lo que sugiere que AtHB23 necesita a AtMYB68 para ejercer su función.

AtPHL1 no participa en el inicio de RL (Figura 37) pero sí en su alargamiento, teniendo un papel cooperativo con AtHB23, opuesto al de AtMYB68, al menos en condiciones normales (Figura 37). Con respecto al crecimiento de la RP, AtPHL1 y AtHB23 exhiben funciones opuestas (Figura 37).

AtMYB68 fue inducido por auxinas en el sistema vascular. Aunque no pudimos detectar su expresión en la punta de la raíz de las plántulas de *prAtMYB68:GUS*, afectó seriamente la distribución de auxinas en este tejido, como lo muestran las cruces *DR5:GUSxamiR68* (Figura 41). AtPHL1 no afectó la distribución de las auxinas en la punta de la RP y RL, pero sí en el sistema vascular. Entre los transportadores de auxinas, AUX1 participa en la iniciación de RL y LAX3 en la emergencia de RL (Marchant y col., 1999, 2002). AtHB23 regula a LAX3, mientras que AtMYB68 parece modular la expresión de AUX1 en RP y RL.

Los tres FT son inducidos en condiciones de salinidad ejerciendo funciones cooperativas (AtHB23 y AtMYB68) y opuestas (AtPHL1) (Figura 43). Al igual que las plantas *amiR23*, las plantas *amiR68* y AtPHL1 mostraron una capacidad de supervivencia reducida en NaCl 150 mM, acompañada de una menor capacidad para alargar las RP al explorar un medio menos salino. En cuanto a la elongación de RL, las plantas *amiR68* fueron menos penalizadas en NaCl que en las condiciones de control, mientras que las mutantes *phl1* perdieron su fenotipo más alargado.

En condiciones de estrés abiótico, la capacidad de supervivencia se correlacionó con la conservación o degradación de los amiloplastos en las células de la columela (Takahashi y col., 2003). El silenciamiento de *AtHB23* provocó la pérdida de los gránulos de almidón (Perotti y col., 2022). Después de analizar los amiloplastos en mutantes individuales y cruces, proponemos que la acción de *AtHB23* está finamente regulada, dado que este gen es necesario para lidiar con la salinidad y las plantas silenciadas no pueden sobrevivir en tales condiciones. El fenotipo bajo condiciones de salinidad de las plantas cruzadas apoyó esta interpretación (Figura 44). Se requiere la interacción con AtMYB68 para esta función, y AtPHL1 secuestra ambos FT mediante interacciones proteína-proteína para modular dicha respuesta (Figura 47), dado que la contribución del nivel transcripcional de regulación no fue significativa (Figura 36).

En conjunto, nuestros resultados indicaron una regulación fina del desarrollo primario y de RL en condiciones de crecimiento normales y salinas por la interacción entre AtHB23, AtMYB68 y AtPHL1 (Figura 47).

CONCLUSIONES

*"La inspiración existe, pero tiene
que encontrarte trabajando."*

Pablo Picasso.

6. CONCLUSIONES

Del presente trabajo de Tesis podemos remarcar las siguientes conclusiones generales:

- ❖ Los factores de transcripción de *Arabidopsis thaliana* AtHB23 y AtPHL1 interactúan en los nodos pedicelo-silicua y en el funículo, promoviendo el transporte de carbohidratos a través de la inducción de los transportadores de azúcares *SWEET10* y *SWEET11*. La mutación de los genes que codifican estas proteínas regulatorias provoca un enlentecimiento del transporte de sacarosa a las semillas, disminuyendo el contenido de lípidos, pero no su composición.
- ❖ Los factores de transcripción AtHB23, AtMYB68 y AtPHL1 interactúan entre sí en el sistema radicular, promoviendo una modulación fina del desarrollo primario y de raíces laterales, tanto en condiciones normales de crecimiento como en la respuesta a la salinidad del medio.

BIBLIOGRAFÍA

*"Si me caí es porque estaba caminando,
y caminar vale la pena, aunque te caigas."*

Eduardo Galeano.

6. BIBLIOGRAFÍA

Agalou A, Purwantomo S, Overnäs E, Johannesson H, Zhu X, Estiati A, de Kam RJ, Engström P, Slamet-Loedin IH, Zhu Z, Wang M, Xiong L, Meijer AH y Ouwerkerk PB (2008). *A genome-wide survey of HD-Zip genes in rice and analysis of drought-responsive family members*. *Plant Molecular Biology*, 66(1-2), 87-103

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K y Walter P (2002). *Molecular Biology of The Cell*. Fourth Edition. Garland Science. New York

Alboresi A, Gestin C, Leydecker MT, Bedu M, Meyer C y Truong HN (2005). *Nitrate, a Signal Relieving Seed Dormancy in Arabidopsis*. *Plant Cell & Environment*, 28, 500–512

Alizadeh M, Hoy R, Lu B y Song L (2021). *Team effort: combinatorial control of seed maturation by transcription factors*. *Current Opinion in Plant Biology*, 63, 102091

Allen JR y Strader LC (2021). *Nucleocytoplasmic partitioning as a mechanism to regulate Arabidopsis signaling events*. *Current Opinion in Cell Biology*, 69, 136-141

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW y Lipman DJ (1990). *Basic local alignment search tool*. *Journal of Molecular Biology*, 215 (3), :403-410

Ambastha V, Friedmann Y y Leshem Y (2020). *Laterals take it better - Emerging and young lateral roots survive lethal salinity longer than the primary root in Arabidopsis*. *Scientific Reports*, 10(1), 3291

Andrés F, Kinoshita A, Kalluri N, Fernández V, Falavigna VS, Cruz TMD, Jang S, Chiba Y, Seo M, Mettler-Altmann T, Huettel B y Coupland G (2020). *The sugar transporter SWEET10 acts downstream of FLOWERING LOCUS T during floral transition of Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 20, 53

Aoyama T, Dong CH, Wu Y, Carabelli M, Sessa G, Ruberti I, Morelli G y Chua NH (1995). *Ectopic expression of the Arabidopsis transcriptional activator Athb-1 alters leaf cell fate in tobacco*. The Plant Cell 7 (11), 1773-1785

Arabidopsis Interactome Mapping Consortium (2011). *Evidence for network evolution in an Arabidopsis interactome map*. Science, 333, 601–607

Arc E, Galland M, Godin B, Cueff G y Rajjou L (2013). *Nitric Oxide Implication in the Control of Seed Dormancy and Germination*. Frontiers in Plant Science, 4, 346

Arce AL, Raineri J, Capella M, Cabello JV y Chan RL (2011). *Uncharacterized conserved motifs outside the HD-Zip domain in HD-Zip subfamily I transcription factors; a potential source of functional diversity*. BMC Plant Biology, 11 (1), 42

Ariel FD, Manavella PA, Dezar CA y Chan RL (2007). *The true story of the HD-Zip family*. Trends in Plant Science, 12 (9), 419-426

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA y Struhl K (1983). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York

Bai J, Sun F, Wang M, Su L, Li R y Caetano-Anollés G (2019). *Genome-wide analysis of the MYB-CC gene family of maize*. Genetica, 147(1), 1-9

Bainbridge K, Guyomarc'h S, Bayer E, Swarup R, Bennett M, Mandel T y Kuhlemeier C (2008). *Auxin influx carriers stabilize phyllotactic patterning*. Genes & Development, 22 (6), 810-823

Balanzá V, Navarrete M, Trigueros M y Ferrándiz C (2006). *Patterning the female side of Arabidopsis: the importance of hormones*. Journal of Experimental Botany, 57, 3457–34693

Ballester P y Ferrándiz C (2017). *Shattering fruits: variations on a dehiscent theme*. Current Opinion in Plant Biology, 35, 68–75

Barclay GF (2015). *Anatomy and Morphology of Seed Plants*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, pp.1-20.

Baskin J y Baskin C (2004). *A classification system for seed dormancy*. *Seed Science Research*, 14(1), 1-16

Baud S, Boutin JP, Miquel M, Lepiniec L y Rochat C (2002). *An integrated overview of seed development in Arabidopsis thaliana ecotype WS*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 151-160

Baud S y Graham IA (2006). *A spatiotemporal analysis of enzymatic activities associated with carbon metabolism in wild-type and mutant embryos of Arabidopsis using in situ histochemistry*. *The Plant Journal*, 46, 155-169

Baud S, Dubreucq B, Miquel M, Rochat C y Lepiniec L (2008). *Storage Reserve Accumulation in Arabidopsis: Metabolic and Developmental Control of Seed Filling*. *The Arabidopsis Book*, 6:e0113

Bemer M, van Dijk ADJ, Immink RGH, Angenent GC (2017). *Cross-family transcription factor interactions: an additional layer of gene regulation*. *Trends in Plant Science*, 22, 66–80

Bhutia KL, Nongbri EL, Gympad E, Rai M y Tyagi W (2020). *In silico characterization, and expression analysis of rice golden 2-like (OsGLK) members in response to low phosphorous*. *Molecular Biology Reports*, 47(4), 2529-2549.

Biere A (1991). *Parental Effects in Lychnis Flos-Cuculi. I: Seed Size, Germination and Seedling Performance in a Controlled Environment*. *Journal of Evolutionary Biology*, 4, 447–465

Birnboim HC y Doly J (1979). *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. *Nucleic Acids Research*, 7, 1513–1523

Boorer KJ, Loo DDF, Frommer WB y Wright EM (1996). *Transport mechanism of the cloned potato H⁺/sucrose cotransporter StSUT1*. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 25139–25144

Bornberg-Bauer E, Beaussart F, Kummerfeld SK, Teichmann SA y Weiner J (2005). *The evolution of domain arrangements in proteins and interaction networks*. Cellular and Molecular Life Sciences, 62 (4), 435-445

Bradford MM (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, 72, 248–254

Bradshaw AD (1965). *Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants*. Advances in Genetics, 13, 115–155

Braun DM (2022). *Phloem Loading and Unloading of Sucrose: What a Long, Strange Trip from Source to Sink*. Annual Review of Plant Biology, 73, 553–584

Brundrett MC (2002). *Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants*. New Phytologist 154, 275–304.

Buchanan BB, Gruissem W y Jones RL (2015). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. John Wiley & Sons, Ltd.

Bustos R, Castrillo G, Linhares F, Puga MI, Rubio V, Perez-Perez J, Solano R, Leyva A y Paz-Ares J (2010). *A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in Arabidopsis*. PLOS Genetics, 6:e1001102

Capella M, Ré DA, Arce AL y Chan RL (2014). *Plant homeodomain-leucine zipper I transcription factors exhibit different functional AHA motifs that selectively interact with TBP or/and TFIIB*. Plant Cell Reports, 33, 955–967

Capella M, Ribone PA, Arce AL y Chan RL (2015). *Homeodomain-Leucine Zipper Transcription Factors: Structural Features of These Proteins, Unique to Plants*. Plant Transcription Factors: Evolutionary, Structural and Functional Aspects. Elsevier Inc.

Capella M, PA Ribone, AL Arce y RL Chan (2016). *Homeodomain Leucine Zipper Transcription Factors: Structural Features of These Proteins, Unique to Plants, En: Plant Transcription Factors evolutionary, structural, and functional aspects*. Edited by Daniel Gonzalez. Elsevier, p: 113-126

Casero PJ, Casimiro I y Lloret PG (1995). *Lateral root initiation by asymmetrical transverse divisions of pericycle cells in 4 plant-species – Raphanus sativus, Helianthus annuus, Zea mays, and Daucus carota*. Protoplasma, 188, 49–58

Chan RL, GM Gago, CM Palena y DH González (1998). *Homeoboxes in plant development*. Biochimica et Biophysica Acta, 1442 (1), 1-19

Chapin FS, Schulze ED y Mooney HA (1990). *The Ecology and Economics of Storage in Plants*. Annual Review of Ecology and Systematics, 21, 423-447

Charrier B, Champion A, Henry Y y Kreis M (2002). *Expression profiling of the whole Arabidopsis Shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction*. Plant Physiology, 130 (2), 577-590

Chen S, Peng S, Huang G, Wu K, Fu X y Chen Z (2003). *Association of decreased expression of a Myb transcription factor with the TPD (tapping panel dryness) syndrome in Hevea brasiliensis*. Journal of Plant Molecular Biology, 51, 51–58.

Chen LQ, Hou BH, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu XQ, Guo WJ, Kim JG, Underwood W, Chaudhuri B, Chermak D, Antony G, White FF, Somerville SC, Mudgett MB y Frommer WB (2010). *Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens*. Nature, 468, 527–532

Chen LQ, Qu XQ, Hou BH, Sosso D, Osorio S, Fernie AR, Frommer WB (2012). *Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport*. Science, 335, 207–211

Chen LQ (2014). *SWEET sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition*. New Phytologist, 201(4), 1150–1155

Chen LQ, Lin IW, Qu XQ, Sosso D, McFarlane HE, Londono A, Samuels AI y Frommer WB (2015). *A cascade of sequentially expressed sucrose transporters in the seed coat and endosperm provides nutrition for the Arabidopsis embryo*. *The Plant Cell*, 27, 607–619

Chinnusamy V, Jagendorf A y Zhu JK (2005). *Understanding and improving salt tolerance in plants*. *Crop Science*, 45, 437–448

Chiou C y Yeh K. (2008). *Differential expression of MYB gene (OgMYB1) determines color patterning in floral tissue of oncidium gower ramsey*. *Plant Molecular Biology*, 66, 379–388.

Choi H, Jeong S, Kim DS, Na HJ, Ryu JS, Lee SS, Nam HG, Lim PO y Woo HR (2014). *The homeodomain-leucine zipper ATHB23, a phytochrome B-interacting protein, is important for phytochrome B-mediated red light signaling*. *Physiologia Plantarum*, 150, 308–320

Chomczynski P y Sacchi N (1987). *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Analytical Biochemistry*, 162 (1), 156-159

Chrispeels M y Sadava D (2003). *Plants, genes and Crop Biotechnology*. American Society of Plant Biologists, second edition

Chutia R, Abel S y Ziegler J (2019). *Iron and phosphate deficiency regulators concertedly control coumarin profiles in Arabidopsis thaliana roots during iron, phosphate, and combined deficiencies*. *Frontiers in Plant Science*, 10, 113

Clough SJ y Bent AF (1998). *Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16, 735–743

Clowes FAL (1954). *The promeristem and minimal construction centre in grass roots*. *New Phytologist*, 52, 48-57

Daws MI, Cleland H, Chmielarz P, Gorian F, Leprince O, Mullins CE, Thanos CA, Vandvik V y Pritchard HW (2006). *Variable Desiccation Tolerance in Acer pseudoplatanus Seeds in Relation to Developmental Conditions: A Case of Phenotypic Recalcitrance?*. Functional Plant Biology, 33, 59–66

De Jong M y Leyser O (2012). *Developmental Plasticity in Plants*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 77: 63-73. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Volume LXXVII.

Deng M, Wang Y, Kuzma M, Chalifoux M, Tremblay L, Yang S, Ying J, Sample A, Wang HM, Griffiths R, Uchacz T, Tang X, Tian G, Joslin K, Dennis D, McCourt P, Huang Y y Wan J (2020). *Activation tagging identifies Arabidopsis transcription factor AtMYB68 for heat and drought tolerance at yield determining reproductive stages*. The Plant Journal, 104(6), 1535-1550

Deribe YL, Pawson T y Dikic I (2010). *Post-translational modifications in signal integration*. Nature Structural & Molecular Biology, 17(6), 666-672

Ding Z y De Smet I (2013). *Localized ABA signaling mediates root growth plasticity*. Trends in Plant Science, 18 (10), 533-535

Dinneny JR, Long TA, Wang JY, Jung JW, Mace D, Pointer S, Barron C, Brady SM, Schiefelbein J y Benfey PN (2008). *Cell identity mediates the response of Arabidopsis roots to abiotic stress*. Science, 320,: 942–945

Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P y Poethig S (1993). *Cellular organization of the Arabidopsis thaliana root*. Development, 119, 71–84

Döring P, Treuter E, Kistner C, Lyck R, Chen A y Nover L (2000). *The role of AHA motifs in the activator function of tomato heat stress transcription factors HsfA1 and HsfA2*. The Plant Cell, 12 (2), 265-278

Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C y Lepiniec L (2010). *MYB transcription factors in Arabidopsis*. Trends in Plant Science, 15 (10), 573-581

Durand M, Porcheron B, Hennion N, Maurousset L, Lemoine R, Pourtau N (2016). *Water deficit enhances C export to the roots in Arabidopsis thaliana plants with contribution of sucrose transporters in both shoot and roots*. Plant Physiology, 170, 1460–1479

El-Kereamy A, Bi YM, Ranathunge K, Beatty PH, Good AG y Rothstein SJ (2012). *The rice R2R3-MYB transcription factor OsMYB55 is involved in the tolerance to high temperature and modulates amino acid metabolism*. PLoS One, 7(12), e52030

Eom JS, Chen LQ, Sosso D, Julius BT, Lin IW, Qu XQ, Braun DM y Frommer WD (2015). *SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation*. Current Opinion in Plant Biology, 25, 53–62

Esau K (1965). *Plant Anatomy: Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function, and Development*. New York: Wiley, Third Edition.

Fan J, Zhou C, Yu L, Li P, Shanklin J y Xu C (2019). *Diversion of carbon flux from sugars to lipids improves the growth of an Arabidopsis starchless mutant*. Plants, 8, 229

Fei H, Yang Z, Lu Q, Wen Q, Zhang Y, Zhang A y Lu C (2021). *OsSWEET14 cooperates with OsSWEET11 to contribute to grain filling in rice*. Plant Science, 306, 110851

Feng C, Andreasson E, Maslak A, Mock HP, Mattsson O, Mundy J (2004). *Arabidopsis MYB68 in development and responses to environmental cues*. Plant Science, 167, 5, 1099-1107

Fenner M (1991). *The Effects of the Parent Environment on Seed Germinability*. Seed Science Research, 1, 75–84

Ferrándiz C (2002). *Regulation of fruit dehiscence in Arabidopsis*. Journal of Experimental Botany, 53(377), 2031-2038

Finch-Savage WE y Leubner-Metzger G (2006). *Seed Dormancy and the Control of Germination*. New Phytologist, 171, 501–523

Fitter AH (1987). *An architectural approach to the comparative ecology of plant-root systems*. New Phytologist, 106, 61–77

Gahrtz M, Stolz J y Sauer N (1994). *A phloem-specific sucrose-H⁺ symporter from Plantago major L. supports the model of apoplastic phloem loading*. The Plant Journal, 6, 697–706

Gamborg OL, Miller RA y Ojima K (1968). *Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells*. Experimental Cell Research, 50, 151-158

Garberl RL, Kuroiwa A y Gehring WJ (1983). *Genomic and cDNA clones of the homeotic locus Antennapedia in Drosophila*. The EMBO Journal, 2(11), 2027- 2036

Gibbs DJ, Voß U, Harding SA, Fannon J, Moody LA, Yamada E, Swarup K, Nibau C, Bassel GW y Choudhary A (2014). *AtMYB93 is a novel negative regulator of lateral root development in Arabidopsis*. New Phytologist, 203, 1194–1207

Gibon Y, Usadel B, Blaesing OE, Kamlage B, Hoehne M, Trethewey R y Stitt M (2006). *Integration of metabolite with transcript and enzyme activity profiling during diurnal cycles in Arabidopsis rosettes*. Genome Biology, 7, R76

Gietz D, Jean AS, Woods RA y Schiestl RH (1992). *Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells*. Nucleic Acids Research, 20, 1425

Gifford ML, Dean A, Gutierrez RA, Coruzzi GM y Birnbaum KD (2008). *Cell-specific nitrogen responses mediate developmental plasticity*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 105, 803–808

Gigolashvili T, Berger B, Mock HP, Müller C, Weisshaar B y Flügge UI (2007). *The transcription factor HIG1/MYB51 regulates indolic glucosinolate biosynthesis in Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal, 50, 886–901

Goldberg RB, de Paiva G y Yadegari R (1994). *Plant embryogenesis: zygote to seed*. Science, 266, 605-614

González-Carranza ZH, Lozoya-Gloria E y Roberts JA (1998). *Recent developments in abscission: shedding light on the shedding process*. Trends in Plant Science, 3, 10–14

Hanahan D (1983). *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. Journal of Molecular Biology, 166, 557-580

Harada JJ (1997). *Seed Maturation and Control of Germination*. In: Larkins, B.A., Vasil, I.K. (eds) *Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development*. Advances in Cellular and Molecular Biology of Plants, vol 4, Springer, Kluwer academic publishers, Dortmund, pp 545-592

Harris JC, Hrmova M, Lopato S y Langridge P (2011). *Modulation of plant growth by HDZip class I and II transcription factors in response to environmental stimuli*. New Phytologist, 190(4), 823-837

Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK y Bohnert HJ (2000). *Plant cellular and molecular responses to high salinity*. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 51, 463–499

Hellens R, Mullineaux P y Klee H (2000). *Technical Focus: a guide to Agrobacterium binary Ti vectors*. Trends in Plant Science, 5, 446–451

Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, Bean S y Mullineaux PM (2000). *pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation*. Plant Molecular Biology, 42, 819-832

Henriksson E, Olsson AS, Johansson H, Hanson J, Engstrom P, Soderman E (2005). *Homeodomain leucine zipper class I genes in Arabidopsis. Expression patterns and phylogenetic relationships*. Plant Physiology, 139, 509–518

Hills M (2004). *Control of storage-product synthesis in seeds*. Current Opinion in Plant Biology, 7, 302-308

Himmelbach A, Hoffmann T, Leube M, Höhener B, Grill E (2002). *Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in Arabidopsis*. The EMBO Journal, 21 (12), 3029-3038

Hoffmann AA y Sgrò CM (2011). *Climate change and evolutionary adaptation*. Nature, 470, 479–485

Huang Z, Footitt S, Finch-Savage WE (2014). *The Effect of Temperature on Reproduction in the Summer and Winter Annual Arabidopsis thaliana Ecotypes Bur and Cvi*. Annals of Botany, 113, 921–929

Iyer-Pascuzzi AS, Jackson T, Cui H, Petricka JJ, Busch W, Tsukagoshi H y Benfey PN (2011). *Cell identity regulators link development and stress responses in the Arabidopsis root*. Developmental Cell, 21, 770–782

James P, Halladay J y Craig EA (1996). *Genomic Libraries and a Host Strain Designed for Highly Efficient Two-Hybrid Selection in Yeast*. Genetics, 144(4), 1425–1436

Jefferson RA, Kavanagh TA y Bevan MW (1987). *GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants*. The EMBO Journal, 6, 3901-3907

Jenkins ES, Paul W, Craze M, Whitelaw CA, Weigand A y Roberts JA (1999). *Dehiscence-related expression of an Arabidopsis thaliana gene encoding a polygalacturonase in transgenic plants of Brassica napus*. Plant Cell & Environment, 22, 159–167

Jiang L, Wang Y, Li QF, Bjorn LO, He JX y Li SS (2012). *Arabidopsis STO/BBX24 negatively regulates UV-B signaling by interacting with COP1 and repressing HY5 transcriptional activity*. Cell Research, 22, 1046–1057

Jiang M, Deng Z, White RG, Jin T y Liang D (2019). *Shootward movement of CFDA tracer loaded in the bottom sink tissues of Arabidopsis*. Journal of Visualized Experiments, 147, e59606.

Jinlu L, Hana G, Sunb C y Sui N (2019). *Research advances of MYB transcription factors in plant stress resistance and breeding*. Plant Signaling & Behaviour, 14(8), e1613131

Jolma A, Yin Y y Nitta K (2015). *DNA-dependent formation of transcription factor pairs alters their binding specificity*. Nature, 527, 384–388

Julius BT, Leach KA, Tran TM, Mertz RAM, Braun D (2017). *Sugar transporters in plants: new insights and discoveries*. Plant & Cell Physiology, 58, 1442–1460

Jump AS y Peñuelas J (2005). *Running to stand still: adaptation and the response of plants to rapid climate change*. Ecology Letters, 8, 1010–1020

Jung C, Seo J, Han S, Koo, YJ, Kim, CH, Song, SI, Nahm, BH, Choi, YD y Cheong, JJ (2007). *Overexpression of AtMYB44 enhances stomatal closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic Arabidopsis*. Journal of Plant Physiology, 146:, 623–635

Kang YH, Kirik V, Hulskamp M, Nam KH, Hagely K, Lee MM, Schiefelbein J (2009). *The MYB23 gene provides a positive feedback loop for cell fate specification in the Arabidopsis root epidermis*. The Plant Cell, 21(4), 1080-1094

Karimi M, Inzé D y Depicker A (2002). *GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation*. Trends in Plant Science, 7, 193–195

Khan D, Millar JL, Girard IJ, Chan A, Kirkbride RC, Pelletier JM, Kost S, Becker MG, Yeung EC, Stasolla C, Goldberg RB, Harada JJ y Belmonte MF (2015). *Transcriptome atlas of the Arabidopsis funiculus – a study of maternal seed subregions*. The Plant Journal, 82, 41–53

Kiss JZ, Hertel R y Sack FD (1989). *Amyloplasts are necessary for full gravitropic sensitivity in roots of Arabidopsis thaliana*. Planta, 177, 198-206

Knoblauch M y Peters WS (2017). *What actually is the Münch hypothesis? A short history of assimilate transport by mass flow*. International Journal of Plant Biology, 59: 292–310

Korver RA, Koevoets IT, Testerink C (2018). *Out of shape during stress: a key role for auxin*. Trends in Plant Science, 23, 783–793

Kühn C y Grof CPL (2010). *Sucrose transporters of higher plants*. Current Opinion in Plant Biology, 13(3), 287–297

Lacey E, Smith S y Case A (1997). *Parental Effects on Seed Mass: Seed Coat but Not Embryo/Endosperm Effects*. American Journal of Botany, 84, 1617

Lambers H, Chapin FS y Pons TL (2008). *Plant physiological ecology*. Springer 2nd edition.

Lamers J, van der Meer T y Testerink C (2020). *How plants sense and respond to stressful environments*. Plant Physiology, 182, 1624–1635

Landschulz WH, Johnson PF y McKnight SI (1988). *The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins*. Science, 240, 1759–1764

Le Hir R, Spinner L, Klemens PA, Chakraborti D, de Marco F, Vilaine F, Wolff N, Lemoine R, Porcheron B, Ery CG, eoul'e ET, Chabout S, Mouille G, Neuhaus HE, Dinant S, Bellini C (2015). *Disruption of the sugar transporters AtSWEET11 and AtSWEET12 affects vascular development and freezing tolerance in Arabidopsis*. Molecular Plant, 8, 1687–1690

Leitz G, Kang BH, Schoenwaelder ME y Staehelin LA (2009). *Statolith sedimentation kinetics and force transduction to the cortical endoplasmic reticulum in gravity-sensing Arabidopsis columella cells*. The Plant Cell, 21, 843-860

Lemoine R, La Camera S, Atanassova R, Dédaldéchamp F, Allario T, Pourtau N, Bonnemain J-L, Laloi M, Coutos-Thévenot P y Maurousset L (2013). *Source to sink transport and regulation by environmental factors*. Frontiers in Plant Science, 4, 272

Leprince O, Pellizzaro A, Berriri S y Buitink J (2017). *Late seed maturation: drying without dying*. Journal of Experimental Botany, 68, 4, 827–841

Li H, Testerink C y Zhang Y (2021). *How roots and shoots communicate through stressful times*. Trends in Plant Science, 26, 940–952

Li J y Chory, J. (1998). *Preparation of DNA from Arabidopsis*. Methods in Molecular Biology, Arabidopsis Protocols. Martinez-Zapateur J. M. and Salinas, J. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.

Li Q, Shao J, Tang S, Shen Q, Wang T, Chen W y Hong Y (2015). *Wrinkled1 accelerates flowering and regulates lipid homeostasis between oil accumulation and membrane lipid anabolism in Brassica napus*. Frontiers in Plant Science, 6, 1015

Lieberman LM, Sparksa EE, Moreno-Risueno MA, Petricka JJ y Benfey PN (2015). *MYB36 regulates the transition from proliferation to differentiation in the Arabidopsis root*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 112, 12099–12104

Liu BH, Hua CM y Song G (2017). *The SPATULA transcription factor regulates seed oil content by controlling seed specific genes in Arabidopsis thaliana*. Journal of Plant Growth Regulation, 82, 111–121

Liu Y, Xu J, Guo S, Yuan X, Zhao S, Tian H, Dai S, Kong X y Ding Z (2020). *AtHB7/12 regulate root growth in response to aluminum stress*. International Journal of Molecular Sciences, 21 (11), 1-15

Livak KJ y Schmittgen TD (2001.) *Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct method*. Methods, 25 (4), 402-408

Ludewig F y Flügge UI (2013). *Role of metabolite transporters in source-sink carbon allocation*. Frontiers in Plant Science, 4, 231

Lynch J (1995). *Root architecture and plant productivity*. Plant Physiology, 109, :7–13

Malamy JE y Benfey PN (1997). *Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana*. *Development*, 124 (1), 33-44

Marchant A, Kargul J, May ST, Muller P, Delbarre A, Perrot-Rechenmann P y Bennett MJ (1999). *AUX1 regulates root gravitropism in Arabidopsis by facilitating auxin uptake within root apical tissues*. *The EMBO Journal*, 18(8), 2066-2073

Marin E, Jouannet V, Herz A, Lokerse AS, Weijers D, Vaucheret H, Nussaume L, Crespi MD y Maizel A (2010). *MiR390, Arabidopsis TAS3 tasiRNAs, and their AUXIN RESPONSE FACTOR targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth*. *The Plant Cell*, 22, 1104-1117

Martin C (1997). *MYB transcription factors in plants*. *Trends in Genetics*, 13, 67–73.

Matakiadis T, Alboresi A, Jikumaru Y, Tatematsu K, Pichon O, Renou JP, Kamiya Y, Nambara E, Truong HN (2009). *The Arabidopsis Abscisic Acid Catabolic Gene CYP707A2 Plays a Key Role in Nitrate Control of Seed Dormancy*. *Plant Physiology*, 149, 949–960

Matesanz S, Gianoli E y Valladares F (2010). *Global change and the evolution of phenotypic plasticity in plants*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1206, 35–55

Mazur B, Krebbers E y Tingey S (1999). *Gene discovery and product development for grain quality traits*. *Science*, 285, 372-375

Miao ZQ, Zhao PX, Mao JL, Yu LH, Yuan Y, Tang H, Liu ZB y Bin Xiang C (2018). *HOMEBOX PROTEIN52 mediates the crosstalk between ethylene and auxin signaling during primary root elongation by modulating auxin transport-related gene expression*. *The Plant Cell*, 30(11), 2761-2778

Miguel VN, Manavella PA, Chan RL y Capella M (2020). *The AtHB1 Transcription Factor Controls the miR164-CUC2 Regulatory Node to Modulate Leaf Development*. *Plant & Cell Physiology*, 61(3), 659–670

Miguel VN, Ribichich KF, Giacomelli JI, Chan RL (2020b). *Key role of the motor protein Kinesin 13B in the activity of homeodomain-leucine zipper I transcription factors*. *Journal of Experimental Botany*, 71, 20, 6282–6296

Mitsuda N y Ohme-Takagi M (2009). *Functional analysis of transcription factors in arabidopsis*. *Plant & Cell Physiology*, 50 (7), 1232-1248

Mizzotti C, Rotasperti L, Moretto M, Tadini L, Resentini F, Galliani BM, Galbiati M, Engelen K, Pesaresi P y Masiero S (2018). *Time-course transcriptome analysis of Arabidopsis siliques discloses genes essential for fruit development and maturation*. *Plant Physiology*, 178, 1249–1268

Moens CB y Selleri L (2006). *Hox cofactors in vertebrate development*. *Developmental Biology*, 291(2), 193-206

Mora CC, Perotti MF, González-Grandío E, Ribone PA, Cubas P y Chan RL (2022). *AtHB40 modulates primary root length and gravitropism involving CYCLINB and auxin transporters*. *Plant Science*, 324, 111421

Morita MT y Tasaka M (2004). *Gravity sensing and signaling*. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 712–718

Morton T, Petricka J, Corcoran DL, Li S, Winter CM, Carda A, Benfey PN, Ohler U y Megraw M (2014). *Paired-end analysis of transcription start sites in Arabidopsis reveals plant-specific promoter signatures*. *The Plant Cell*, 26(7), 2746-2760

Mukherjee K, Brocchieri L y Bürglin TR (2009). *A comprehensive classification and evolutionary analysis of plant homeobox genes*. *Molecular Biology and Evolution*, 26(12), 2775-2794

Murashige T y Skoog F (1962). *A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures*. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497

Nelson CJ y Millar AH (2015). *Protein turnover in plant biology*. *Nature Plants* 1, 15017

Noda KI, Glover BJ, Linstead P y Martin C (1994). *Flower colour intensity depends on specialized cell shape controlled by a Myb-related transcription factor*. *Nature*, 369, 661–664

O'Neill CM, Gill S, Hobbs D, Morgan C y Bancroft I (2003). *Natural variation for seed oil composition in Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 64, 1077-1090

Ogata K, Kanei Ishii C, Sasaki M, Hatanaka H, Nagadoi A, Enari M, Nakamura H, Nishimura Y, Ishii S y Sarai A (1996). *The cavity in the hydrophobic core of Myb DNA binding domain is reserved for DNA recognition and trans-activation*. *Nature Structural Biology*, 3, 178–187

Ohshima T, Hayashi H y Chino M (1990). *Collection and chemical composition of pure phloem sap from Zea mays L*. *Plant & Cell Physiology*, 31, 735–737

Olsson A, Engström P, Söderman E (2004). *The homeobox genes ATHB12 and ATHB7 encode potential regulators of growth in response to water deficit in Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 55(5), 663-677

Ooms G, Hooykaas PJ, Van Veen RJ, Van Beelen P, Regensburg-Tuink TJ y Schilperoort RA (1982). *Octopine Ti-plasmid deletion mutants of Agrobacterium tumefaciens with emphasis on the right side of the T-region*. *Plasmid*, 7, 15-29

Osmont KS, Sibout R y Hardtke CS (2007). *Hidden Branches: Developments in Root System Architecture*. *Annual Review of Plant Biology*, 58, :93–113

Østergaard L (2009). *Don't "leaf" now. The making of a fruit*. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 36–41

Palena CM, Gonzalez DH y Chan RL (1999). *A monomer-dimer equilibrium modulates the interaction of the sunflower homeodomain leucine-zipper protein Hahb-4 with DNA*. *Biochemical Journal*, 341, 81-87

Palena CM, Tron AE, Bertoncini CW, Gonzalez DH y Chan RL (2001). *Positively charged residues at the N-terminal arm of the homeodomain are required for efficient DNA binding by homeodomain-leucine zipper proteins*. Journal of Molecular Biology, 308(1), 39-47

Patrick JW y Offler CE (2001). *Compartmentation of transport and transfer events in developing seeds*. Journal of Experimental Botany 52, 551-564

Perotti MF, Ribone PA, Cabello JV, Ariel FD y Chan RL (2019). *AtHB23 participates in the gene regulatory network controlling root branching, and reveals differences between secondary and tertiary roots*. The Plant Journal, 100, 1224–1236

Perotti MF, Ariel FD y Chan RL (2020). *Lateral root development differs between main and secondary roots and depends on the ecotype*. Plant Signaling & Behavior, 15, 1755504

Perotti MF, Arce AL y Chan RL (2021). *The underground life of homeodomain-leucine zipper transcription factors*. Journal of Experimental Botany, 72(11), 4005-4021

Perotti MF, Arce AL, Ariel FD, Figueroa CM, Chan RL (2022). *The transcription factor AtHB23 modulates starch turnover for root development and plant survival under salinity*. Environmental and Experimental Botany, 201, 104994.

Peters, NCB (1982). *The Dormancy of Wild Oat Seed (Avena fatua L.) from Plants Grown under Various Temperature and Soil Moisture Conditions*. Weed Research, 1982, 22, 205–212

Petricka JJ, Schauer MA, Megraw M, Breakfield NW, Thompson JW, Georgiev S, Soderblom EJ, Ohler U, Moseley MA, Grossniklaus U y Benfey PN (2012). *The protein expression landscape of the Arabidopsis root*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 109(18), 6811-6818

Raven PH, Evert RF y Eichhorn SE (2013). *Biology of plants*. W.H. Freeman and Company Publishers 8th edition.

Ré DA, Capella M, Bonaventure G y Chan RL (2014). *Arabidopsis AtHB7 and AtHB12 evolved divergently to fine tune processes associated with growth and responses to water stress*. BMC Plant Biology, 14 (1), 150

Rhee DY, Cho DY, Zhai B, Slattery M, Ma L, Mintseris J, Wong CY, White KP, Celniker SE, Przytycka TM, Gygi SP, Obar RA y Artavanis-Tsakonas S (2014). *Transcription factor networks in Drosophila melanogaster*. Cell Reports, 8(6), 2031-2043

Ribone PA, Capella M y Chan RL (2015). *Functional characterization of the homeodomain leucine zipper I transcription factor AtHB13 reveals a crucial role in Arabidopsis development*. Journal of Experimental Botany, 66(19), 5929-5943

Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C y Keddie J (2000). *Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes*. Science, 290, 2105 – 2110

Riechmann JL (2002). *Transcriptional regulation: a genomic overview*. The Arabidopsis Book, Eds: C.R. Somerville y E.M. Meyerowitz, Rockville, MD: American Society of Plant Biologists 1, e0085.

Roberts JA, Elliott KA y Gonzalez-Carranza ZH (2002). *Abscission, dehiscence, and other cell separation processes*. Annual Review of Plant Biology, 53, 131–158

Robles P y Pelaz S (2005). *Flower and fruit development in Arabidopsis thaliana*. The International Journal of Developmental Biology, 49, 633-643

Rosinski JA y Atchley WR (1997). *Molecular Evolution of the Myb Family of Transcription Factors: Evidence for Polyphyletic Origin*. Journal of Molecular Evolution, 46, 74–83

Sacks MM, Silk WK y Burman P (1997). *Effect of water stress on cortical cell division rates within the apical meristem of primary roots of maize*. Plant Physiology, 114, 519–527

Saddic LA, Huvermann B, Bezhani S, Su Y, Winter CM, Kwon CS, Collum RP y Wagner D (2006). *The LEAFY target LMI1 is a meristem identity regulator and acts together with LEAFY to regulate expression of CAULIFLOWER*. *Development*, 133, 1673-1682

Samarajeewa PK, Barrero RA, Umeda-Hara C, Kawai M y Uchimiya H (1999). *Cortical cell death, cell proliferation, macromolecular movements and rTip1 expression patterns in roots of rice (Oryza sativa L.) under NaCl stress*. *Planta*, 207, 354–361

Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sander L, Child R, Ulvskov P, Albrechtsen M y Borkhardt B. (2001). *Analysis of a dehiscence zone endo-polygalacturonase in oilseed rape (Brassica napus) and Arabidopsis thaliana: evidence for roles in cell separation in dehiscence and abscission zones, and in stylar tissues during pollen tube growth*. *Plant Molecular Biology*, 46, 469–479

Santos Teixeira JA y ten Tusscher KH (2019). *The Systems Biology of Lateral Root Formation: Connecting the Dots*. *Molecular Plant*, 12(6), 784-803

Schena M y Davis RW (1992). *HD-Zip proteins: members of an Arabidopsis homeodomain protein superfamily*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 89(9), 3894-3898

Scheres B, Wolkenfelt H, Willemsen V, Terlouw MP, Lawson E, Dean C y Weisbeek P (1994). *Embryonic origin of the Arabidopsis primary root and root meristem initials*. *Development*, 120, 2475-2487

Scheres B, Benfey P y Dolan L (2002). *Root development*. *Arabidopsis Book*, 1, e0101

Segarra G, Van der Ent S, Trillas I y Pieterse CM (2009). *MYB72, a node of convergence in induced systemic resistance triggered by a fungal and a bacterial beneficial microbe*. *Plant Biology (Stuttg)*, 11(1), 90-96

Sessa G, Morelli G y Ruberti I (1993). *The Athb-1 and -2 HD-Zip domains homodimerize forming complexes of different DNA binding specificities*. The EMBO Journal, 12, 3507-3517

Sherman F y Wakem P (1991). Getting started with yeast. Methods of Enzymology, 194, 3–21

Shi L, Katavic V, Yu Y, Kunst L y Haughn G (2015). *Arabidopsis glabra2 mutant seeds deficient in mucilage biosynthesis produce more oil*. The Plant Journal, 69, 37–46

Shin R, Burch AY, Huppert KA, Tiwari SB, Murphy AS, Guilfoyle TJ y Schachtman DP (2007). *The Arabidopsis Transcription Factor MYB77 Modulates Auxin Signal Transduction*. The Plant Cell, 19, 2440–2453

Shiratake K (2007). *Genetics of sucrose transporter in plants*. In. Genes, Genomes and Genomics. vol. 1. Ikenobe: Global Science Books, Ltd., 73–80, 15

Siloto RM, Findlay K, Lopez-Villalobos A, Yeung EC, Nykiforuk CL y Moloney MM (2006). *The accumulation of oleosins determines the size of seed oilbodies in Arabidopsis*. The Plant Cell 18, 1961–1974

Silva AT, Ribone PA, Chan RL, Ligterink W y Hilhorst HWM (2016). *A predictive coexpression network identifies novel genes controlling the seed-to-seedling phase transition in Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology 170, 2218–2231

Simons AM (2009). *Fluctuating natural selection accounts for the evolution of diversification bet hedging*. Proceedings: Biological Sciences, 276(1664), 1987-1992

Smith S y Smet ID (2012). *Root system architecture: insights from Arabidopsis and cereal crops*. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 367, 1441–1452

Smyth DR, Bowman JL y Meyerowitz EM (1990). *Early Flower Development in Arabidopsis*. The Plant Cell, 2, 755-767

Söderman E, Hjellström M, Fahleson J y Engström P (1999). *The HD-Zip gene ATHB6 in Arabidopsis is expressed in developing leaves, roots and carpels and up-regulated by water deficit conditions*. *Plant Molecular Biology*, 40(6), 1073-1083

Son O, Cho HY, Kim MR, Lee H, Lee MS, Song E, Park JH, Nam KH, Chun JY, Kim HJ, Hong SK, Chung YY, Hur CG, Cho HT, Cheon CI (2004). *Induction of a homeodomainleucine zipper gene by auxin is inhibited by cytokinin in Arabidopsis roots*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 326, (1): 203-209

Song G, Li X, Munir R, Khan AR, Azhar W, Yasin MU, Jiang Q, Bancroft I y Gan Y (2020). *The WRKY6 transcription factor affects seed oil accumulation and alters fatty acid compositions in Arabidopsis thaliana*. *Physiology of Plants*, 169, 612–624

Spence J, Vercher Y, Gates P y Harris N (1996). *Pod shatter in Arabidopsis thaliana, Brassica napus and B. juncea*. *Journal of Microscopy*, 181, 195–203

Springthorpe V y Penfield S (2015). *Flowering Time and Seed Dormancy Control Use External Coincidence to Generate Life History Strategy*. *e-life*, 4, e05557

Sultan SE (2000). *Phenotypic plasticity for plant development, function and life history*. *Trends in Plant Science*, 5, 537–542

Sun F, Zhang W, Hu H, Li B, Wang Y, Zhao Y, Li K, Liu M y Li X (2008). *Salt Modulates Gravity Signaling Pathway to Regulate Growth Direction of Primary Roots in Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 146, 178–188

Sun L, Song L, Zhang Y, Zheng Z y Liu D (2016). *Arabidopsis PHL2 and PHR1 act redundantly as the key components of the central regulatory system controlling transcriptional responses to phosphate starvation*. *Plant Physiology*, 170, 499–514

Taiz L y Zeiger E (2010). *Plant Physiology*. Fifth Edition. Sinauer Associates Inc., Sunderland

Takahashi N, Yamazaki Y, Kobayashi A, Higashitani A y Takahashi H (2003). *Hydrotropism interacts with gravitropism by degrading amyloplasts in seedling roots of Arabidopsis and radish*. Plant Physiology, 132, 805–810

T

Tan H, Yang X, Zhang F, Zheng X, Qu C, Mu J, Fu F, Li J, Guan R, Zhang H, Wang G y Zuo J (2011). *Enhanced seed oil production in canola by conditional expression of Brassica napus LEAFY COTYLEDON1 and LEC1-LIKE in developing seeds*. Plant Physiology, 156, 1577–1588

Tasaka M, Kato T y Fukaki H (1999). *The endodermis and shoot gravitropism*. Trends in Plant Science, 4, 103-107

Taylor JE y Whitelaw CA. (2001). *Signals in abscission*. New Phytologist, 151: 323–339

The Arabidopsis Genome Initiative (2000). *Analysis of the Genome Sequence of the Flowering Plant Arabidopsis Thaliana*. Nature, 408, 796 – 815.

Thompson MA y Ramsay RG (1995). *MYB: an old oncoprotein with new roles*. BioEssays, 17, 341–350

Tron AE, Welchen E y Gonzalez DH (2004). *Engineering the loop region of a homeodomain-leucine zipper protein promotes efficient binding to a monomeric DNA binding site*. Biochemistry, 43 (50), 15845-15851

Tsugeki R, Olson ML y Fedoroff NV (1998). *Transposon tagging and the study of root development in Arabidopsis*. Gravitational and Space Biology Bulletin, 11, 79-87

Uimari A y Strommer J (1997). *Myb26: a MYB-like protein of pea flowers with affinity for promoters of phenylpropanoid genes*. The Plant Journal, 12, 1273–1284

Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ (1997). *Aux/IAA Proteins Repress Expression of Reporter Genes Containing Natural and Highly Active Synthetic Auxin Response Elements*. The Plant Cell, 9(11), 1963-1971

Utsuno K, Shikanai T, Yamada Y y Hashimoto T (1998). *AGR, an agravitropic locus of Arabidopsis thaliana, encodes a novel membrane-protein family member*. The Plant Cell Physiology, 39, 1111-1118

Van der Ent S, Verhagen BW, Van Doorn R, Bakker D, Verlaan MG, Pel MJ, Joosten RG, Proveniers MC, Van Loon LC, Ton J y Pieterse CM (2008). *MYB72 is required in early signaling steps of rhizobacteria-induced systemic resistance in Arabidopsis*. Plant Physiology, 146(3), 1293-304

Van Gelderen K, van Rongen M, Liu A, Otten A y Offringa R (2016). *An INDEHISCENT-Controlled Auxin Response Specifies the Separation Layer in Early Arabidopsis Fruit*. Molecular Plant, 9, 857–869

Vange V, Heuch I y Vandvik V (2004). *Do Seed Mass and Family Affect Germination and Juvenile Performance in Knautia arvensis? A Study Using Failure-Time Methods*. Acta Oecologica, 25(3), 169–178

Varala K, Marshall-Colon A y Cirrone J (2018). *Temporal transcriptional logic of dynamic regulatory networks underlying nitrogen signaling and use in plants*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 115, 6494–6499

Verma S, Negi NP, Pareek S, Mudgal G y Kumar D (2022). *Auxin response factors in plant adaptation to drought and salinity stress*. Physiologia Plantarum, 174(3), e13714

Viola IL y Gonzalez DH (2016). *Structure and Evolution of Plant Homeobox Genes*. Plant Transcription Factors evolutionary, structural, and functional aspects, Elsevier, p. :101-112

Vivian-Smith A y Koltunow AM (1999). *Genetic analysis of growth-regulator-induced parthenocarpy in Arabidopsis*. Plant Physiology, 121(2), 437-451

Wang H, Guo J y Lin LY (2007). *Developmental control of Arabidopsis seed oil biosynthesis*. Planta 226, 773–783

Wang Z, Zheng Z, Song L y Liu D. (2018). *Functional characterization of Arabidopsis PHL4 in plant response to phosphate starvation*. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1432

Weber H, Borisjuk L y Wobus U (2005). *Molecular physiology of legume seed development*. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 253–279

Weise SE y Kiss JZ (1999). *Gravitropism of inflorescence stems in starch-deficient mutants of Arabidopsis*. *International Journal of Plant Science*, 160, 521-527

West G, Inzé D y Beemster GT (2004). *Cell cycle modulation in the response of the primary root of Arabidopsis to salt stress*. *Plant Physiology*, 135,: 1050–1058

Xu P, Zhao PX, Cai XT, Mao JL, Miao ZQ y Xiang CB (2020). *Integration of Jasmonic Acid and Ethylene Into Auxin Signaling in Root Development*. *Frontiers in Plant Science*, 11, 271

Yang J, Luo D, Yang B, Frommer WB y Eom JS (2018). *SWEET11 and 15 as key players in seed filling in rice*. *New Phytologist* 218, 604–615

Yang L, Chen Y, Xu L, Wang J, Qi H, Guo J, Zhang L, Shen J, Wang H, Zhang F, Xie L, Zhu W, Lü P, Qian Q, Yu H y Song S (2022). *The OsFTIP6-OsHB22-OsMYBR57 module regulates drought response in rice*. *Molecular Plant*, 15(7), 1227-1242

Yazaki J, Galli M, Kim AY, Nito K, Aleman F, Chang KN, Carvunis AR, Quan R, Nguyen H, Song L, Alvarez JM, Huang SS, Chen H, Ramachandran N, Altmann S, Gutiérrez RA, Hill DE, Schroeder JI, Chory J, LaBaer J, Vidal M, Braun P y Ecker JR (2016). *Mapping transcription factor interactome networks using HaloTag protein arrays*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 113(29), E4238-4247

Yoo JH, Park CY, Kim JC, Heo WD, Cheong MS, Park HC, Kim MC, Moon BC, Choi MS, Kang YH, Lee JH, Kim HS, Lee SM, Yoon HW, Lim CO, Yun DJ, Lee SY, Chung WS y Cho MJ (2005). *Direct interaction of a divergent CaM isoform and the transcription factor, MYB2, enhances salt tolerance in arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(5), 3697-3706

Yu L, Fan J, Yan C y Xu C (2018). *Starch deficiency enhances lipid biosynthesis and turnover in leaves*. *Plant Physiology*, 178, 118–129

Yu X, Lin J, Masuda T, Esumi N, Zack DJ Qian J (2006). *Genome-wide prediction and characterization of interactions between transcription factors in Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 34, 917–927

Zakhartsev M, Medvedeva I, Orlov Y, Akberdin I, Krebs O, Schulze WX (2016). *Metabolic model of central carbon and energy metabolisms of growing Arabidopsis thaliana in relation to sucrose translocation*. *BMC Central Plant Biology*, 16, 262

Zhang H, Zhu J, Gong Z y Zhu JK (2022). *Abiotic stress responses in plants*. *Nature Review Genetics*, 23(2), 104-119

Zhang L (2009). *Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family*. *Journal Biochemistry Biokhimiia*, 74, 1–11

Zhang M, Cao X, Jia Q y Ohlrogge J (2016). *FUSCA3 activates triacylglycerol accumulation in Arabidopsis seedlings and tobacco BY2 cells*. *The Plant Journal*, 88, 95–107

Zhang WH, Zhou Y, Dibley KE, Tyerman SD, Furbank RT y Patrick JW (2007). *Nutrient loading of developing seeds*. *Functional Plant Biology*, 34, 314–331

Zhang Y, Xiao G, Wang X, Zhang X y Friml J (2019). *Evolution of fast root gravitropism in seed plants*. *Nature Communications*, 10, 3480

Zhu JK (2002). *Salt and drought stress signal transduction in plants*. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 247–273

Zhu JK (2003). *Regulation of ion homeostasis under salt stress*. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 441–445

Zhu, JK (2016). *Abiotic stress signaling and responses in plants*. *Cell*, 167, 313-324