

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



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

**Identificación de mecanismos moleculares asociados al  
incremento de la producción causado por tratamiento mecánico  
en plantas dicotiledóneas**

**Betina Lorena Raminger**

Directora de Tesis: Cabello, Julieta Virginia

Laboratorio de Biotecnología Vegetal – Instituto de Agrobiotecnología del Litoral.  
CONICET- UNL

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a la **Universidad Pública Argentina**, que me dio mucho más que un título: me dio dos. Y, sobre todo, la posibilidad de aprender, de cuestionar, de pensar críticamente y de construir conocimiento de manera colectiva. En particular, agradezco a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral: como estudiante y como docente de esta casa de estudios, agradezco no solo por lo aprendido en las aulas sino también por el espacio para compartir ideas y construir vínculos con colegas y compañeros.

También agradezco al sistema científico argentino, en particular al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, que sostienen la posibilidad de hacer ciencia en el país mediante el otorgamiento de becas, como aquella de la que fui beneficiaria, y el financiamiento, siempre imprescindible, de proyectos de investigación en ciencia básica. Este trabajo también existe porque hubo un Estado que apostó al conocimiento y a la investigación como herramientas de soberanía y, en el actual contexto de desfinanciamiento, espero sirva como testimonio de que la ciencia y la educación públicas no son un gasto, sino una forma de compromiso con el desarrollo social, tecnológico y productivo de un país. Por eso, agradezco no solo a la Universidad Pública y a la Ciencia Argentina sino también a quienes, día a día, luchan por defenderla en las aulas y en las calles.

Agradezco al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral y, especialmente, al Laboratorio de Biotecnología Vegetal, del que he formado parte durante varios años y que me permitió formarme en un entorno de gran calidad científica, porque la ciencia no se hace en soledad ni en silencio.

A Julieta Cabello, mi directora de Tesis y quien también fue mi directora Tesina. Por su inmensa capacidad para enseñar, explicar y acompañar con paciencia, pero también por su calidez humana, su vocación científica y su compromiso. Siempre pienso en la suerte que tuve al haber encontrado, hace ya varios años, el cartel de su llamado a pasantía pegado en los pasillos de la FBCB.

A Raquel Chan, por el espacio en el laboratorio, las oportunidades y los recursos, pero también por el acompañamiento cotidiano y por transmitir siempre la vocación y la pasión por la ciencia, incluso cuando el contexto se vuelve adverso.

A mis compañeras y compañeros del IAL y del LBV, los que están presentes y los que continuaron su camino en otros laboratorios. Una parte de mi formación científica viene de ellos, pero también les agradezco el compartir lo cotidiano, el mate y el chisme.

Finalmente, agradezco a mi familia, a mis amigas y amigos, y a mi compañero de vida, que han sido un sostén incondicional. Gracias por la comprensión en los momentos difíciles y por celebrar cada pequeño logro como si fuera propio, esto también es para ustedes.

## APORTES CIENTÍFICO-TECNOLÓGICOS

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:

**Raminger, B.L.,** Miguel, V.N., Zapata, C., Chan, R.L., & Cabello, J.V. (2023) *Source-to-sink partitioning is altered by changes in the expression of the transcription factor AtHB5 in Arabidopsis. Journal of experimental botany, 74(6), 1873–1889.*

**Raminger, B.L.,** Muñoz-Gasca, A., Cubas, P., Chan, R.L., & Cabello, J.V. (2025) *Interplay of brassinosteroids, strigolactones, and CLE44 in modulating Arabidopsis stem architecture in response to mechanical stress. The Plant journal: for cell and molecular biology, 123(1), e70329.*

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	1
APORTES CIENTÍFICO-TECNOLÓGICOS.....	2
ÍNDICE .....	3
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS .....	10
RESUMEN.....	13
ABSTRACT.....	15
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	17
1. INTRODUCCIÓN .....	18
1.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> COMO ORGANISMO MODELO PARA EL ESTUDIO DEL DESARROLLO Y LA RESPUESTA AL AMBIENTE.....	18
1.2 CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LAS PLANTAS .....	19
1.3 EL TEJIDO VASCULAR.....	20
1.3.1 Principales componentes del sistema vascular: xilema, floema y cámbium.....	20
1.3.2 Desarrollo inicial del tejido vascular .....	22
1.3.3 Patrón vascular de raíces .....	22
1.3.4 Patrón vascular de hojas.....	23
1.3.5 Patrón vascular de tallos .....	24
1.3.6 Desarrollo vascular secundario .....	24
1.3.7 Funciones del sistema vascular .....	25
1.4 LA RELACIÓN DE LAS PLANTAS CON EL ESTRÉS AMBIENTAL .....	25
1.5 LA PARTICULARIDAD DEL ESTRÉS MECÁNICO.....	26
2. OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	29

2.1 OBJETIVO GENERAL DEL TRABAJO DESARROLLADO.....	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
CAPÍTULO I.....	31
1. INTRODUCCIÓN AL CAPÍTULO I.....	32
1.1 LA NECESIDAD DE PROFUNDIZAR SOBRE LA RESPUESTA AL ESTRÉS MECÁNICO .....	32
1.2 REGULACIÓN HORMONAL EN EL DESARROLLO DEL TEJIDO VASCULAR.....	34
1.2.1 Brasinoesteroides y tejido vascular.....	34
1.2.2 Estrigolactonas y sistema vascular.....	36
1.3 SEÑALIZACIÓN MOLECULAR ESPECÍFICA DE TEJIDO VASCULAR.....	37
1.4 EL PÉPTIDO CLE44.....	39
2. OBJETIVOS DEL CAPÍTULO I .....	42
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	43
3.1 MATERIALES .....	43
3.1.1 Cepas bacterianas.....	43
3.1.2 Especies vegetales.....	43
3.1.3 Medios de cultivo.....	43
3.1.4 Vectores .....	44
3.1.5 Plantas mutantes y transgénicas de <i>A. thaliana</i> .....	45
3.1.6 Oligonucleótidos .....	45
3.1.7 Construcciones genéticas 35S:CLE44 y PrCLE44:GUS.....	46
3.2 MÉTODOS .....	47
3.2.1 Reacciones de digestión con endonucleasas de restricción y ligación de ADN .....	47

3.2.2 Transformación de bacterias por electroporación.....	47
3.2.3 Minipreparación de ADN plasmídico .....	47
3.2.4 Electroforesis de ADN .....	48
3.2.5 Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa .....	48
3.2.6 Condiciones de cultivo en cámara .....	49
3.2.7 Transformación estable de plantas de Arabidopsis y selección de transformantes .....	49
3.2.8 Extracción de ADN genómico de plantas y amplificación por PCR .....	50
3.2.9 Análisis histoquímico de la actividad $\beta$ -glucuronidasa .....	51
3.2.10 Cortes, tinciones histológicas y cuantificación de haces vasculares.....	51
3.2.11 Tratamiento con peso.....	51
3.2.12 Tratamientos con hormonas e inhibidores .....	52
3.2.13 Evaluación de características fenotípicas ligadas al tratamiento mecánico .....	52
3.2.14 Extracción y cuantificación de ARN total a partir de tejido vegetal .....	52
3.2.15 Análisis de expresión por RT-qPCR.....	53
4. RESULTADOS.....	54
4.1 BRASINOESTEROIDES Y ESTRIGOLACTONAS MODULAN LA RESPUESTA AL ESTRÉS MECÁNICO.....	54
4.1.1 El incremento del diámetro del tallo y número de haces vasculares en respuesta al estrés mecánico en Arabidopsis es dependiente de la acción de brasinoesteroides.....	54
4.1.2 La síntesis y señalización de estrigolactonas son necesarias para el aumento de la cantidad de haces vasculares por tratamiento mecánico.....	56
4.2 <i>CLE44</i> MEDIA EL DESARROLLO VASCULAR Y EL CRECIMIENTO RADIAL DEL TALLO EN RESPUESTA AL ESTRÉS MECÁNICO Y ES CRUCIAL PARA LOGRAR EL AUMENTO DE LA PRODUCCIÓN .....	57

4.3 LA INDUCCIÓN DE BRC1 Y CLE44 POR PESO DEPENDE DE LAS ESTRIGOLACTONAS .....	60
4.4 INTERACCIÓN ENTRE LAS VÍAS DE ESTRIGOLACTONAS Y BRASINOESTEROIDES DURANTE LA RESPUESTA AL ESTRÉS MECÁNICO .....	63
5. DISCUSIÓN .....	66
5.1 INTEGRACIÓN DE SEÑALES HORMONALES EN RESPUESTA AL ESTÍMULO MECÁNICO .....	66
5.2 EL PÉPTIDO CLE44 COMO MEDIADOR CENTRAL DE LA RESPUESTA VASCULAR .....	68
5.3 UN MODELO DE RESPUESTA INTEGRAL: ESTRIGOLACTONAS, BRASINOESTEROIDES Y CLE44.....	69
CAPÍTULO II .....	72
1. INTRODUCCIÓN AL CAPÍTULO II .....	73
1.1 TRANSPORTE DE AZÚCARES DE ORGANOS FUENTE A SUMIDERO.....	73
1.1.1 Fotosíntesis.....	74
1.1.2 Biosíntesis de sacarosa.....	75
1.1.3 Síntesis y degradación de almidón transitorio .....	75
1.1.4 Transporte de carbono a larga distancia.....	77
1.1.5 Transportadores de sacarosa .....	78
1.2 TRANSPORTADORES ESPECÍFICOS DEL TIPO SWEET Y SUC .....	78
1.3 ALMACENAMIENTO DE COMPUESTOS DE RESERVA EN SEMILLAS .....	81
1.4 LA RELACIÓN DE LAS PLANTAS CON EL DÉFICIT HÍDRICO.....	81
1.4.1 Estrés mecánico y su relación con la tolerancia a otros estreses bióticos y abióticos ..	82
2. OBJETIVOS DEL CAPÍTULO II .....	84
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	85

3.1 MATERIALES .....	85
3.1.1 Especies vegetales .....	85
3.1.2 Plantas mutantes de <i>A. thaliana</i> .....	85
3.1.3 Oligonucleótidos .....	85
3.2 MÉTODOS .....	87
3.2.1 Cuantificación de sustancias de reserva: lípidos y proteínas .....	87
3.2.2 Cuantificación de glúcidos: almidón, glucosa y sacarosa .....	88
3.2.3 Ensayo de transporte por floema con la sonda CFDA .....	89
3.2.4 Cuantificaciones de área de xilema, floema y cámbium.....	89
3.2.5 Ensayos de estrés hídrico .....	90
3.2.6 Análisis de transcriptómica por secuenciación masiva de ARN.....	90
4. RESULTADOS.....	91
4.1 EL AUMENTO DEL TEJIDO VASCULAR Y LA MOVILIZACIÓN DE FOTOSINTATOS INDUCIDOS POR EL ESTRÉS MECÁNICO COMPROMETEN LA RESPUESTA DE LA PLANTA AL DÉFICIT HÍDRICO .....	91
4.2 EL ESTRÉS MECÁNICO AUMENTA EL FLUJO DE CARBONO HACIA LA ACUMULACIÓN DE ALMIDÓN Y EL TRANSPORTE DE FOTOSINTATOS A TEJIDOS SUMIDERO.....	96
4.3 EL ESTRÉS MECÁNICO ALTERA EL FLUJO DE CARBONO MEDIANTE LA INDUCCIÓN DE GENES <i>SWEET</i> Y <i>SUC</i> , EL AUMENTO DEL TRANSPORTE PASIVO Y LA MODIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE BIOSÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE ALMIDÓN .....	98
4.4 LOS TRANSPORTADORES <i>SUC2</i> , <i>SWEET11</i> , <i>SWEET12</i> Y <i>SWEET16</i> SON CRUCIALES PARA EL INCREMENTO DE LA PRODUCCIÓN DE SEMILLAS EN RESPUESTA AL ESTRÉS MECÁNICO, PERO NO MEDIAN LA RESPUESTA DE AUMENTO VASCULAR.....	102

5. DISCUSIÓN .....	104
CAPÍTULO III.....	110
1. INTRODUCCIÓN AL CAPÍTULO III .....	111
1.1 REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL.....	111
1.2 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE LA FAMILIA HD-ZIP I .....	114
1.2.1 Factores de transcripción HD-Zip I involucrados en la respuesta al estrés mecánico	116
1.3 AtHB5 .....	117
2. OBJETIVOS DEL CAPÍTULO III.....	119
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	120
3.1 MATERIALES .....	120
3.1.1 Plantas mutantes y transgénicas de <i>A. thaliana</i> .....	120
3.1.2 Oligonucleótidos .....	120
3.1.3 Construcción genética <i>PrAtHB5:GUS</i> .....	121
3.2 MÉTODOS .....	121
3.2.1 Tinciones histológicas.....	121
3.2.2 Cuantificación del contenido de lignina.....	122
3.2.3 Observación de deposiciones de calosa en sistema vascular .....	122
3.2.4 Evaluación de parámetros fenotípicos .....	122
3.2.5 Cuantificación del largo de raíz principal y número de raíces secundarias .....	123
4. RESULTADOS.....	124
4.1 EL CAMBIO EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE <i>AtHB5</i> CONDUCE A ALTERACIONES EN CARACTERÍSTICAS ASOCIADAS AL ESTRÉS MECÁNICO....	124
4.1.1 Los HD-Zip I participan en la respuesta al estrés mecánico .....	124

4.1.2 ATHB5 actuaría como un regulador negativo del desarrollo vascular y del crecimiento radial del tallo.....	125
4.1.3 Las alteraciones en los niveles de <i>AtHB5</i> afectan el transporte de carbohidratos y la acumulación de compuestos de reserva en semillas .....	127
4.1.4 El metabolismo del almidón se encuentra alterado en plantas mutantes <i>athb5</i> y sobreexpresantes AT5 .....	130
4.1.5 El transporte a larga distancia a través del floema se ve afectado por la expresión de <i>AtHB5</i> .....	131
4.2 <i>AtHB5</i> SE EXPRESA EN TEJIDOS DE TRANSPORTE .....	132
4.3 ATHB5 REGULA NEGATIVAMENTE LA DEPOSICIÓN DE LIGNINA EN TALLOS Y CALOSA EN HOJAS .....	133
4.4 LA EXPRESIÓN DE <i>AtHB5</i> AFECTA LA ANATOMÍA DEL PECÍOLO.....	135
4.5 LAS PLANTAS MUTANTES <i>athb5</i> GENERAN MAYOR BIOMASA QUE SUS PARES CONTROL.....	136
4.6 <i>AtHB5</i> REGULA NEGATIVAMENTE LA LLEGADA DE SACAROSA A LAS RAÍCES, AFECTANDO SU DESARROLLO.....	137
5. DISCUSIÓN .....	139
CONCLUSIONES GENERALES .....	144
CONCLUSIONES .....	145
CITAS BIBLIOGRÁFICAS .....	147
BIBLIOGRAFÍA .....	148

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

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

**ADN** Ácido desoxirribonucleico

**ARN** Ácido ribonucleico

**ARNm** ARN mensajero

**BRs** Brasinoesteroides

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

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

**CFDA** 5(6)-carboxyfluorescein diacetato

**Col** Ecotipo columbia

**cm** Centímetros

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

**EDTA** Ácido etilen-diamino-tetra-acético

**ET** Elementos traqueales

**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*)

**GR-24** Estrigolactona GR24 (compuesto sintético que funciona como análogo a las estrigolactonas)

**GUS**  $\beta$ -glucuronidasa

**h** Hora

**HD** Homeodominio

**HD-Zip** Homeodominio asociado a un motivo cierre de leucinas

**IAA** Ácido Indol-3-Acético

**LB** Luria-Bertani

**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

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

**qPCR** Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

**RAM** Meristema apical de la raíz (del inglés, *Root Apical Meristem*)

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

**RT** Transcripción reversa

**RT-qPCR** RT seguida de PCR cuantitativa en tiempo real

**SAM** Meristema apical del tallo (del inglés, *Shoot Apical Meristem*)

**SLs** Estrigolactonas

**SMC** Sitio de múltiple clonado

**SDS** Dodecil sulfato de sodio

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

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

**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

**Tris** Tris (hidroximetil)-aminometano

**µg** Microgramos

**µM** Micromolar

**µl** Microlitros

**WT** Planta de genotipo salvaje (del inglés, *Wild Type*)

## RESUMEN

Las plantas poseen una notable capacidad para ajustar su desarrollo y fisiología frente a cambios en su entorno. Entre las múltiples señales que modulan su crecimiento, los estímulos mecánicos (como el peso propio, el viento o el roce) constituyen factores determinantes para la arquitectura y el rendimiento vegetal. Estos estímulos desencadenan respuestas estructurales y moleculares orientadas a sostener el desarrollo y la adaptación. Sin embargo, los mecanismos que vinculan la percepción de la señal mecánica con la regulación hormonal, el transporte de carbono y la productividad son en gran medida desconocidos.

La presente Tesis aborda esta problemática a través del estudio de la respuesta de *Arabidopsis thaliana* al estímulo mecánico producido por el tratamiento con peso, integrando análisis morfológicos, fisiológicos, moleculares y transcriptómicos. A lo largo de tres capítulos, se describen los mecanismos que coordinan la expansión vascular, el transporte de azúcares y la producción de semillas, proponiéndose un modelo de respuesta adaptativa que articula señales mecánicas, hormonales y genéticas.

En el Capítulo I, se demuestra que el estímulo mecánico promueve un marcado engrosamiento del tallo y un aumento en el número de haces vasculares, dependientes de la acción conjunta de brasinoesteroides (BRs) y estrigolactonas (SLs). Ambos reguladores hormonales convergen para inducir la expresión del péptido CLE44, cuya señalización en el cámbium desencadena la proliferación y diferenciación de tejidos vasculares. Este hallazgo reveló que la respuesta al estrés mecánico es un proceso activo y coordinado, que involucra la comunicación cruzada entre vías hormonales y peptídicas. Además, se comprobó que la inducción de CLE44 depende de la señalización de SLs y que su pérdida de función impide tanto el desarrollo vascular como el aumento en la producción de semillas, demostrando su papel central como mediador entre la señal hormonal y la respuesta estructural del tallo al estrés mecánico.

El Capítulo II profundiza en las consecuencias fisiológicas y metabólicas de esta expansión vascular. Se observó que las plantas tratadas con peso presentan un aumento sostenido en el área del xilema, el floema y el cámbium, junto con una mayor acumulación y transporte de sacarosa y almidón hacia las semillas, lo que se tradujo en un incremento significativo de la producción. Estos resultados evidencian que el estímulo mecánico reconfigura el metabolismo del carbono para optimizar la partición fuente-sumidero. El análisis transcriptómico reveló la inducción de genes asociados al transporte de azúcares (*SWEET* y *SUC*) y a la síntesis de almidón (*PGM*, *ADGI*, *SS4*, *GBSS*), confirmando la existencia de una respuesta coordinada que vincula crecimiento vascular y metabolismo energético. Sin embargo, se observó que este aumento en la capacidad de transporte puede tener un costo fisiológico bajo estrés hídrico, ya que las plantas previamente expuestas al peso mostraron menor tolerancia a la sequía. Estos resultados sugieren que la expansión vascular inducida por el estímulo mecánico representa una ventaja adaptativa bajo condiciones óptimas, pero puede comprometer la eficiencia hídrica cuando el recurso es limitado.

El Capítulo III aborda el control transcripcional de estos procesos e identifica al factor de transcripción AtHB5, perteneciente a la familia HD-Zip I, como un regulador negativo del desarrollo vascular, del transporte de azúcares y de la producción de semillas en condiciones normales de crecimiento. Las plantas mutantes *athb5* presentaron tallos más robustos, mayor lignificación y contenido de azúcares y lípidos en semillas, mientras que las líneas sobreexpresantes (*AT5*) mostraron una reducción drástica en estas variables, acompañada por acumulación de calosa en el floema y menor velocidad de transporte de fotoasimilados. Además, AtHB5 reprimió la expresión de *AtSWEET16*, un transportador vacuolar implicado en la redistribución de azúcares en tallos, lo que contribuyó a la menor disponibilidad de carbono en los órganos sumidero. Estos resultados posicionan a AtHB5 como un nodo transcripcional que mantiene el equilibrio entre crecimiento y economía energética.

En conjunto, los resultados de esta Tesis proponen un modelo integral en el que la percepción del estímulo mecánico activa vías hormonales (BRs y SLs) que, mediante la señal peptídica CLE44, promueven la proliferación cambial y la expansión del sistema vascular. Esta reorganización estructural se acompaña de una reprogramación metabólica orientada a sostener el flujo de carbono hacia las semillas, optimizando el rendimiento bajo condiciones favorables. En un nivel superior de regulación, el factor de transcripción AtHB5 modula negativamente estos procesos, restringiendo la expansión vascular y el transporte de azúcares, equilibrando las demandas estructurales y energéticas de la planta.

Estos hallazgos amplían la comprensión de la plasticidad vegetal frente a estímulos mecánicos y revelan una red de integración entre señales físicas, hormonales y transcripcionales que determina el equilibrio entre crecimiento, metabolismo y producción. Desde una perspectiva aplicada, los genes y vías identificados en este trabajo constituyen candidatos prometedores para el diseño de estrategias biotecnológicas destinadas a mejorar la arquitectura vascular, la eficiencia de transporte y el rendimiento de los cultivos.

## ABSTRACT

Plants possess a remarkable capacity to adjust their development and physiology in response to environmental changes. Among the various signals that modulate plant growth, mechanical stimuli (such as self-weight, wind, or touch) are key determinants of plant architecture and productivity. These stimuli trigger structural and molecular responses aimed at sustaining growth and adaptation. However, the mechanisms linking the perception of mechanical signals with hormonal regulation, carbon transport, and yield remained largely unknown.

This Thesis addresses this problem by examining the response of *Arabidopsis thaliana* to mechanical stimulation induced by weight treatment, integrating morphological, physiological, molecular, and transcriptomic analyses. Across three chapters, it describes the mechanisms that coordinate vascular expansion, sugar transport, and seed production, proposing an adaptive response model that integrates mechanical, hormonal, and genetic cues.

Chapter I demonstrates that mechanical stimulation promotes marked stem thickening and an increase in the number of vascular bundles, both dependent on the joint action of brassinosteroids (BRs) and strigolactones (SLs). These hormonal regulators converge to induce the expression of the signaling peptide CLE44, whose activity in the cambium triggers vascular cell proliferation and differentiation. These findings reveal that the mechanical stress response is an active and coordinated process involving a crosstalk between hormonal and peptide signaling pathways. Moreover, *CLE44* induction requires SL signaling, and its loss of function abolishes both vascular development and the increase in seed production, establishing CLE44 as a central mediator linking hormonal signaling and the structural response of the stem under mechanical stress.

Chapter II explores the physiological and metabolic consequences of this vascular expansion. Plants exposed to weight treatment exhibit sustained increases in xylem, phloem, and cambial area, together with enhanced accumulation and transport of sucrose and starch to the seeds, leading to significantly higher yield. These results show that mechanical stimulation reconfigures carbon metabolism to optimize source–sink partitioning. Transcriptomic analysis revealed the induction of genes associated with sugar transport (*SWEET* and *SUC*) and starch biosynthesis (*PGM*, *ADG1*, *SS4*, *GBSS*), confirming the existence of a coordinated response linking vascular growth and energy metabolism. However, the increased conductive capacity may entail a physiological cost under water deficit, as plants previously subjected to weight treatment exhibited reduced drought tolerance. Thus, mechanically induced vascular expansion appears to confer an adaptive advantage under optimal conditions, but may compromise water-use efficiency when resources are limited.

Chapter III examines the transcriptional control of these processes and identifies the transcription factor AtHB5, a member of the HD-Zip I family, as a negative regulator of vascular development, sugar transport, and seed production under normal growth conditions. *athb5* mutants showed thicker stems, increased lignification, and higher sugar and lipid content in seeds, whereas AT5 overexpressing lines displayed drastic

reductions in these traits, accompanied by callose accumulation in the phloem and decreased photoassimilate transport rates. AtHB5 also repressed the expression of *AtSWEET16*, a vacuolar transporter involved in sucrose redistribution within stems, contributing to reduced carbon supply to sink organs. These findings point AtHB5 as a transcriptional node that maintains the balance between growth and energy economy.

Together, the results of this Thesis propose an integrative model in which mechanical signal perception activates hormonal pathways (BRs and SLs) that, through the peptide signal CLE44, promote cambial proliferation and vascular expansion. This structural reorganization is accompanied by metabolic reprogramming that sustains carbon flow to developing seeds, optimizing yield under favorable conditions. At a higher regulatory level, the transcription factor AtHB5 restricts vascular expansion and sugar transport, balancing structural and metabolic demands.

Overall, these results expand our understanding of plant plasticity under mechanical stimuli and reveal an integrated network of physical, hormonal, and transcriptional signals that governs the balance between growth, metabolism, and productivity. From an applied perspective, the genes and pathways identified here represent promising candidates for biotechnological strategies aimed at improving vascular architecture, transport efficiency, and crop yield.

# INTRODUCCIÓN GENERAL

---

# 1. INTRODUCCIÓN

Las plantas pueden ser asombrosas. A pesar de que no cuentan con mecanismos de desplazamiento como los que acostumbramos a ver en el reino animal, estos seres vivos habitan la naturaleza y deben ser capaces de responder a los estímulos que su entorno les impone. Para lograr esto han desarrollado a lo largo de la evolución una serie de estrategias complejas de percepción, integración y respuesta frente a señales externas que les permiten defenderse, obtener energía o adaptarse a las condiciones, mediante ajustes continuos que aseguren su supervivencia y reproducción.

El crecimiento y desarrollo vegetal dependen de la coordinación entre procesos celulares como la división, expansión y diferenciación, y de la regulación hormonal, metabólica y genética que los modula. Develar esos mecanismos requiere estudios profundos de la anatomía, fisiología y genética de las plantas.

Este trabajo de Tesis se ha realizado en pos de contribuir, en una pequeña parte, al conocimiento sobre cómo los organismos vegetales integran señales endógenas y exógenas para optimizar su desarrollo y respuesta a señales ambientales, estudiando principalmente los efectos de la aplicación de un estrés externo: **el estrés mecánico**.

La respuesta a este estímulo será descrita en tres capítulos bien definidos pero relacionados, todos ellos involucran el estudio del tejido vascular de la planta y los efectos moleculares o fisiológicos que el estrés mecánico desencadena, pero centrándose en tres aspectos bien diferenciados: por un lado, las vías hormonales y moleculares que orquestan el inicio del proceso de respuesta; por otro, las causas fisiológicas que traducen esa respuesta en alteraciones en la producción y, finalmente, los posibles efectos reguladores del proceso mediados por factores de transcripción (FTs). En todos los casos, los efectos del estrés mecánico son estudiados en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

## **1.1 *Arabidopsis thaliana* COMO ORGANISMO MODELO PARA EL ESTUDIO DEL DESARROLLO Y LA RESPUESTA AL AMBIENTE**

Una de las complejidades de los estudios genéticos y de desarrollo en plantas, como también ocurre en otros organismos, radica en la gran cantidad de especies existentes y la variabilidad que éstas presentan en sus genomas, anatomías y respuestas a diversos estímulos. La ciencia suele utilizar organismos modelo como una forma de sortear este problema. Entre las especies modelo empleadas en biología vegetal, *Arabidopsis thaliana* ocupa un lugar central por su simplicidad, plasticidad y valor experimental.

*A. thaliana* (*Arabidopsis*) es una planta herbácea de la familia Brassicaceae, originaria de Eurasia, que ha sido adoptada como organismo modelo por la comunidad científica debido a su ciclo de vida corto, su genoma pequeño y completamente secuenciado, y la gran disponibilidad de herramientas para su

manipulación genética (Bent y col., 1998; Meinke y col., 1998; Nakamura y col., 1998; Marra y col., 1999; Mozo y col., 1999).

Su morfología simple, con un tallo principal y una arquitectura bien definida, permite estudiar en detalle procesos fundamentales del desarrollo vegetal, como la formación de órganos, la diferenciación de tejidos y la respuesta a estímulos externos. Además, *Arabidopsis* se adapta fácilmente a diferentes condiciones de laboratorio, lo que la convierte en un modelo ideal para explorar la plasticidad del crecimiento y la adaptación al estrés.

Anatómicamente, y a los intereses de este trabajo en particular, su tallo constituye un excelente sistema para estudiar la interacción entre crecimiento, diferenciación vascular y señalización hormonal en respuesta a estímulos mecánicos.

Sin embargo, aunque *Arabidopsis* se ha consolidado como el sistema modelo para los estudios de ciencia básica, al extrapolar los resultados obtenidos en esta especie, es importante considerar que las respuestas al mismo estímulo pueden diferir significativamente en otras dicotiledóneas. En este sentido, en los últimos años ha crecido el interés por trasladar las investigaciones hacia especies de relevancia agronómica, con el objetivo de validar y ampliar los conocimientos generados en *Arabidopsis* dentro de contextos productivos. Trabajos realizados en cultivos como soja, girasol, maíz, tomate u arroz buscan comprobar la conservación de estos mecanismos en sistemas más complejos y económicamente relevantes (Yaschenko y col., 2025; Uauy y col., 2025). Esta transición desde la ciencia básica hacia la aplicación biotecnológica pone de manifiesto la importancia de comprender los fundamentos moleculares del desarrollo vegetal como base para promover una agricultura más resiliente y sostenible.

## **1.2 CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LAS PLANTAS**

El crecimiento vegetal se define como el aumento irreversible del tamaño y la masa del organismo, resultado de la expansión y división celular. El desarrollo, en cambio, implica los procesos de diferenciación celular y formación de estructuras organizadas. Ambos procesos están regulados por un complejo entramado de señales hormonales, genéticas y ambientales.

En *Arabidopsis*, los meristemas apicales del tallo (SAM) y de la raíz (RAM) son responsables de casi todo el crecimiento de la planta después de la embriogénesis, formando las estructuras aéreas y subterráneas, respectivamente. Estos meristemas constituyen poblaciones de células madre indiferenciadas que mantienen su capacidad proliferativa durante toda la vida de la planta (Meyerowitz, 1997).

La organización y regulación los meristemas son controlados por una compleja red de factores de transcripción, fitohormonas y señales que coordinan el equilibrio entre crecimiento y formación de tejidos

especializados (Dodsworth, 2009; Gaillochet y Lohmann, 2015) y deben asegurar tanto el mantenimiento de la población de células madre como la diferenciación celular, fuera del meristema, hacia los órganos en desarrollo.

En etapas tempranas, las auxinas, las citoquininas y los brasinoesteroides (BRs) desempeñan papeles esenciales en la determinación de la identidad celular y en la coordinación del patrón de crecimiento (Planas-Riverola y col., 2019; Sablowski, 2016). Luego, la transición hacia la fase reproductiva está controlada por redes genéticas que integran señales ambientales, como la luz y la temperatura, con reguladores endógenos del tiempo de floración (Andrés y Coupland, 2012).

El crecimiento de las plantas por medio de meristemas apicales da como resultado el desarrollo de conjuntos de tejidos primarios como la epidermis, los haces vasculares y las hojas, pero la región aérea de algunas plantas, incluida *Arabidopsis*, también puede experimentar un crecimiento secundario, impulsado por el meristema secundario o cámbium vascular, que genera engrosamiento del tallo y refuerza el tejido vascular (Ko y col., 2004).

### **1.3 EL TEJIDO VASCULAR**

El tejido vascular representa uno de los sistemas más plásticos del cuerpo vegetal, capaz de adaptarse tanto al crecimiento como a las condiciones ambientales. Desempeña dos funciones esenciales: el transporte de recursos a larga distancia (fotosintatos, agua, minerales) y la proporción de sostén mecánico.

Su formación comienza con la embriogénesis, involucra una extensa red de regulación hormonal, peptídica y transcripcional, y un complejo proceso de diferenciación celular que culmina con la generación de tejidos altamente especializados: el xilema y el floema, distribuidos a través de todo el cuerpo de la planta, desde el ápice de la raíz hasta las inflorescencias.

#### **1.3.1 Principales componentes del sistema vascular: xilema, floema y cámbium**

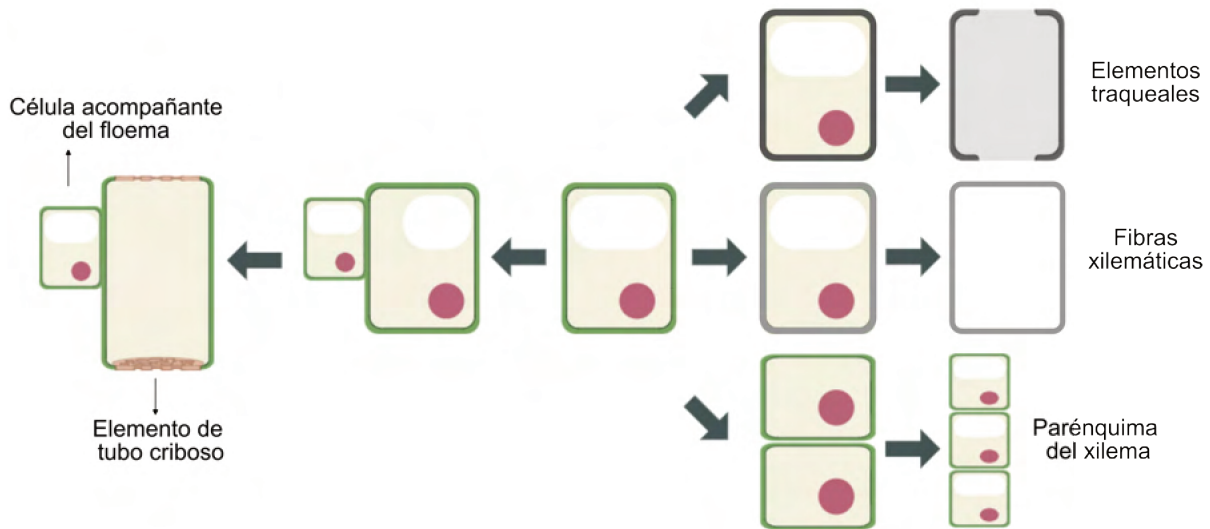
Dentro del grupo de las denominadas “plantas vasculares” se pueden encontrar tres tejidos bien diferenciados: el xilema, encargado del transporte de agua y minerales desde la raíz hacia la parte aérea; el floema, principal conductor de fotoasimilados desde los tejidos fuente (encargados de la fotosíntesis) hacia los sumideros (flores, silicuas, raíces), y el procámbium, compuesto por células madre capaces de responder a señales moleculares para diferenciarse en xilema o floema según los requerimientos de la planta.

Las células que componen el **xilema** incluyen los elementos traqueales (ET), las fibras, con un extenso depósito de pared celular secundaria y células vivas del parénquima del xilema (Figura 1).

Tanto los ET como las fibras son células conductoras, muertas a la madurez que presentan pared celular secundaria, lo que permite generar conductos de xilema lo suficientemente fuertes para llevar a cabo el transporte y, a su vez, proporciona un soporte mecánico para el cuerpo de la planta (Raven y col., 1999). Este desarrollo secundario del xilema implica una cascada de procesos, que incluyen la expansión de la pared celular, la deposición de la pared secundaria, la lignificación y la muerte celular programada (Turner y col., 2007; Bollhöner y col., 2012; Oda y Fukuda, 2012).

Los ET comienzan a formarse en etapas muy tempranas del desarrollo del xilema, en un proceso que involucra dos factores de transcripción de tipo NAC, *VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6* (VND6) y VND7 (Ohashi-Ito y col., 2010).

El **floema**, por su parte, comprende dos tipos de células principales: elementos de tubo criboso y células acompañantes (Figura 1). Las primeras son células conductoras vivas, pero sin núcleo a la madurez, que conducen los nutrientes, mientras que las células acompañantes se encargan de proporcionar soporte metabólico a los elementos de tubo criboso (Esaú, 1977; Van Bel y Knoblauch, 2000). Ambos tipos de células se originan a partir de células precursoras del floema en el procámbium.



**Figura 1. Ilustración de los diferentes tipos celulares presentes en el tejido vascular, surgidos a partir de un mismo tipo celular**

Hacia la izquierda se observa la diferenciación a elementos de tubo criboso y células acompañantes del floema. Hacia la derecha se ven los elementos traqueales, las fibras y las células parenquimáticas del xilema, las únicas de este tejido que permanecen vivas. Los círculos rosas representan los núcleos celulares y las elipses blancas las vacuolas. Figura creada con BioRedner.

Dentro de los reguladores de la diferenciación primaria de células del floema se encuentran APL (*ALTERED PHLOEM DEVELOPMENT*), un factor de transcripción de la familia MYB que actúa induciendo la identidad del floema mientras reprime la diferenciación de las células del xilema (Bonke y col., 2003)

Finalmente, de manera similar a lo que ocurre en el meristema apical del tallo, donde un conjunto de células madre prolifera para mantenerse al mismo tiempo que da origen a la formación de nuevos órganos, las **células cambiales** del tejido vascular pueden proliferar y/o diferenciarse en cualquiera de las células vasculares mencionadas anteriormente (Miyashima y col., 2013).

La correcta organización de los tejidos vasculares dependerá de la comunicación local que exista entre las células vasculares ya diferenciadas y el cámbium. Esta comunicación es mediada por señales hormonales de auxinas, citoquininas y BRs (Lucas y col., 2013; Agustí y Blázquez, 2020). Además, las posiciones relativas del floema y del xilema también están controladas por la vía de señalización mediada por el factor inhibidor de la diferenciación del elemento traqueal (TDIF, por sus siglas en inglés). TDIF se compone por dos péptidos de la familia CLE (*CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION-related*), CLE41/CLE44, que se sintetizan en células del floema y luego se mueven al procámbium, donde se encuentran con su receptor, PXY (*LRR-RLK PHLOEM INTERCALLATED WITH XYLEM*), activando una cascada de señalización que inhibe la diferenciación de las células del xilema y promueve la proliferación de células procambiales (Agustí y Blázquez, 2020).

### **1.3.2 Desarrollo inicial del tejido vascular**

La formación del sistema vascular primario implica un proceso altamente regulado de diferenciación celular e inicia con la embriogénesis, donde las células progenitoras que eventualmente se convertirán en los tejidos vasculares se establecen primero como tejidos pre-procambiales indiferenciados ubicados en la sección más interna del embrión. Estas células se dividen y adquieren identidad provascular en un proceso que implica una acumulación local de auxinas y, tras la especificación, proliferan de forma concomitante con el desarrollo embrionario (Lucas y col., 2013; Agustí y Blázquez, 2020).

Tras la germinación, la vasculatura primaria preestablecida durante la embriogénesis comienza a madurar, y se forma y desarrolla nuevo tejido vascular a medida que la planta crece. Durante esta formación del tejido, xilema, floema y cámbium se organizan en un patrón vascular bien establecido que, en *Arabidopsis*, cambia en los diferentes órganos de la planta, aunque mantiene siempre los mismos tres tipos celulares.

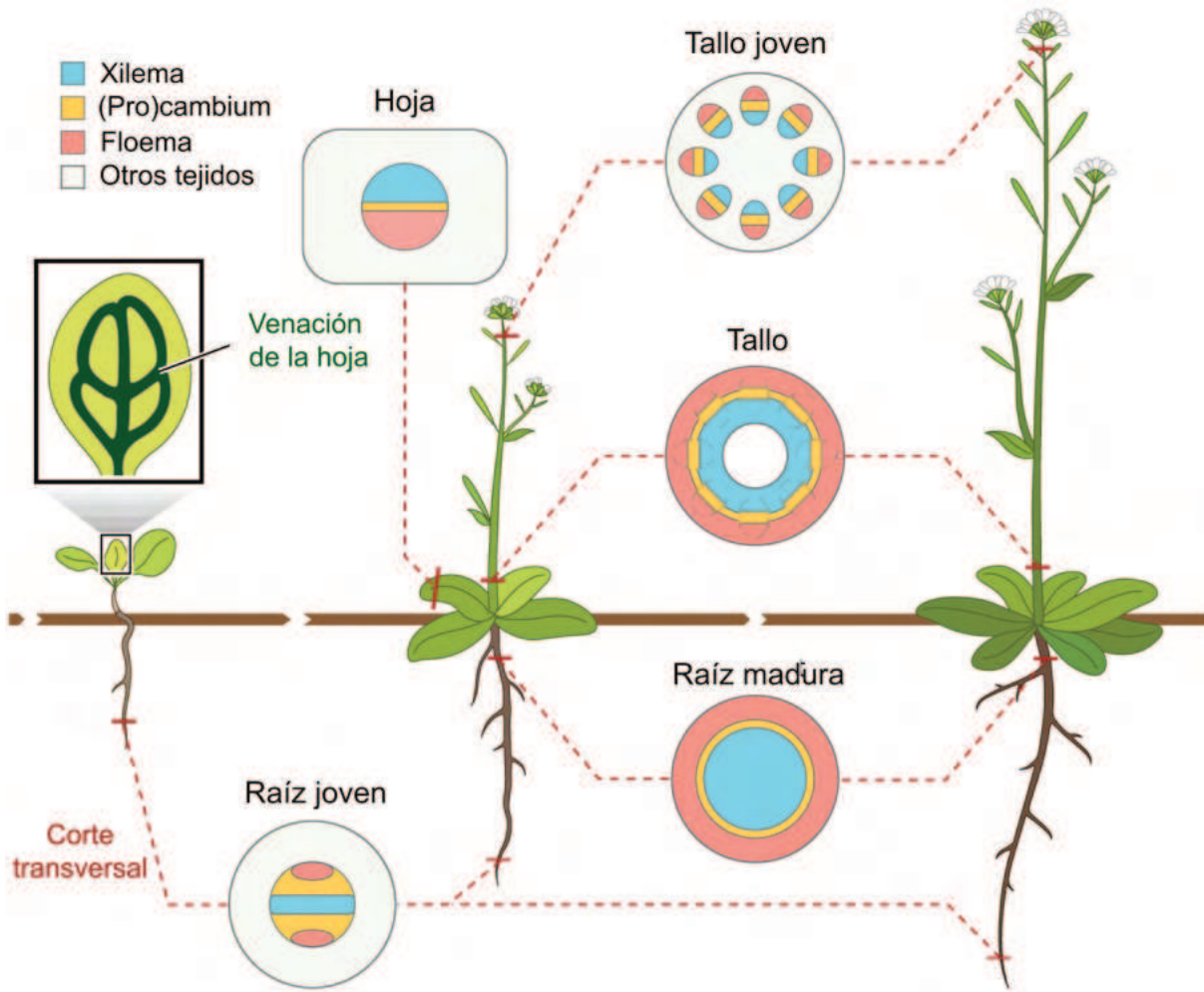
### **1.3.3 Patrón vascular de raíces**

En la vasculatura radicular primaria, el xilema ocupa el centro, el floema se ubica en dos polos en extremos opuestos, perpendiculares del eje del xilema y en medio de ambos se encuentran las células procambiales (Figura 2). Este patrón se establece inicialmente por la interacción entre niveles elevados de citoquininas y auxinas, que definen dominios distintos en el procámbium de la raíz. En la etapa de plántula, este patrón de

organización se expande longitudinalmente a lo largo de la raíz y el hipocótilo, conectando el meristema apical del tallo y el meristema apical de la raíz (Lucas y col., 2013; Agustí y Blázquez, 2020).

### 1.3.4 Patrón vascular de hojas

En cotiledones y hojas, el tejido vascular comienza a desarrollarse tan pronto como se establece el primordio y se distribuye en lo que se conoce como venas o nervaduras, que forman un sistema continuo, conectado y reticulado de haces vasculares (Figura 2). En estos haces, el xilema generalmente se orienta hacia la parte adaxial (superior) de la hoja y el floema, hacia la parte abaxial (Lucas y col., 2013; Agustí y Blázquez, 2020).

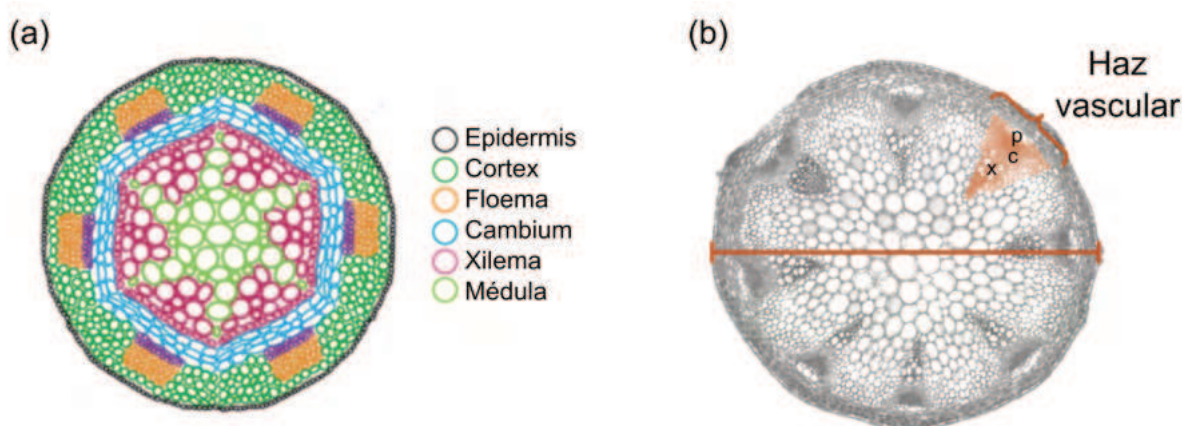


**Figura 2. Patrón vascular en los diferentes órganos de Arabidopsis**

El esquema muestra como el patrón vascular varía en hojas, raíces y tallos a lo largo del desarrollo. Figura modificada de Ruonala y col., 2017.

### 1.3.5 Patrón vascular de tallos

El patrón vascular de los tallos es el que resultará más inherente a este trabajo de Tesis. En *Arabidopsis*, la elongación del tallo floral comienza con la transición de la fase vegetativa a la reproductiva y la vasculatura primaria de los tallos se desarrolla en forma de haces vasculares discretos, no interconectados, que se distribuyen radialmente (Figura 2). Cada tallo desarrolla entre cinco y ocho haces vasculares en los que el floema se enfrenta a la parte externa del tallo y el xilema, a la interna (Figura 3). Entre ambos se ubican las células del cámbium (Agustí y Blázquez, 2020).



**Figura 3. Distribución radial de los haces vasculares dentro del tallo maduro de *Arabidopsis***

(a) Esquematación de la distribución radial y regularmente espaciada de los haces vasculares mostrando cada tipo celular que lo compone (figura modificada de Chang y col., 2022). (b) Imagen de un corte histológico longitudinal de tallo maduro de *Arabidopsis* en el que se señala uno de los ocho haces vasculares que lo componen, dentro del cual se marca la ubicación de floema (p), xilema (x) y cámbium (c). La línea longitudinal indica el diámetro del tallo.

Dentro del tallo, además de diferenciarse a xilema o floema, las células cambiales son claves en el desarrollo vascular secundario.

### 1.3.6 Desarrollo vascular secundario

El desarrollo secundario del tejido vascular tiene lugar en tallos, raíces e hipocotilos y se da de manera radial, causando un engrosamiento de dichos órganos y proporcionando una capacidad de transporte mejorada, así como mayor soporte mecánico y estabilidad. Este crecimiento es posible gracias a la actividad del cámbium vascular (Figura 2).

En el tallo de *Arabidopsis*, el cámbium vascular se desarrolla a través de la expansión lateral de las células procambiales ubicadas entre el xilema y el floema en los haces vasculares y la formación de nuevas células

cambiales. El sistema PXY/TDIF, mencionado anteriormente, también es crucial para la regulación del crecimiento vascular secundario (Agustí y Blázquez, 2020).

### **1.3.7 Funciones del sistema vascular**

Como se ha mencionado arriba, el sistema vascular de las plantas cumple funciones fundamentales tanto en el transporte de recursos como en el sostén estructural. A través del xilema y del floema se distribuyen agua, nutrientes minerales, azúcares y aminoácidos hacia los distintos órganos, garantizando el crecimiento y funcionamiento del organismo. Pero el floema es vital para mucho más que la función bien establecida del transporte de fotoasimilados. Se siguen descubriendo nuevas funciones de transporte, como el transporte floemático de fitohormonas, ARN pequeños, ARNm y proteínas. Este transporte de macromoléculas opera como una red de comunicación a larga distancia y contribuye a facilitar los programas de desarrollo coordinados, enviando señales que reflejan las condiciones bióticas y abióticas del entorno en diversas partes del cuerpo de la planta (Lucas y col., 2013).

Los elementos de tubo criboso que componen el floema también son capaces de regular la deposición de calosa en los plasmodesmos que los conectan, esto ofrece no solo la capacidad de regular el flujo de transporte a través de este tejido, sino que es especialmente útil como mecanismo de defensa de la planta frente al estrés biótico (Dong y col., 2008; Chen y Kim, 2009).

Por su parte, el crecimiento secundario y posterior lignificación de las células que componen el xilema proporciona una fuerte rigidez, un aspecto que cobra gran relevancia principalmente en tallos, ya que las células lignificadas pueden resistir la alta presión del agua y el estrés mecánico (Agustí y Blázquez, 2020).

## **1.4 LA RELACIÓN DE LAS PLANTAS CON EL ESTRÉS AMBIENTAL**

Las plantas están constantemente expuestas a una amplia variedad de estreses bióticos y abióticos que afectan su crecimiento y desarrollo. En condiciones de laboratorio el estrés se relaciona generalmente con una penalidad en la productividad, ya sea en términos de producción de semillas, frutos o biomasa (Lambers y col., 2008) y en condiciones de campo pueden tener un impacto devastador en el crecimiento y el rendimiento.

Entre los estreses abióticos más frecuentes se incluyen la sequía, salinidad, frío y calor, mientras que los bióticos abarcan la interacción con patógenos o herbívoros (Suzuki y col., 2014). Frente a estas condiciones, las plantas activan complejas redes de señalización que integran percepción del estrés, transducción de señales hormonales y regulación transcripcional. Estas vías buscan ajustar el metabolismo y modular la expresión génica para restablecer el equilibrio fisiológico (Zhu, 2016).

En la coordinación de la respuesta al estrés participan diversas hormonas, como ácido abscísico, etileno, jasmonatos y auxinas (Verma y col., 2016) y mecanismos de regulación transcripcional, como los mediados por los factores de transcripción HD-Zip I (*HOMEODOMAIN-LEUCINE ZIPPER 1*), ampliamente relacionados con la regulación de las respuestas a sequía, frío, salinidad, etc. (Olsson y col., 2004; Ariel y col., 2007; Ré y col., 2014; Perotti y col., 2017).

Un tipo de estrés abiótico menos descrito es el estrés mecánico, definido como la tensión física ejercida sobre los tejidos vegetales.

### 1.5 LA PARTICULARIDAD DEL ESTRÉS MECÁNICO

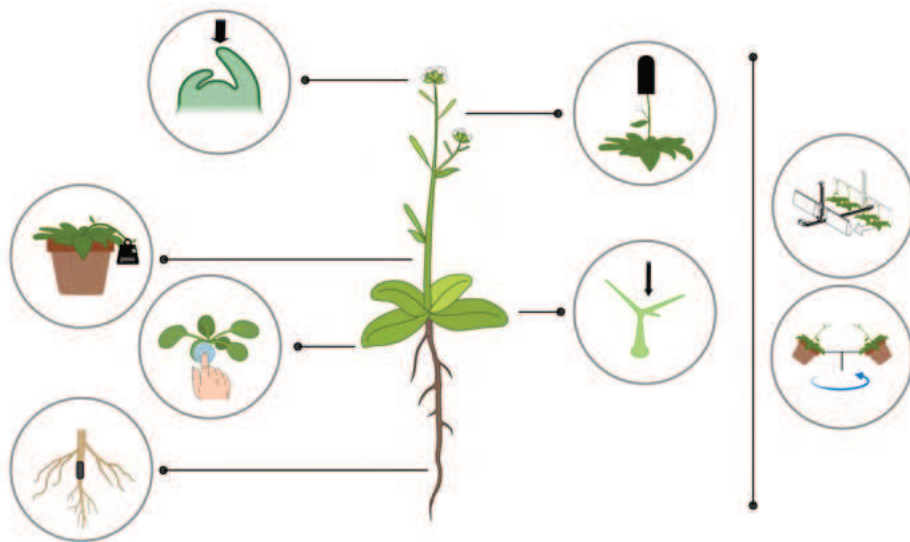
En la naturaleza, las plantas están constantemente expuestas a diversas formas de estrés mecánico: la lluvia, la nieve, el viento, los animales, los patógenos o las propias plantas. En muchos casos, estos estímulos mecánicos inducen respuestas que han demostrado tener un valor adaptativo. Un ejemplo clásico es la respuesta de los árboles al viento, que da como resultado troncos más cortos y gruesos. La respuesta de las plantas a este tipo de estrés es conocida como tigmomorfogénesis, e involucra una variedad de cambios en el patrón de crecimiento y en la arquitectura de la planta.

En condiciones experimentales, el estrés mecánico puede inducirse mediante distintas formas de manipulación física, como la aplicación de peso, la torsión o flexión del tallo, el cepillado de los órganos, el roce repetido o incluso la exposición a hipergravedad, lo que representa un amplio espectro de fuerzas que actúan sobre la planta (desde leves presiones locales hasta cargas persistentes) y difieren en intensidad, duración y espacialidad (Figura 4). Como ejemplos podemos citar el trabajo de Ko y col., (2004) en el que el estrés mecánico implica la colocación artificial de peso sobre la vara floral de *Arabidopsis* durante un período de 3 días; el trabajo de Louveaux y col., (2016) en el que se aplican microcargas controladas que actúan exclusivamente sobre el meristema; el de Matsumoto y col., (2010), en el que someten plántulas enteras a fuerzas centrífugas para emular los efectos de la hipergravedad; o el de Zhdanov y col., (2022) en el que las plantas adultas son sometidas a cepillado periódico hacia un lado y el otro.

Estas distintas formas de estrés mecánico también desencadenan efectos a varios niveles de organización biológica. A nivel molecular y de señalización, uno de los eventos más tempranos es la elevación transitoria de  $Ca^{2+}$  citosólico tras la estimulación mecánica, lo que activa sensores como calmodulinas o *calmoduline-like*, y puede disparar cascadas de señalización que incluyen quinasas, fosforilasas, y cambios en la fosforilación de proteínas (Chehab y col., 2009), en conjunto con la activación de proteínas de pared relacionadas a la percepción inicial del estímulo mecánico, como FLA11 y FLA12 (Ma y col., 2022). Además, se observa inducción de genes involucrados en la remodelación de la pared celular, transporte de iones, defensa y modificación de la pared, entre otros (Hansen y col., 2025).

A nivel celular, se ha demostrado que la estimulación mecánica altera la organización del citoesqueleto: en hojas e hipocotilos de *Arabidopsis*, la aplicación de presión externa o centrifugación provoca un reordenamiento de microtúbulos corticales, que se alinean en haces y adoptan un patrón coordinado entre células adyacentes, posiblemente para guiar la deposición de celulosa y reforzar la pared celular en las zonas sometidas a estrés. Estas reorganizaciones pueden condicionar la anisotropía del crecimiento celular y el remodelado de la pared frente a fuerzas mecánicas (Matsumoto y col., 2010; Jacques y col., 2013).

Finalmente, a escala de planta entera (fenotípica y fisiológica), el estrés mecánico puede modificar la arquitectura y el desarrollo: las respuestas típicas de tigmomorfogénesis incluyen acortamiento del tallo, ensanchamiento radial, redistribución de la biomasa, modificación en la composición anatómica del tallo (por ejemplo, aumento del xilema y el floema) y alteraciones en el rendimiento o la respuesta al estrés (Ko y col., 2004; Zhdanov y col., 2022; Hansen y col., 2025). Asimismo, los estímulos mecánicos suaves (como un toque periódico sobre la hoja) pueden inducir una respuesta de defensa: en *Arabidopsis*, un estímulo mecánico suave sobre las hojas provocó un aumento rápido de  $Ca^{2+}$ , liberación de ROS y cambios en la permeabilidad de la cutícula, y poco después se observó una mayor resistencia local y sistémica contra hongos patógenos (Benikhlef y col., 2013).



**Figura 4. Diversidad de formas de aplicar estrés mecánico sobre *Arabidopsis* en condiciones de laboratorio**

Dentro del abanico de los posibles tratamientos mecánicos que se pueden ejercer sobre *Arabidopsis* encontramos fuerzas leves y puntualmente localizadas, como la aplicación de micro-cargas sobre meristemas o tricomas de hojas; la colocación de cargas sobre la vara floral; la aplicación de centrifugación de plantas completas; el *touching* de hojas de rosetas o tallos; la constricción forzada de la raíz; el *brushing* o cepillado, etc. Todos estos tratamientos pueden variar en su duración, abarcando desde segundos hasta días, y en la fuerza ejercida.

Este trabajo de Tesis se cimienta sobre el estrés mecánico descrito por Cabello y Chan (2019); en ese trabajo se observó que las plantas de Arabidopsis y girasol respondían a un estrés mecánico basado en la colocación de peso sobre la vara floral generando tallos ensanchados, un aumento del número de haces vasculares y un significativo aumento en la producción de semillas. A nivel hormonal, las autoras también demostraron que las auxinas juegan un rol esencial en esta respuesta a través de la participación de los transportadores de tipo AUX y LAX.

Desde una perspectiva aplicada, comprender cómo las plantas trasladan señales mecánicas en cambios vasculares y de rendimiento abre vías para estrategias agronómicas que modifiquen arquitectura y resiliencia sin recurrir al uso de químicos. Sin embargo, persisten preguntas clave: ¿qué vías se activan frente al estrés mecánico? ¿Cómo se integran señales mecánicas con redes hormonales en tejidos específicos? ¿Cuánto de lo hallado en Arabidopsis puede ser trasladado a plantas de interés agronómico?

En este contexto, este trabajo de Tesis se centra en el estudio de los mecanismos moleculares y hormonales que vinculan la respuesta del sistema vascular del tallo al estrés mecánico, el transporte de azúcares y la regulación hormonal y transcripcional de estos procesos.

## 2. OBJETIVOS DEL TRABAJO

### 2.1 OBJETIVO GENERAL DEL TRABAJO DESARROLLADO

El objetivo general de este plan de trabajo es contribuir a la comprensión de los mecanismos moleculares y fisiológicos puestos en juego durante la formación de nuevos haces vasculares mediante el ensanchamiento del tallo de las plantas, causado por el tratamiento mecánico de aplicación de peso sobre la vara floral. Buscamos responder: a) ¿Qué hormonas, además de las auxinas, están implicadas en este proceso? b) ¿Está relacionado el aumento en la producción de semillas provocado por el peso con un transporte de azúcares más eficiente derivado de una mayor cantidad de haces? c) ¿Qué genes están participando en esta respuesta? d) ¿Cómo se relaciona la respuesta al estrés mecánico con la respuesta a otros tipos de estrés abiótico?

Finalmente, como objetivo a largo plazo, se plantea que la comprensión de estos mecanismos nos podría conducir al desarrollo de estrategias para el aumento de la productividad en cultivos de interés agronómico.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Investigar el rol de otras hormonas vegetales, además de las auxinas, involucradas en el proceso de ensanchamiento del tallo y el aumento del número de haces vasculares. Nos enfocaremos en las estrigolactonas (SLs) y los BRs. Aplicaremos el tratamiento de peso durante 24 y 48 h a mutantes en la síntesis y/o señalización de estas fitohormonas. Mediremos el diámetro del primer entrenudo al inicio y al final de las 24 y 48 h de tratamiento de los genotipos mutantes y sus controles y visualizaremos la cantidad de haces vasculares de los mismos haciendo cortes histológicos seguidos de tinción de las plantas tratadas y sus controles. En función de los resultados que se obtengan, profundizaremos el estudio siguiendo las estrategias experimentales detalladas en Cabello y Chan (2019).

2- Investigar si el aumento del número de haces vasculares se correlaciona con un mejor transporte de azúcares solubles necesarios para la formación de las semillas. Para esto, proponemos realizar ensayos de partición de carbono (Durand y col., 2018) y cuantificar almidón y azúcares solubles en hojas de roseta y sacarosa en segmentos de tallo de plantas de *Arabidopsis* salvajes (WT) tratadas con peso y sin tratar (Strand y col., 1999).

3- Investigar si las plantas tratadas con peso tienen una respuesta diferencial al estrés abiótico (sequía, salinidad, etc.). Para este objetivo someteremos plantas tratadas con peso y controles a distintos tratamientos de estrés. Mediremos entrenudos, cantidad de haces y producción de semillas luego del tratamiento estresante para ver si este estrés modifica la arquitectura del tallo adquirida después del tratamiento con peso. En función de los resultados que se obtengan, profundizaremos el estudio.

- 4- Estudiar la variación en el transcriptoma de las plantas tratadas con peso. Para este objetivo tomaremos muestras de tallo del primer entrenudo, tratadas durante 6 h, ya que en ese punto es cuando comienza la formación de nuevos haces (Cabello y Chan, 2019). Analizaremos los datos transcriptómicos para poder determinar qué vías de señalización se encuentran afectadas y qué genes dentro de esas vías presentan cambios significativos en sus niveles de expresión.
- 5- En función de los resultados que se obtengan del punto anterior, seleccionaremos un grupo de genes candidatos para cuantificar por RT-qPCR en muestras tomadas del mismo tejido, estadio de desarrollo y tiempo de tratamiento que se utilizaron para el objetivo anterior.
- 6- Caracterizar fenotípicamente las plantas transformadas/mutantes relacionadas con la respuesta al estrés mecánico, realizando medidas de diámetro del tallo principal, cantidad de haces vasculares, producción de semillas, biomasa, entre otras.
- 7- Relacionar la caracterización fenotípica de las plantas sometidas al estrés mecánico con fenotipos conocidos de líneas mutantes y sobreexpresantes de factores de transcripción para comprobar si existe una regulación transcripcional de todos los fenómenos asociados a la respuesta a este estrés.

# CAPÍTULO I

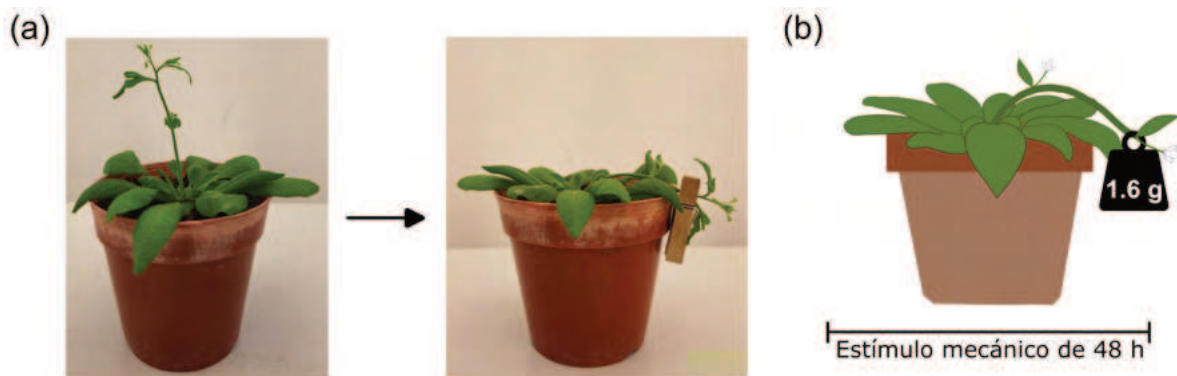
---

Interacción hormonal y señalización de CLE44 en la respuesta del tallo de Arabidopsis al  
estrés mecánico

# 1. INTRODUCCIÓN AL CAPÍTULO I

## 1.1 LA NECESIDAD DE PROFUNDIZAR SOBRE LA RESPUESTA AL ESTRÉS MECÁNICO

Como se ha mencionado antes, si bien los tipos de estrés mecánico aplicados en laboratorio pueden variar ampliamente, aquí nos centraremos en estudiar específicamente el utilizado e informado por Cabello y Chan, (2019). En este caso, el estrés fue aplicado sobre plantas de *Arabidopsis* en estadio reproductivo, con una vara floral de 4 cm de altura, a las que se le colocó sobre el ápice del tallo un objeto de 1.6 g, que generó peso y flexión del tallo durante un período de 48 h (Figura 5).



**Figura 5. Aplicación del estrés mecánico empleada durante este trabajo**

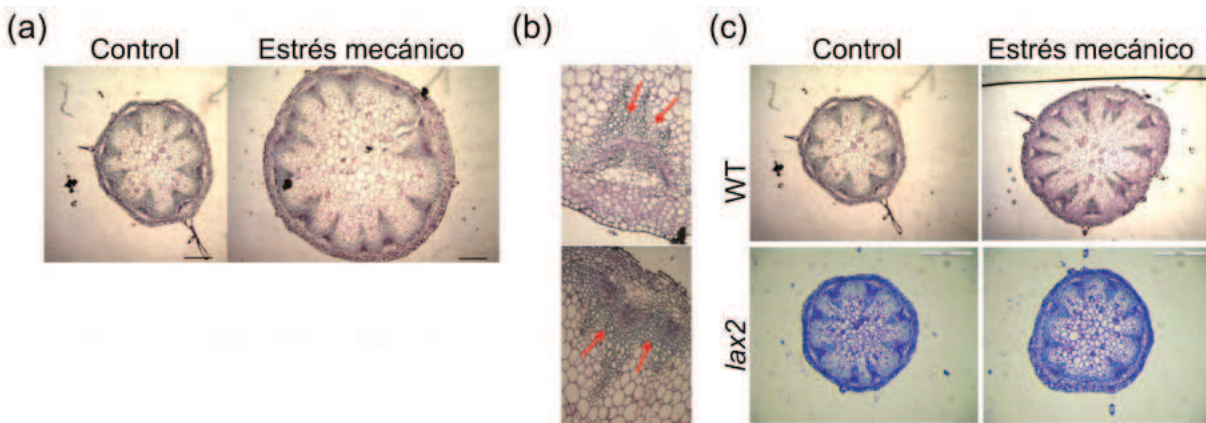
(a) Para la generación del estrés se utilizaron plantas de *Arabidopsis* sembradas de a una por maceta, crecidas en condiciones normales hasta alcanzar una vara floral de 4 cm de altura, en ese momento se aplicó un peso de 1.6 g en el ápice de la vara, sin ejercer ruptura física. El peso se mantuvo durante un período de 48 h, luego del cual fue retirado y el crecimiento continuó en condiciones normales. (b) Representación esquemática del tratamiento aplicado.

El estudio demostró que este tipo de estrés mecánico genera engrosamiento y aumento del número de haces vasculares del tallo, que pasan de 6-8 a 10-12 (Figura 6a). Al realizar cortes histológicos transversales de secciones de tallo se observó que el aumento en la cantidad de haces vasculares se produce inicialmente en el ápice y más tarde en la base de la vara floral, y que ocurre por duplicación de haces preexistentes (Figura 6b). El número se revierte 15 días después de finalizado el tratamiento, cuando las plantas vuelven a tener el número original de haces vasculares, pero permanecen hasta el final de su ciclo de vida con un mayor área de xilema, mostrando la gran plasticidad que tiene el sistema vascular para adaptarse a los cambios, según las necesidades de la planta, durante todo el ciclo de vida (Cabello y Chan, 2019).

Finalmente, este estrés mecánico no sólo modificó la arquitectura de los órganos, sino también el rendimiento de semillas. Resulta sumamente interesante que las plantas tratadas con peso generen una producción de semillas significativamente mayor que sus controles, un aumento que alcanza casi el 50 %

(Cabello y Chan, 2019). El interés de esto radica en que, en general, se asocia al estrés en plantas con efectos negativos sobre la producción, pero este estrés controlado resulta en un mejoramiento.

La participación de la fitohormona auxina, una hormona necesaria para la generación de tejido vascular, es esencial en la respuesta al estrés mecánico. Las plantas mutantes en transportadores de auxinas de tipo AUX/LAX (*AUXINI/LIKE AUXI*) no responden de igual manera que una planta WT (Figura 6c). En el caso de la mutante *lax2* no se observa ninguna de las características fenotípicas relacionadas a la respuesta: no hay engrosamiento de tallo, cambio en el número de haces vasculares ni alteraciones en la producción final de semillas (Cabello y Chan, 2019).



**Figura 6. Cambios anatómicos del tallo de Arabidopsis en respuesta al estrés mecánico observados por Cabello y Chan (2019)**

(a) El tratamiento mecánico de 48 h aplicado por las autoras generó aumento en el diámetro y número de haces vasculares del tallo de plantas salvajes. (b) Imágenes que ilustran la división de los haces vasculares (marcado con flechas rojas) en las plantas tratadas con peso. (c) La respuesta se observa en líneas de Arabidopsis mutantes en el transportador de auxinas, *lax2*. Figura tomada de Cabello y Chan, 2019.

La auxina es una de las principales hormonas involucradas en la diferenciación y el patrón del tejido vascular en plantas (Ibañez y col., 2009). Su distribución polar determina zonas de acumulación que actúan como centros de señalización para la formación de traqueidas y elementos de vaso (Sachs, 1981; Scarpella y col., 2006). Este patrón direccional depende de transportadores de eflujo de tipo PIN (*PIN-FORMED*), cuya localización polar en la membrana plasmática orienta el flujo intercelular de auxina y establece gradientes esenciales para la organización del procámbium y del xilema primario (Benková y col., 2003; Petrášek y col., 2006). En particular, PIN1 y PIN3 han sido ampliamente implicados en la canalización de la auxina hacia las zonas de diferenciación vascular, mientras que PIN7 contribuye a la redistribución en etapas tempranas del desarrollo del tallo y del embrión (Blilou y col., 2005). Además, el ensanchamiento del tallo en plantas tratadas con peso también depende de PIN3 (Carrió-Seguí y col., 2024)

Complementariamente, los transportadores de auxina de la familia AUX1/LAX permiten la entrada de la hormona al citoplasma, modulando la sensibilidad y la dirección del transporte polar. Dentro de este grupo, LAX2 cumple un papel clave en la formación y continuidad del sistema vascular, promoviendo la diferenciación del xilema y la conexión entre los tejidos vasculares de los órganos aéreos (Péret y col., 2012; Swarup y Bhosale, 2019). Las plantas mutantes *lax2* muestran interrupciones en la continuidad de los haces vasculares y alteraciones en la arquitectura del xilema, lo que evidencia su función complementaria a los transportadores PIN en la canalización de la auxina (Péret y col., 2012, Fàbregas y col., 2015). Así, la coordinación entre los sistemas de transporte activo de entrada (LAX2) y salida (PIN) define los gradientes de auxina que dirigen el patrón espacial del tejido vascular durante el crecimiento y la regeneración.

Sin embargo, esta no es la única fitohormona que se ha relacionado con el desarrollo vascular. Otras hormonas como los BRs o las SLs también tienen roles clave en la regulación de este tejido y podrían estar involucradas en la respuesta al estrés mecánico aplicado por Cabello y Chan (2019), que será el mismo con el que trabajaremos en esta Tesis.

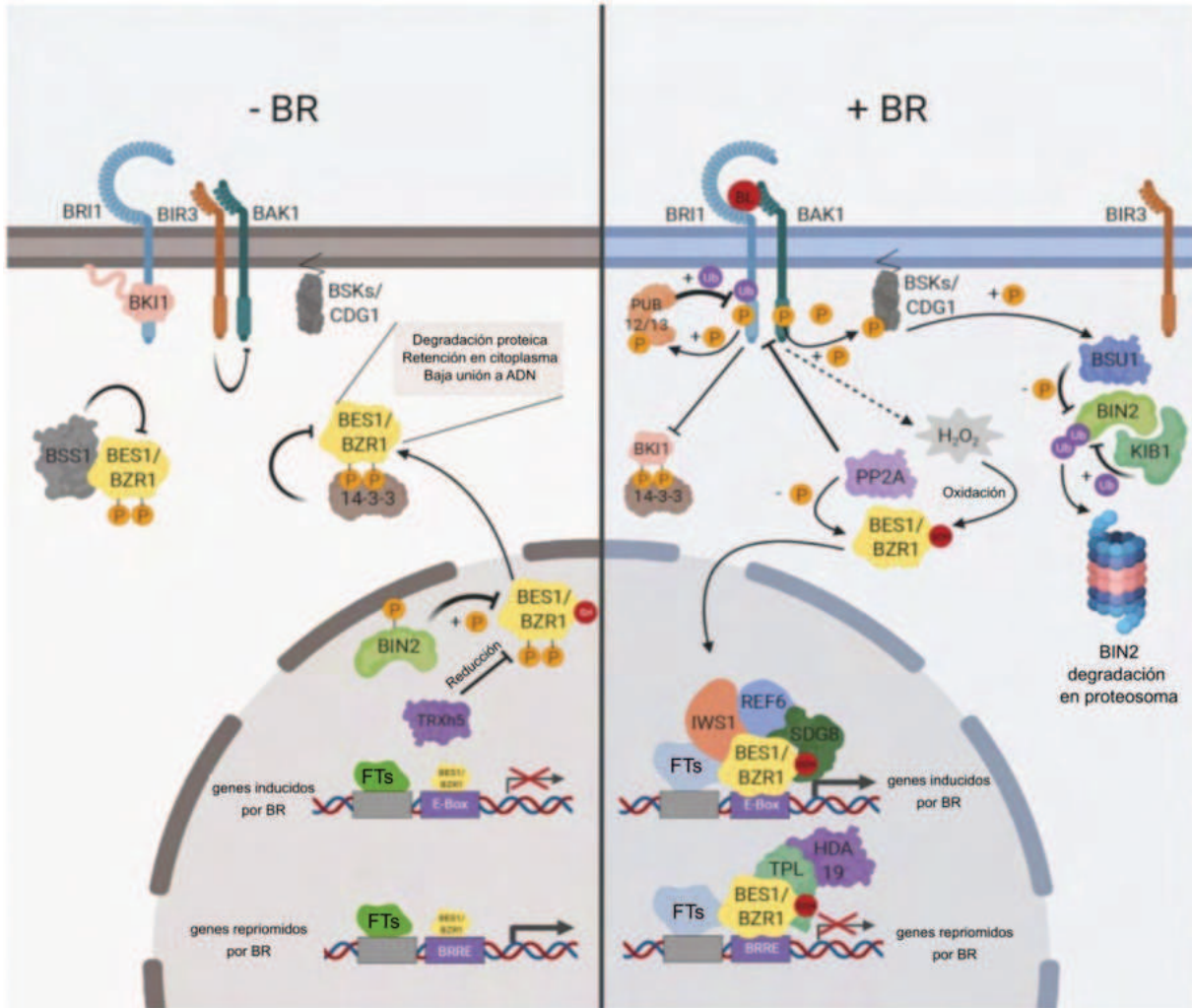
## **1.2 REGULACIÓN HORMONAL EN EL DESARROLLO DEL TEJIDO VASCULAR**

Entre las hormonas vegetales que regulan la formación y diferenciación del tejido vascular, las auxinas ocupan un papel central y su acción ha sido descrita arriba, pero el rol de los BRs y las SLs en este proceso también es esencial y debe ser destacado.

### **1.2.1 Brasinoesteroides y tejido vascular**

Los BRs son esteroides vegetales, esenciales para el crecimiento y desarrollo. Estas hormonas controlan la división, elongación y diferenciación de diversos tipos celulares a lo largo de todo el ciclo de vida de la planta. La percepción de BRs ocurre mediante el receptor BRI1 (*BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1*) y su correceptor BAK1 (*BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1*). Al unirse a la fitohormona estos receptores inician una cascada de fosforilación intracelular que culmina en la promoción de la actividad y estabilidad de los factores de transcripción de respuesta a BRs, BES1 (*BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1*) y BZR1 (*BRASSINAZOLE RESISTANT 1*), que controlan directamente la transcripción de miles de genes sensibles a BRs (Li y Chory, 1997; Wang y col., 2001; Wang y col., 2002; Yin y col., 2002; Russinova y col., 2004).

En ausencia de BRs, la quinasa BIN2 (*BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2, GSK3-like kinase*) fosforila a BES1 y BZR1, promoviendo su degradación en el citoplasma (Peng y col., 2008, Nolan y col., 2020). Esto inhibe su capacidad para unirse al ADN y provoca la inactivación de la vía (Figura 7).



**Figura 7. Esquema general de la vía de señalización de brasinoesteroides**

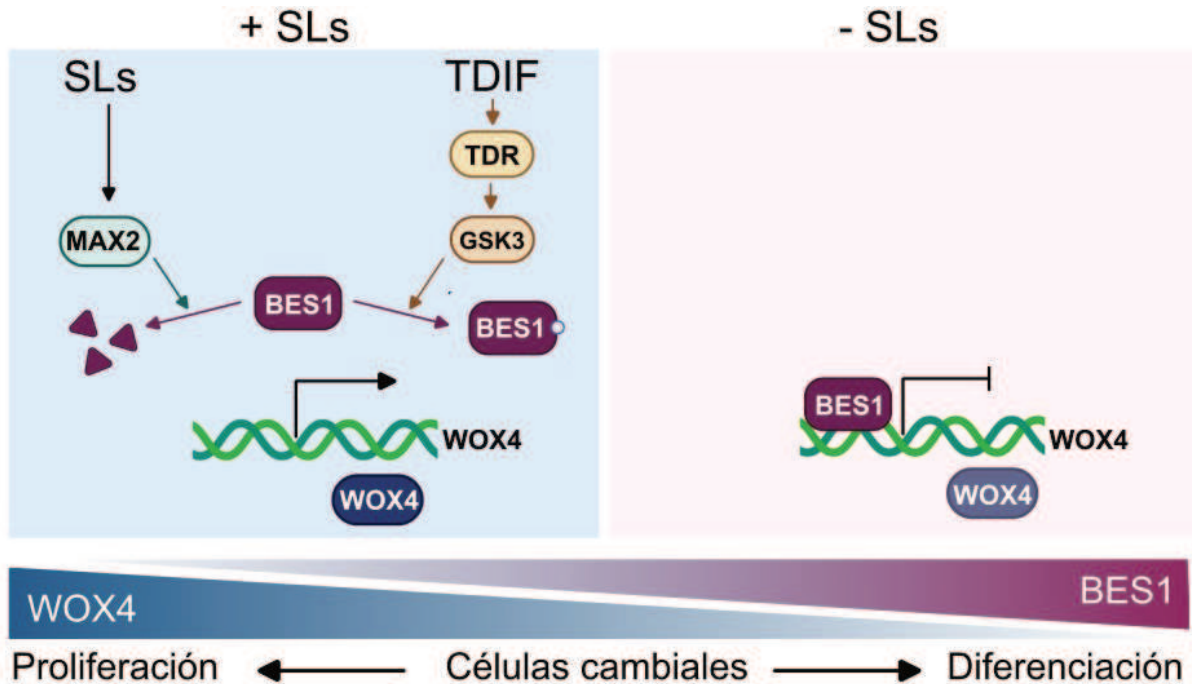
En ausencia de BRs (izquierda) los receptores BRI1 y BAK1 son inhibidos y la quinasa BIN2, que funciona como un regulador negativo, fosforila a BES1 y BZR1 para inhibir su actividad. Esto conduce a una baja expresión de genes de respuesta a BRs y una mayor expresión de genes reprimidos por la hormona. Cuando los BRs están presentes, se unen al receptor BRI1 y al correceptor BAK1 para iniciar la señalización de BRs (derecha). Esto permite que BRI1 y BAK1 se fosforilen y se activen al mismo tiempo que se inhibe a BIN2. La desfosforilación por PP2A permite que BES1 y BZR1 funcionen como factores de transcripción para promover la expresión génica inducida por BRs. Figura adaptada de Nolan y col., 2020.

La señalización mediada por BRs está involucrada en el desarrollo de tejidos vasculares. Las plantas deficientes en BRs, que albergan mutaciones en genes clave para la síntesis de la fitohormona, tienen un desarrollo anormal del xilema (Choe y col., 1999; Szekeres y col., 1996); mutantes del receptor de BRs también exhiben una diferenciación vascular anormal (Caño-Delgado y col., 2004). Se ha informado además que la diferenciación de las células cambiales en vasos del xilema está regulada por GSK3, actuando los BRs como reguladores negativos de la diferenciación del xilema (Kondo y col., 2014; Saito y col., 2018).

Finalmente, en conjunto con las auxinas, los BR también participan en el establecimiento del patrón periódico de los haces vasculares (Ibañes y col., 2009), controlando el número de células.

### 1.2.2 Estrigolactonas y sistema vascular

Otra hormona involucrada en la regulación del desarrollo vascular es la estrigolactona, un terpenoide derivado de carotenoides cuya biosíntesis es catalizada por las enzimas MAX3 (*CCD7*, *CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE7*) y MAX4 (*CCD8*). Originalmente descritas por su rol en la inhibición de la ramificación, las SLs también participan en la activación del cámbium y el mantenimiento del meristema vascular. Las plantas mutantes en las vías de síntesis y señalización de SLs muestran reducción en la cantidad de células del cámbium y el tratamiento localizado con GR-24, un análogo sintético de las SLs, mejora la actividad meristemática del cámbium vascular (Agustí y col., 2011).



**Figura 8. Modelo que ilustra como BES1 y WOX4 median la señalización de estrigolactonas para regular la proliferación y diferenciación de células cambiales durante el crecimiento secundario**

BES1 y WOX4 regulan antagónicamente la actividad cambial durante el crecimiento secundario. BES1 induce la diferenciación a xilema y floema y reprime la transcripción de *WOX4*, encargado de promover la proliferación celular. La señalización de SLs promueve la actividad del cámbium induciendo la degradación de BES1, lo que conduce a una mayor expresión de *WOX4* y a la proliferación cambial. De forma similar, la señalización inducida por TDIF inhibe la actividad transcripcional de BES1 a través de la vía TDR-GSK3s, lo que también promueve la expresión de *WOX4* y la proliferación del cámbium. Por el contrario, cuando se reduce la señalización SLs o TDIF, aumenta la actividad de BES1, lo que suprime la expresión de *WOX4* y la proliferación del cámbium, pero potencia la diferenciación de las células cambiales. Figura adaptada de Hu y col., 2022.

Algunos estudios moleculares recientes han mostrado que la transducción de la señal de SLs utiliza factores transcripcionales compartidos con la vía de los BRs. La cascada de señalización mediada por SLs promueve cambios en BES1 que conducen a la represión de *WOX4*, un regulador positivo de la proliferación de células cambiales, proporcionando así un mecanismo molecular por el cual las SLs limitan o redirigen la proliferación celular cambial y, por ende, la tasa de crecimiento secundario (Hu y col., 2022; Figura 8).

Además, la señalización mediada por SLs también involucra reguladores transcripcionales como BRC1 (*BRANCHEDI*), un factor de transcripción de la familia TCP que controla la inhibición de yemas axilares (González-Grandío y col., 2013; Wang y col., 2020).

BRC1 ha sido bien descrito como un regulador positivo de la expresión de genes que codifican para tres factores de transcripción de la familia HD-Zip I: AtHB21, AtHB40 y AtHB53 (González-Grandío y col., 2017), y estudios recientes de transcriptómica también lo han vinculado con la regulación de la expresión de genes relacionados al desarrollo vascular, entre ellos *CLE44* (van Es y col., 2024).

Por su parte, los BRs también son capaces de modular la expresión de *BRC1* (Hu y col., 2019), que es blanco directo de BES1, que actúa como represor transcripcional (es decir, la activación de la vía de los BRs conduce a la represión de *BRC1*).

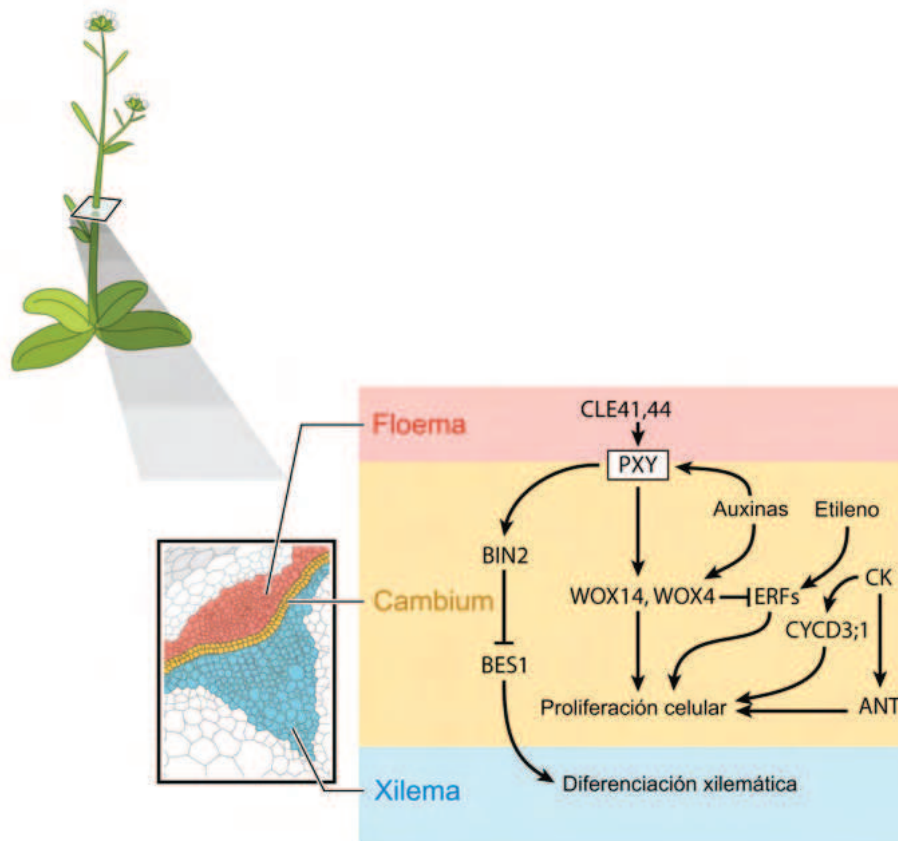
La integración de estos modelos indica que las SLs y los BRs actúan conjuntamente en la regulación de la dinámica de las células del cámbium y, al mismo tiempo, sincronizan la regulación de la ramificación (vía BRC1), teniendo a BES1 como principal nodo de convergencia entre ambas vías.

### **1.3 SEÑALIZACIÓN MOLECULAR ESPECÍFICA DE TEJIDO VASCULAR**

El desarrollo del tejido vascular está gobernado por redes de señalización altamente conservadas que integran señales hormonales, péptidos y factores de transcripción. Arriba nos hemos detenido en BRs y SLs, dos hormonas clave en la regulación del desarrollo de este tejido, y antes se describió el papel de las auxinas. Pero se debe destacar también el rol de uno de los mecanismos mejor caracterizados en la regulación del desarrollo vascular: el módulo de señalización PXY/TDR–TDIF–WOX4/WOX14 (EtcHELLS y Turner, 2010; Hirakawa y col., 2010).

Los péptidos TDIF (TRACHEARY DIFFERENTIATION INHIBITORY FACTOR), codificados por los genes *CLE41* y *CLE44*, son producidos en el floema y se transportan hacia las células procambiales, donde se unen a su receptor PXY/TDR (TDIF RECEPTOR). Esta interacción inhibe la diferenciación de xilema e induce la proliferación de células procambiales, asegurando la correcta organización de los haces (Fisher y Turner, 2007; EtcHELLS y col., 2013). La activación de PXY promueve la expresión de los factores de transcripción *WOX4* (WUSCHEL HOMEBOX RELATED 4) y *WOX14*, que regulan de forma redundante

la división celular y el mantenimiento del cámbium. Entonces, la señal CLE41/44-PXY/TDR estimula la proliferación de células del cámbium y, al mismo tiempo, inhibe la diferenciación hacia xilema manteniendo un equilibrio entre división y diferenciación (Figura 9). Además, como se ha mencionado arriba, esta vía se ve afectada por la acción hormonal de las SLs y los BRs.



**Figura 9. Redes genéticas subyacentes a la especificación del tejido vascular**

Modelo simplificado de algunas de las redes moleculares y hormonales que participan en la regulación vascular. El receptor PXY (quinasa) es activado por sus ligandos, CLE41 y CLE44, y regula positivamente la expresión de *WOX4* y *WOX14*, lo que resulta en la proliferación celular en el cámbium. Además, la vía PXY activa BIN2, una proteína GSK3 que inhibe la expresión del factor de transcripción de BRs, BES1, estimulando la diferenciación del xilema. Otros factores, como los ERF inducidos por etileno y los ANT y CYCD3;1 inducidos por citoquininas también participan en la proliferación celular del cámbium. Figura adaptada de Ruonala y col., 2017.

Si bien la señalización TDIF/PXY es la que resulta de mayor relevancia en este trabajo de investigación, también existen otros factores, como VND6/VND7 (*VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN*) y APL (*ALTERED PHLOEM DEVELOPMENT*), que coordinan la diferenciación del xilema y del floema respectivamente, completando la transición de células meristemáticas a tejidos conductores especializados (Bonke y col., 2003; Kubo y col., 2005).

Cabe destacar que la expresión de la mayoría de estos genes responde no solo a patrones de desarrollo, sino que puede verse alterada por diversos estímulos ambientales. En este contexto, el péptido CLE44 emerge como un candidato que podría ser clave en la transducción de señales de estrés mecánico hacia respuestas de proliferación vascular.

#### **1.4 EL PÉPTIDO CLE44**

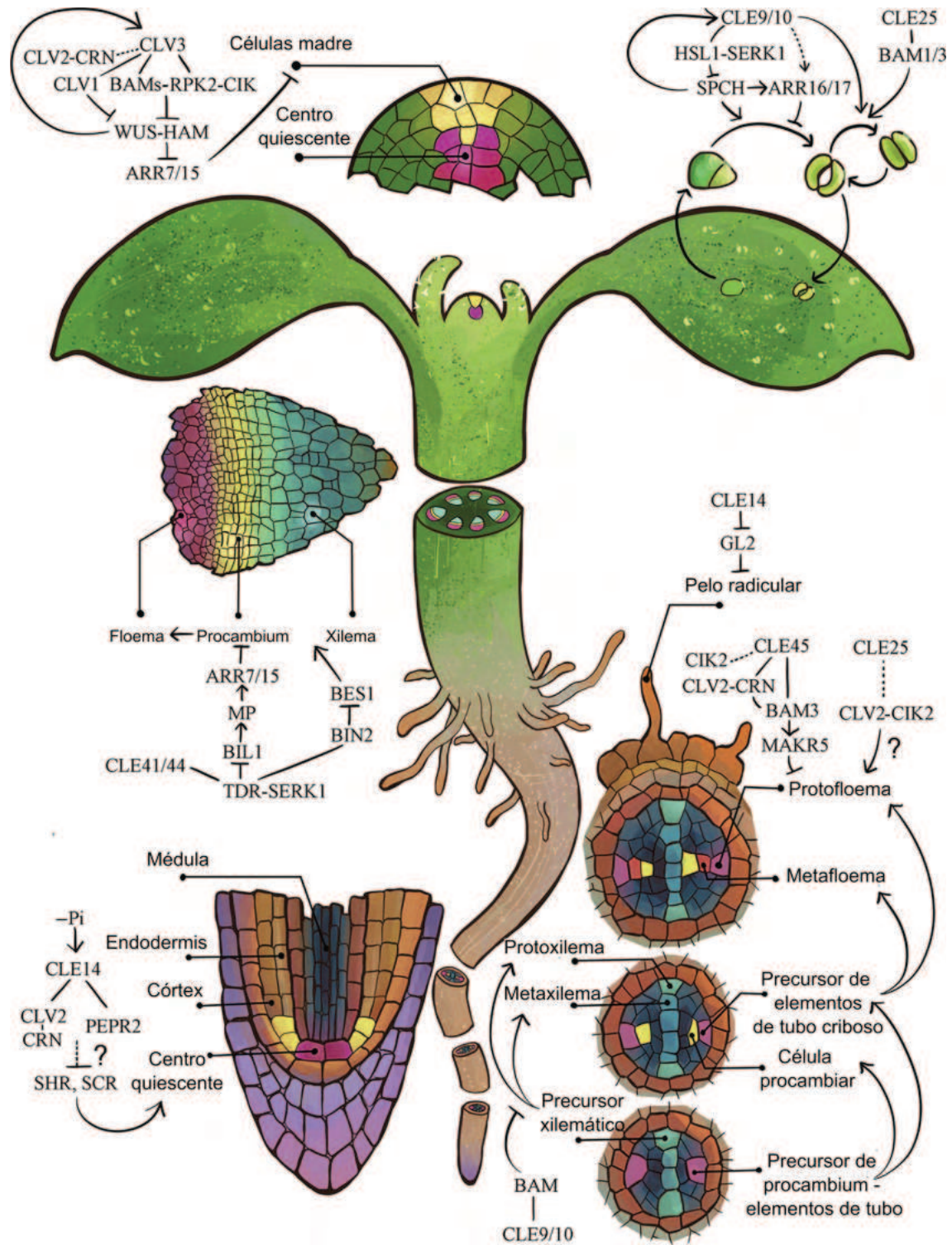
Los péptidos de la familia CLE (*CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION-RELATED*) constituyen una clase de señales móviles que regulan procesos de proliferación y diferenciación celular en múltiples tejidos vegetales (Fletcher, 2020).

En *Arabidopsis* existen más de 30 genes *CLE* con funciones diversas en el control del tamaño del meristema apical, la organización del tejido vascular, el desarrollo radicular y la respuesta a condiciones de estrés (Fletcher, 2020; Figura 10). Dentro de esta familia, *CLE41* se co-expresa con *CLE44* y ambos codifican péptidos idénticos conocidos como TDIF, que actúan en el floema para modular la actividad del procámbium a través del receptor PXY/TDR (Hirakawa y col., 2008).

Cada péptido CLE se sintetiza como un precursor. El péptido precursor de CLE44 contiene una secuencia señal N-terminal, un dominio central variable y un dominio C-terminal altamente conservado de 12–14 aminoácidos que define su actividad biológica, siendo responsable de su reconocimiento por PXY (Fletcher, 2020). Tras la traducción, la proteína propeptídica se procesa mediante proteasas y es glicosilada en residuos de hidroxiprolina. Estas modificaciones son necesarias para su estabilidad y reconocimiento por el receptor (Matsubayashi, 2014).

Una vez maduro, el péptido TDIF es secretado al apoplasto desde las células del floema y puede desplazarse hacia las células procambiales vecinas, donde ejerce su función reguladora. Este movimiento local permite establecer un gradiente de señalización que mantiene la proliferación procambial y previene la diferenciación prematura del xilema (Etchells y col., 2013).

Como se ha descrito arriba, la principal función conocida de CLE44 es la regulación del desarrollo vascular secundario. La unión con su receptor, PXY, activa una cascada de señalización que culmina en la inducción de *WOX4* y *WOX14*. Esto permite mantener la organización radial del tejido vascular y asegura la simetría del crecimiento del tallo (Etchells y col., 2013; Hirakawa y col., 2010).



**Figura 10. Rol de los péptidos de la familia CLE en diferentes tejidos de Arabidopsis**

CLV3 media la homeostasis de las células madre en el SAM; CLE41/44 regulan la actividad cambial del tallo; CLE9/10 y CLE25 afectan aspectos del desarrollo y la función estomática y radicular; en raíces, CLE9/10 regulan la formación del xilema y CLE25 promueve la diferenciación de las células del protofloema; CLE45 inhibe la diferenciación de las

células del protofloema radicular; CLE14 induce la diferenciación del RAM en respuesta a condiciones de bajo fosfato.  
Figura adaptada de Fletcher, 2020.

## 2. OBJETIVOS DEL CAPÍTULO I

El propósito general de este capítulo es analizar los mecanismos moleculares y fisiológicos que vinculan la percepción del estrés mecánico con su respuesta en *Arabidopsis*, buscando comprender si existe una relación entre las fitohormonas como BRs y SLs o señales peptídicas tipo CLE con los fenotipos observados por Cabello y Chan (2019) de ensanchamiento de la vara principal del tallo y duplicación de los haces vasculares. Se propone:

1- Investigar el rol de los BRs y las SLs en relación con el proceso de ensanchamiento del tallo y el aumento del número de haces vasculares.

2- Comprobar los efectos del agregado exógeno de análogos sintéticos de BRs y SLs, al igual que inhibidores de estas vías hormonales, durante el desarrollo de la respuesta al agregado de peso.

3- Caracterizar la respuesta del agregado de peso en las líneas mutantes de genes de síntesis, respuesta y señalización de estas fitohormonas: *bes1*, *bzr1*, *max4* y *brc1*. También analizaremos las mutantes en el péptido *cle44*, realizando medidas de altura y diámetro del tallo principal, número de haces vasculares, producción de semillas, entre otras.

4- Obtener líneas transgénicas que sobreexpresen el péptido *CLE44* y evaluar su respuesta al estrés mecánico.

5- Obtener líneas transgénicas transformadas con una construcción que contenga la región promotora de *CLE44* fusionada al gen reportero *GUS*, para evaluar el patrón de expresión del péptido en condiciones normales y frente a estrés mecánico.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIALES

##### 3.1.1 Cepas bacterianas

En la Tabla 1 se detallan los genotipos de las cepas bacterianas de *Agrobacterium tumefaciens* y *Escherichia coli* empleadas para clonados y transformaciones estables de plantas.

**Tabla 1.** Cepas bacterianas

Microorganismo	Cepa	Genotipo relevante	Referencia
<i>A. tumefaciens</i>	LBA4404	Posee el plásmido Ti desarmado pAL4404, con resistencia a estreptomina, 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>E. coli</i>	DH5 $\alpha$	Posee una porción del gen lacZ (lacZ_M15) por lo cual presenta el sistema de selección de colonias blancas y azules. Permite obtener ADN plasmídico de buena calidad y alto rendimiento (endA1). Provee estabilidad al inserto presente en el plásmido con que se la transforme (recA1): endA1 hdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 (Na1r) RelA1 $\Delta$ lacU169 ( $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15).	Hanahan, 1983

##### 3.1.2 Especies vegetales

Se utilizaron plantas de *A. thaliana* del ecotipo Columbia-0 (*Col-0*) adquiridas originalmente en Lehle Seeds y reproducidas posteriormente en el IAL. Estas plantas se hicieron crecer en una cámara de cultivo que mantiene las condiciones óptimas para su germinación, crecimiento y desarrollo.

##### 3.1.3 Medios de cultivo

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

**Tabla 2.** Medios de cultivo

Medio de cultivo	Organismo cultivado	Composición	Referencia
<b>Lysogeny Broth (LB)</b>	<i>E. coli</i> y <i>A. 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
<b>Murashige y Skoog (MS)</b>	<i>A. thaliana</i>	KNO <sub>3</sub> 1,9 g/l; NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1,65 g/l; CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 0,44 g/l; MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,37 g/l; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,17 g/l; Na <sub>2</sub> EDTA 37,3 mg/l; FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 27,8 mg/l; MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O 22,3 mg/l; H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 6,2 mg/l; ZnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O 8,6 mg/l; KI 0,83 mg/l; Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O 0,25 mg/l; CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O 0,025 mg/l; CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O 0,025 mg/l; pH 5,8. Para medios sólidos, se añadieron 8 g/l de agar.	Murashige y Skoog, 1962

### 3.1.4 Vectores

**pBluescript SK(-)** es un fagémido disponible comercialmente, derivado del plásmido pUC19. Incluye una secuencia de sitios de múltiple clonado (SMC), una secuencia de resistencia a ampicilina y un origen de replicación de *E. coli* y fl. La secuencia del SMC está ubicada dentro de un gen controlado por *LacZ*, diseñado para proporcionar una coloración azul cuando se expresa en bacterias.

**pBI101.3** es un derivado del vector binario pBIN19. Este plásmido contiene el gen que codifica la enzima β-glucuronidasa (GUS) de *E. coli* con la señal de poliadenilación de la nopalina sintetasa (NOS). Dentro de la región de movilización de ADN, necesaria para la transformación de plantas, contiene además el gen NPTII (*NEOMICIN PHOSPHOTRANSFERASE II*) que confiere resistencia a kanamicina y un origen de replicación bacteriano RK2.

**pBI121** es derivado del vector pBI101 que contiene un fragmento de 800 pb del promotor *35SCaMV* dirigiendo la expresión del gen reportero *GUS* (Jefferson y col., 1987). Este vector confiere resistencia a kanamicina tanto en bacterias como en plantas.

### 3.1.5 Plantas mutantes y transgénicas de *A. thaliana*

Las plantas mutantes *bes1* (AT1G19350, SALK\_091133C), *bzr1* (AT1G75080, SAIL\_890\_F05 / CS877757) y *cle44* (AT4G13195, SALK\_048861) fueron obtenidas de ABRC (*Arabidopsis Biological Resource Center*).

Las plantas transformadas con los promotores de *AtHB21*, *AtHB40* y *AtHB53* dirigiendo la expresión del reportero *GUS* y las líneas mutantes *athb21*, *athb40*, *athb53*, *athb21/40*, *athb40/53*, *athb40/21/53*, *max4* y *brc1* fueron previamente descritas (González-Grandío y col., 2017; Mora y col., 2022).

### 3.1.6 Oligonucleótidos

En la Tabla 3 se muestra el nombre, la secuencia y uso dado a los oligonucleótidos utilizados.

**Tabla 3.** Oligonucleótidos utilizados

Nombre	ID del locus	Secuencia 5' → 3'	Uso
prCLE44-F	AT4G13195	CCCAAGCTTAACAATCATGCACTCTATACTATTCC	Clonado
prCLE44-R	AT4G13195	CCCGGATCCGCAATTATAAAAGAAGAAAAAACACCCC	Clonado
cCLE44-F	AT4G13195	CCGGATCCCTTTATAATTGCATGGCAACTAC	Clonado
cCLE44-R	AT4G13195	CCGAGCTCCCTAGTTGGAGATAGGGTTTGG	Clonado
BES1-F	AT1G19350	GCTGGTTGGGTTGTTGAAGAAG	RT-qPCR
BES1-R	AT1G19350	GGGAAGAGTAAGGAGTTGCTCG	RT-qPCR
BZR1-F	AT1G75080	TGGTGAGATAGCTGGGACTT	RT-qPCR
BZR1-R	AT1G75080	GGTAAGATGGGATGGGACTTTG	RT-qPCR
MAX4-F	AT4G32810	TGTGGAGTAGCCGTCGAAGAG	RT-qPCR
MAX4-R	AT4G32810	GAAAGATACCCACTTGGCTGAATG	RT-qPCR
BRC1-F	AT3G18550	GATTAACCACCATCGCAGCC	RT-qPCR
BRC1-R	AT3G18550	TTTCGCGCCGAAGGAGTAAT	RT-qPCR
CLE44-F	AT4G13195	TGGATATTGAGCCCTGCTTGA	RT-qPCR
CLE44-R	AT4G13195	AGGAACCTCTTGAAGGAGCC	RT-qPCR
PXY-F	AT5G61480	TCAAACCGACGAATCCATGTC	RT-qPCR
PXY-R	AT5G61480	CACGACCTACCCATGCTTTTG	RT-qPCR
WOX4-F	AT1G46480	CGATCAAACCGGTCCGACAA	RT-qPCR
WOX4-R	AT1G46480	TTCTTGAGTCGGGTTCCACC	RT-qPCR
WOX14-F	AT1G20700	ACTAGGCATCGGTGGACTCC	RT-qPCR
WOX14-R	AT1G20700	AGGCTGCTTTCGTTTGGACC	RT-qPCR

VND6-F	AT5G62380	CGCTTGACAAGTTTGTGCTTCTCAGC	RT-qPCR
VND6-R	AT5G62380	GGAAGAAGCATTTCATCGAAACCATTG	RT-qPCR
VND7-F	AT1G71930	CACCATGCATCAATATGGCAACATTGAG	RT-qPCR
VND7-R	AT1G71930	TAGTGTCTCCAATCCACACAGTT	RT-qPCR
IRX3-F	AT5G17420	TGACATGAATGGTGACGTAGC	RT-qPCR
IRX3-R	AT5G17420	CATCAAATGCTCCTTATCACCTT	RT-qPCR
XCP-F	AT4G35350	TCCACAAAGAAGATGATTACCCTTA	RT-qPCR
XCP-R	AT4G35350	TCACACGTTCCACATCCTCTT	RT-qPCR
SEOR-F	AT3G01670	AAGACACCAACGCCTCCA	RT-qPCR
SEOR-R	AT3G01670	CGATAGCATAGGAGACACTATCAAGA	RT-qPCR
APL-F	AT1G79430	TGGATATTCAGCGCAACGTA	RT-qPCR
APL-R	AT1G79430	TGCACTTCCATTTGCATCTC	RT-qPCR
Actinas-F	Normalizador	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	RT-qPCR
Actinas-R	Normalizador	AACGACCTAATCTTCATGCTGC	RT-qPCR

### 3.1.7 Construcciones genéticas 35S:CLE44 y PrCLE44:GUS

**35S:CLE44:** el ADNc de *CLE44* (339 pb) fue amplificado por PCR utilizando como molde ADN genómico extraído de hojas de *A. thaliana* (ecotipo *Col-0*) de 21 días de edad. El amplicón obtenido se clonó en los sitios de restricción *BamHI/SacI* del vector pBluescript SK<sup>-</sup>, empleando células de *E. coli* cepa DH5 $\alpha$ . Las colonias positivas se identificaron mediante digestión de minipreparaciones de plásmido con las enzimas *EcoRI/SacI* y *HindIII/SacI*. Posteriormente, el ADN plasmídico fue digerido con *BamHI/SacI*, y el fragmento correspondiente se insertó directamente en el vector pBI121, previamente tratado con las mismas enzimas, reemplazando así el gen reportero *GUS*. La clonación correcta se verificó por digestión con *EcoRI* (un sitio en el vector y un segundo en el inserto) y con *HindIII/SacI*. Los oligonucleótidos utilizados se describen en la Tabla 3.

**PrCLE44:GUS:** un fragmento de 1556 pb correspondiente a la región promotora de *CLE44* (localizada corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción) fue amplificado por PCR utilizando ADN genómico de *A. thaliana* como molde y los oligonucleótidos específicos (Tabla 3). El producto amplificado se clonó en los sitios *BamHI* y *HindIII* del vector pBluescript SK<sup>-</sup>, empleando células de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Posteriormente, el fragmento se liberó mediante digestión con las mismas enzimas y se insertó en el vector pBI101.3. Las colonias positivas se identificaron por digestión de minipreparaciones con *BamHI/SacI* y *HindIII/BamHI*, seguida de verificación por PCR. La secuencia de ambos clones fue confirmada en el vector pBluescript SK<sup>-</sup> (Macrogen, Corea), y los constructos verificados en los vectores pBI121 y pBI101.3 fueron utilizados para transformar células de *A. tumefaciens* cepa LBA4404.

## **3.2 MÉTODOS**

### **3.2.1 Reacciones de digestión con endonucleasas de restricción y ligación de ADN**

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.

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 Transformación de bacterias por electroporación**

Los vectores conteniendo las construcciones *35S:CLE44* y *PrCLE44:GUS* fueron empleados para la transformación de *E. coli* y *A. tumefaciens* previa a la transformación de plantas.

La preparación de las células competentes y las condiciones de electroporación empleadas fueron las recomendadas en el manual del fabricante del equipo (Gene Pulser™, 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 el medio LB suplementado con los antibióticos adecuados y agar (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*).

### **3.2.3 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 min 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 30 µl de agua destilada estéril.

- 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.

#### **3.2.4 Electroforesis de ADN**

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 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 Biológicos®).

- 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).

#### **3.2.5 Purificación de fragmentos de ADN 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 bisturí 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 H<sub>2</sub>O 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.

### **3.2.6 Condiciones de cultivo en cámara**

El cultivo de plantas de *A. thaliana* (ecotipo Col-0 y líneas mutantes correspondientes) 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). La intensidad lumínica se mantuvo en aproximadamente 120 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Las semillas se sembraron en macetas de 8 × 7 cm, colocando una planta por maceta en sustrato Klassman TS1 (Klasmann-Deilmann GmbH, Alemania), se regaron con fertilizante Hakaphos en una concentración de 3,5 ml/l y se cubrieron con papel de nylon transparente. Luego de una semana, cuando se observó la aparición del primer par de hojas, se retiró el papel de nylon.

### **3.2.7 Transformación estable de plantas de Arabidopsis y selección de transformantes**

Para la transformación se utilizaron plantas de aproximadamente 4 semanas, cultivadas como se describe en la sección 3.2.1. Cuando los pedúnculos florales estaban emergiendo, se cortaron las inflorescencias sin dañar las hojas caulinares. Luego de dos a tres días después del corte, surgieron nuevas inflorescencias de las yemas laterales que volvieron a cortarse. Esta operación se repitió 2 o 3 veces, hasta que en todas las inflorescencias existieran al menos 4 flores no abiertas. La transformación se realizó 2 días después del último corte siguiendo el método de inmersión floral (*Floral Dip*), descrito por Clough y Bent (1998).

Para preparar la suspensión de transformación, se cultivaron células de *A. tumefaciens* transformadas con las construcciones de interés (*35S:CLE44* o *PrCLE44:GUS*), en 10 ml de medio LB suplementado con rifampicina 50 µg/ml, estreptomina 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 % (p/v) 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. Las plantas se regaron y 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 su selección.

Para seleccionar las transformantes las semillas obtenidas se esterilizaron y 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 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.

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 se sembraron y seleccionaron las semillas hasta lograr la identificación de líneas homocigotas por presentar el 100 % de sus individuos resistentes en la selección.

### **3.2.8 Extracción de ADN genómico de plantas y amplificación por PCR**

Para analizar mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) la población de plantas de *Arabidopsis* 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. Después de agregar 700 µl de solución amortiguadora de extracción (Tris-HCl 200 mM (pH 8,0), NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0,5 % (p/v)), se agitó vigorosamente 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 % (v/v) y se secó a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió en 100 µl de agua destilada estéril.

Para realizar las PCRs se utilizó la solución de reacción provista por el fabricante de la enzima, a la cual se le agregaron los siguientes reactivos: MgCl<sub>2</sub> 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), ajustando las condiciones del programa según lo requerido. Se estableció la temperatura de hibridación (*T<sub>a</sub>*, temperatura de *annealing* o

anillado) de acuerdo a la composición de bases de los oligonucleótidos utilizados, aplicando la siguiente relación para su cálculo:  $Ta = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C) - 5 \text{ }^\circ\text{C}$

### **3.2.9 Análisis histoquímico de la actividad $\beta$ -glucuronidasa**

Los ensayos de actividad de GUS *in situ* fueron realizados siguiendo la metodología descrita por Jefferson y col. (1987). Las plantas enteras o secciones de tallo fueron sumergidas en solución que contiene 1 mM de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucurónico (X-Gluc) preparada en 100 mM de fosfato de sodio (pH 7,0), conteniendo 2 mM de ferricianuro de potasio, 2 mM de ferrocianuro de potasio y 0,1 % (v/v) de Triton X-100. Las muestras se sometieron a tres ciclos de vacío de 5 minutos cada uno para favorecer la infiltración del sustrato, y luego se incubaron a 37 °C durante toda la noche.

Posteriormente, las muestras se colocaron en etanol 70 % (v/v) hasta su total decoloración. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio de fluorescencia Leica DFC 7000T o con un microscopio óptico Nikon Eclipse E200.

### **3.2.10 Cortes, tinciones histológicas y cuantificación de haces vasculares**

El primer entrenudo de las plantas fue recolectado y decolorado en etanol al 80 % (v/v). Para la detección diferencial de xilema y floema, se empleó la tinción con safranina y azul de Astra. Los cortes de secciones de tallo se realizaron a mano alzada, utilizando una hoja de afeitar, y se lavaron dos veces con agua destilada. Luego, las muestras fueron inmersas en una mezcla de lavandina y agua (50:50) durante 15 minutos, con el fin de aclarar los tejidos. Posteriormente, las secciones se lavaron cinco veces con agua destilada, se tiñeron con azul de Astra y rojo safranina, se lavaron con agua destilada dos veces y se montaron en glicerol al 50 % (v/v).

Las secciones de tallo provenientes de al menos cuatro réplicas biológicas independientes fueron fotografiadas y se cuantificó el número de haces vasculares por sección.

### **3.2.11 Tratamiento con peso**

El tratamiento con peso se realizó colocando un clip de 1,6 g en el extremo superior de los tallos de inflorescencia de *A. thaliana* con una altura de 4,5–5 cm, tanto en plantas silvestres (WT) como en las líneas mutantes *bes1*, *bzr1*, *brc1*, *max4* y *cle44*. El tallo se posicionó cuidadosamente dentro del orificio del clip de manera que el peso ejerciera su efecto sin dañar el tejido, siguiendo el procedimiento descrito por Cabello y Chan (2019).

El peso se aplicó durante los períodos indicados en cada figura; las observaciones se realizaron inmediatamente después de retirar el clip o bien en los tiempos posteriores especificados. Las plantas no

tratadas, de la misma edad y altura, se utilizaron como control. Cada experimento incluyó entre 4 y 8 plantas por tratamiento y genotipo, y se repitió al menos tres veces con resultados consistentes.

### **3.2.12 Tratamientos con hormonas e inhibidores**

Se realizaron tratamientos con brasinazol (inhibidor de la vía de BRs), brasinolida (hormona sintética) y GR-24 (compuesto sintético que funciona como análogo a las SLs). Los tratamientos se aplicaron en plantas de *Arabidopsis* WT o mutantes con tallos de 4–5 cm de altura fueron tratadas durante 24 o 48 h (según lo indicado en las figuras correspondientes) mediante aplicación tópica en el tallo con las siguientes soluciones: brasinazol (BRZ, 10  $\mu$ M), brasinolida (BL, 10  $\mu$ M) o GR-24 (50  $\mu$ M). Las plantas sin tratamiento se utilizaron como control.

### **3.2.13 Evaluación de características fenotípicas ligadas al tratamiento mecánico**

Los parámetros de diámetro de tallo se midieron manualmente utilizando calibre en secciones de tallo del primer entrenudo de plantas de 25 días con una altura de 4–5 cm.

Para la determinación del rendimiento en semillas, las plantas se sembraron de a una por maceta y se cosecharon al finalizar el ciclo de vida. El rendimiento se expresó como gramos de semilla por planta (g/planta).

### **3.2.14 Extracción y cuantificación de ARN total a partir de tejido vegetal**

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  $\mu$ g de tejido vegetal (tallos u hojas de roseta) con nitrógeno líquido en un mortero 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O milliQ estéril.

La calidad y cantidad del ARN obtenido fue evaluada con el equipo Nanodrop NanoPhotometer™ (IMPLEN) midiendo la absorbancia a 260 nm (A<sub>260</sub>; Sambrook y Russell, 2000). La contaminación con proteínas fue evaluada mediante el cociente A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>, y la de carbohidratos y compuestos fenólicos mediante el cociente A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub>. El valor para dichas relaciones cuando las muestras presentan una calidad aceptable debe estar comprendido entre 1,8 y 2.

### 3.2.15 Análisis de expresión por RT-qPCR

Un microgramo (1  $\mu\text{g}$ ) del ARN total obtenido se utilizó para la transcripción reversa, empleando oligo-dT (consiste en 1 nucleótido variable, ubicado en el extremo 5', seguido de 24 nucleótidos de timina) y la transcriptasa reversa M-MLV II (Promega, Fitchburg, WI, EE. UU.).

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  $\mu\text{l}$  que contenían: 5  $\mu\text{l}$  de *Taq*™ Universal SYBR® Green Supermix; 0,2  $\mu\text{l}$  de cada oligonucleótido específico (10 pmol/ $\mu\text{l}$ ) y 1  $\mu\text{l}$  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 3. 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., 2002) y son utilizados de acuerdo con el 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).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 BRASINOESTEROIDES Y ESTRIGOLACTONAS MODULAN LA RESPUESTA AL ESTRÉS MECÁNICO

#### 4.1.1 El incremento del diámetro del tallo y número de haces vasculares en respuesta al estrés mecánico en *Arabidopsis* es dependiente de la acción de brasinoesteroides

Como ya se mencionó, Cabello y Chan (2019) describieron el rol esencial de las auxinas para la respuesta anatómica del tallo al estímulo mecánico, demostrando que mutantes en los transportadores de la familia AUX/LAX no generan los cambios anatómicos que se observan en las plantas WT sometidas al tratamiento.

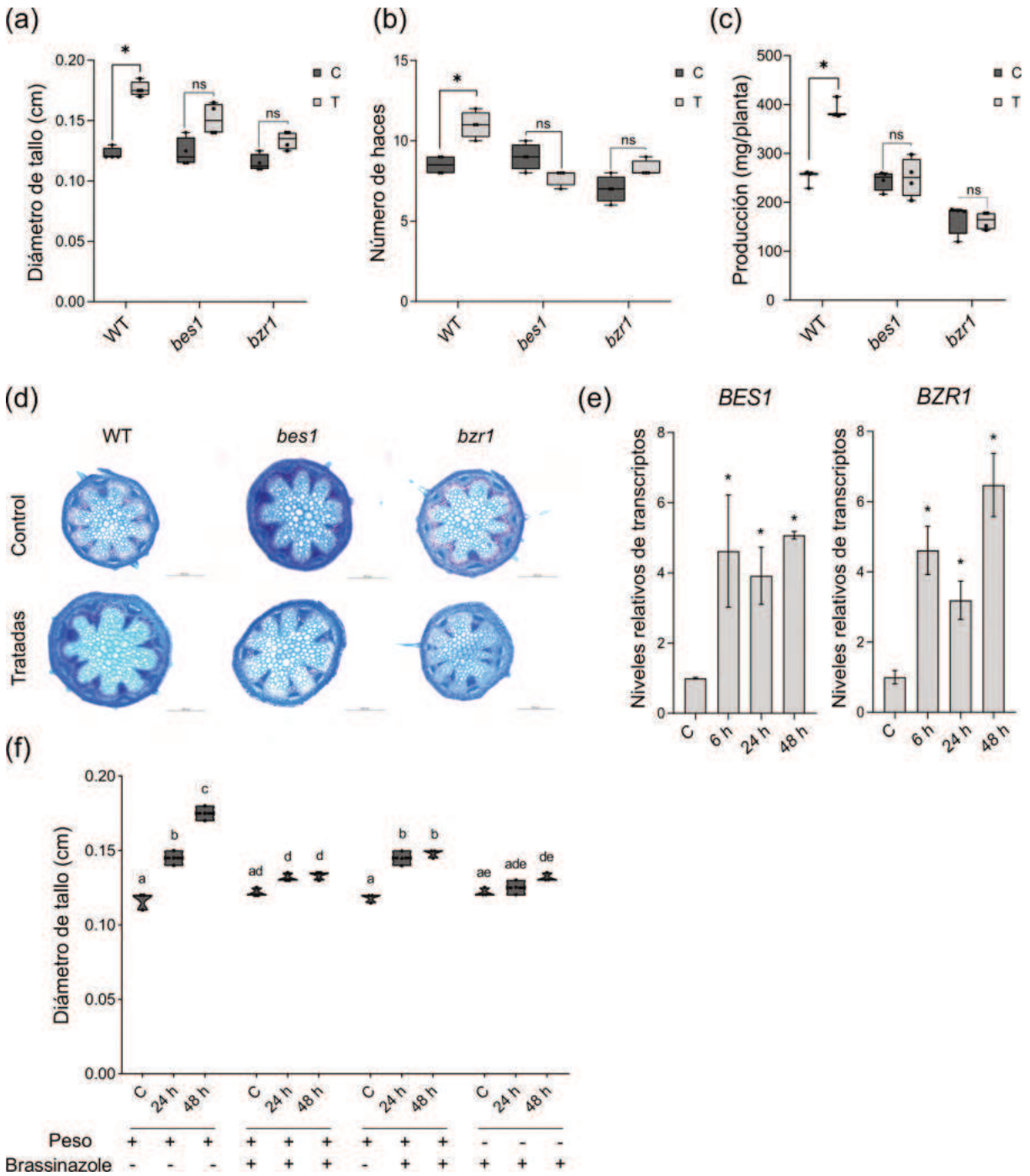
Hemos descrito en la introducción como otra hormona vegetal, los BRs, actúan a nivel vascular como reguladores de la proliferación y diferenciación de células cambiales durante el desarrollo secundario, sobre todo a través de BES1, uno de los factores de transcripción clave de la vía de BRs, junto a BZR1 (Caño-Delgado y col., 2004; Kondo y col., 2014, Saito y col., 2018). Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que esta hormona también podría estar implicada en la respuesta al estrés mecánico.

Para comprobarlo, las plantas mutantes *bes1* y *bzr1* fueron sometidas al tratamiento con peso descrito en la sección 3.2.11, en paralelo a plantas WT que funcionaron como controles. Mientras que las plantas salvajes mostraron el ya informado aumento del diámetro del tallo luego del tratamiento, las líneas mutantes no mostraron incrementos estadísticamente significativos ( $P < 0,05$ ; Figura 11a). Esta falta de respuesta se mantuvo en el patrón vascular. Mientras las líneas WT pasaron de 8 a 12 haces vasculares, las mutantes *bes1* y *bzr1* no modificaron la cantidad (Figura 11b), lo que sugiere que la señalización mediada por BRs juega un papel crucial en la respuesta a este tratamiento mecánico.

En lo informado por Cabello y Chan (2019), las mutantes *lax2* que no mostraban aumento del diámetro del tallo ni cambios en el número de haces en respuesta al peso, tampoco lograban generar el incremento en la producción de semillas observado en las plantas WT, demostrando que la ocurrencia de ambos cambios fenotípicos en paralelo es una condición necesaria para el aumento en de la cantidad de semillas generadas.

En este caso, la cuantificación de la producción final de semillas en las mutantes *bes1* y *bzr1* tampoco mostró cambios en las plantas que habían pasado por el tratamiento (Figura 11c), mientras que las WT sí lo hicieron.

El análisis visual de secciones transversales del tallo mostró una mayor cantidad de haces vasculares en el primer entrenudo de plantas WT una vez finalizado el tratamiento mecánico, en comparación con los controles sin tratar, mientras que no se observaron cambios en la cantidad de haces vasculares en el primer entrenudo de las plantas mutantes *bes1* y *bzr1* tratadas con peso respecto de su control (Figura 11d).



**Figura 11. Los brasinoesteroides son necesarios para generar el aumento del diámetro del tallo y del número de haces vasculares tras el tratamiento con peso en Arabidopsis**

(a) Diámetro del primer entrenudo, (b) número de haces vasculares en el primer entrenudo y (c) rendimiento de semillas de plantas WT, *bes1* y *bZR1* sometidas o no a estrés mecánico, medido en mg por planta. (d) Sección transversal del primer entrenudo de los genotipos estudiados luego de 48 h del tratamiento con peso. Barras = 500  $\mu$ m. (e) Cuantificación de los niveles de transcritos de *BES1* y *BZR1* en el primer entrenudo. Todos los valores se normalizaron con los obtenidos en plantas WT sin tratar, denominadas control (C). Las barras representan el error estándar de la

media (SEM). Las diferencias significativas se indicaron con asteriscos (\* $P < 0,05$ ; prueba *t* de *Student*). (f) Diámetro del primer entrenudo en plantas WT tratadas con peso y sin tratar (C) durante 24 h o 48 h, con aplicación o no de brasinazole 10  $\mu$ M. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre las medias ( $P < 0,05$ , ANOVA de dos vías con prueba *post hoc* de *Tukey-Kramer*) y los asteriscos (\*) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ; prueba *t* de *Student*). C: control; T: 48 h de estrés mecánico; ns: no significativo.

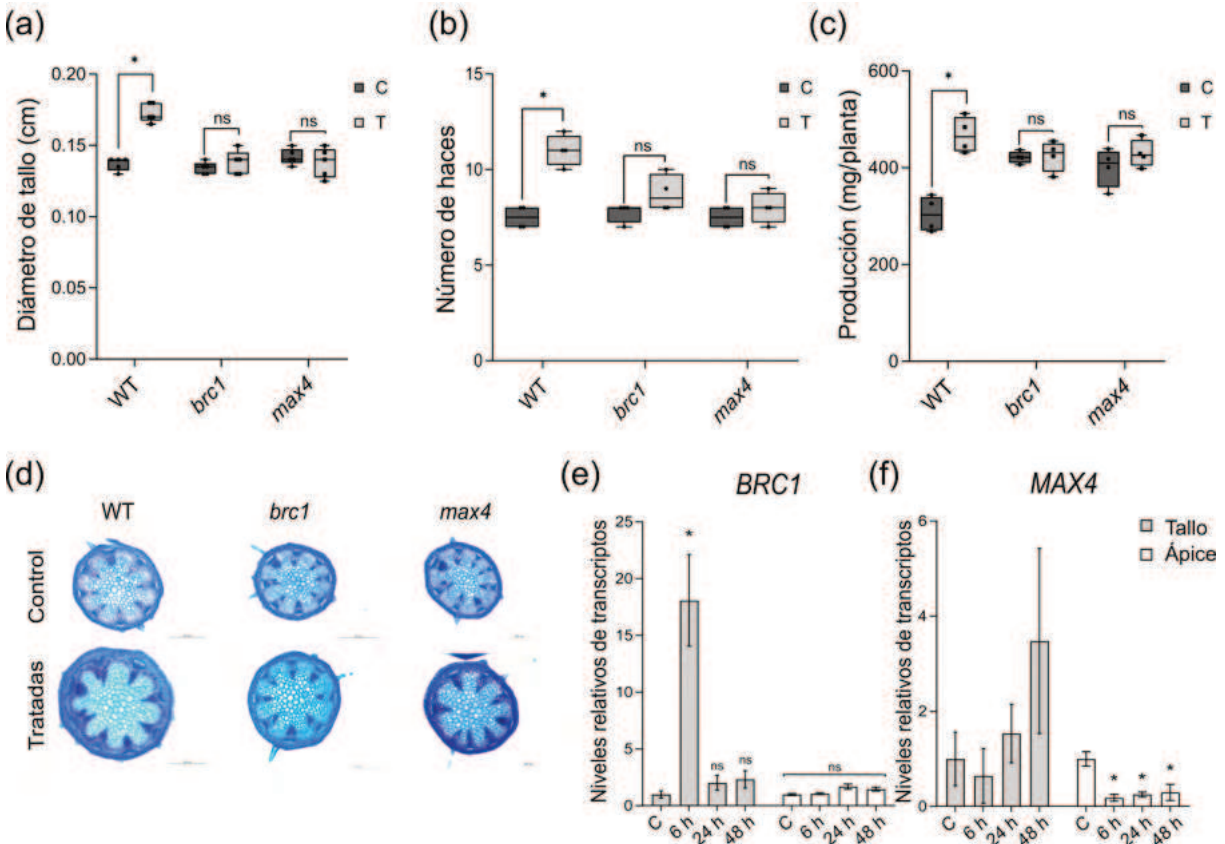
Además, se utilizó la técnica de RT-qPCR para cuantificar los niveles de expresión de *BESI* y *BZR1* en el primer entrenudo luego de 6, 24 y 48 h de tratamiento con peso. La expresión de ambos factores de transcripción aumentó a las 6 h y se mantuvo elevada en niveles similares durante las 48 h que dura el tratamiento realizado (Figura 11e).

Finalmente, para analizar en detalle el papel de los BRs en la respuesta al tratamiento mecánico, se investigó si la biosíntesis de BRs era necesaria en el proceso de respuesta. Para esto, se rociaron plantas de *Arabidopsis* WT con brasinazole (BRZ), un inhibidor específico de la biosíntesis de BRs, y simultáneamente se trataron con peso. El BRZ aplicado al inicio del estrés mecánico inhibió completamente el aumento del diámetro del tallo. Además, este engrosamiento cesó cuando se aplicó el reactivo 24 h después de iniciado el tratamiento (Figura 11f). Estos resultados indicaron que tanto la señalización como la síntesis de BRs son cruciales durante todo el período de aplicación de estrés mecánico para que se produzca una respuesta.

#### **4.1.2 La síntesis y señalización de estrigolactonas son necesarias para el aumento de la cantidad de haces vasculares por tratamiento mecánico**

Al igual que las auxinas y los BRs, las SLs desempeñan un papel bien establecido en la regulación del desarrollo vascular secundario (Li y col., 2014). Para evaluar la participación de esta hormona en la respuesta al tratamiento con peso, utilizamos plantas mutantes deficientes en su síntesis (*max4*) y en la respuesta (*brc1*). Luego de 48 h de estrés mecánico, ni las mutantes *max4* ni las *brc1* mostraron crecimiento radial del tallo ni aumento en el número de haces vasculares (Figuras 12a-d), lo que indica que ambos genes son necesarios para inducir la respuesta al tratamiento con peso. Asimismo, el tratamiento no produjo mejoras en la producción de semillas en estas líneas mutantes (Figura 12c).

Para examinar los patrones de expresión de estos genes en respuesta al peso, las plantas WT fueron sometidas al tratamiento durante 6, 24 y 48 h y se extrajo ARN del primer entrenudo y del ápice del tallo. La expresión de *BRC1* aumentó después de 6 h en el primer entrenudo del tallo (Figura 12e), mientras que la de *MAX4* disminuyó al mismo tiempo en el ápice y no mostró cambios en su expresión en el primer entrenudo (Figura 12f). Estos resultados apoyan la participación de *BRC1* y *MAX4* en la respuesta al estrés mecánico en tejidos específicos.



**Figura 12. Las estrigolactonas son necesarias para lograr el engrosamiento del tallo y aumento de haces vasculares**

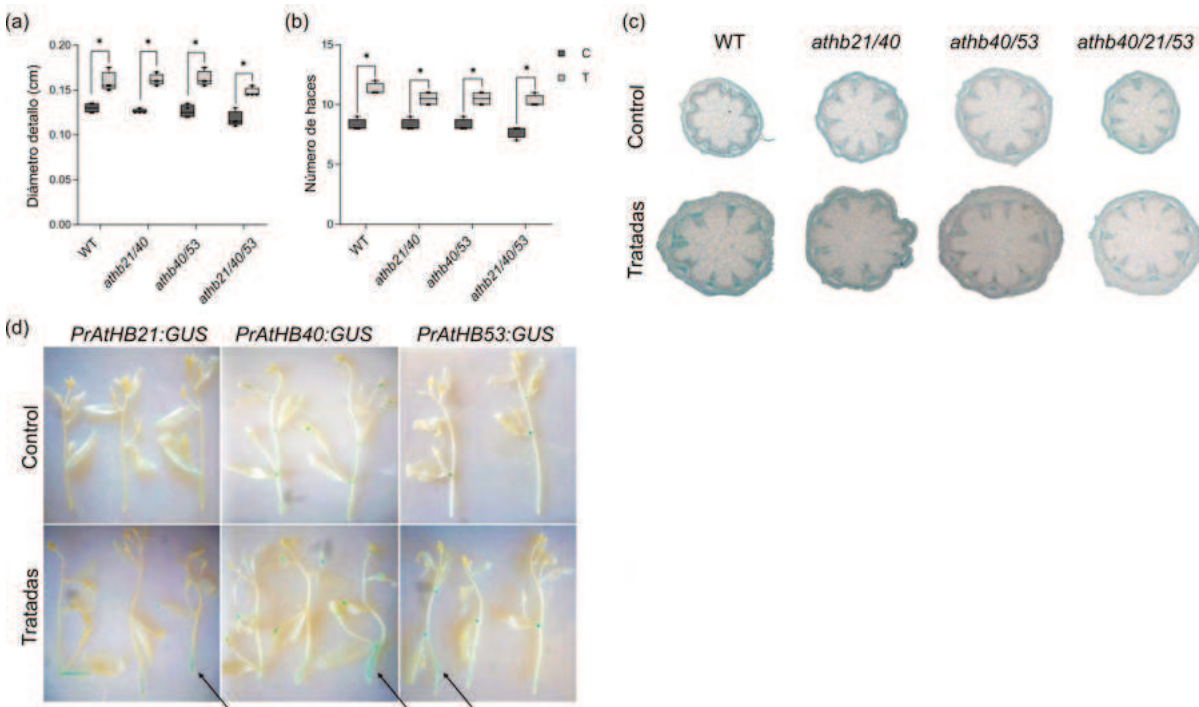
(a) Diámetro del primer entrenudo, (b) número de haces vasculares en el tallo y (c) producción de semillas de plantas WT, *brc1* y *max4*. (d) Secciones transversales del primer entrenudo de plantas mutantes *brc1*, *max4* y WT como control luego de 48 h del tratamiento con peso. Barras = 500  $\mu$ m. (e) Niveles de transcritos de *BRC1* y (f) *MAX4* en el ápice y el tallo luego de 6, 24 y 48 h del tratamiento con peso. Todos los valores se normalizaron con los obtenidos en plantas WT sin tratar, denominadas control (C). Las barras representan el error estándar de la media (SEM). Las diferencias significativas se indicaron con asteriscos (\* $P < 0,05$ ; prueba *t* de Student) y ns: no significativo.

#### 4.2 CLE44 MEDIA EL DESARROLLO VASCULAR Y EL CRECIMIENTO RADIAL DEL TALLO EN RESPUESTA AL ESTRÉS MECÁNICO Y ES CRUCIAL PARA LOGRAR EL AUMENTO DE LA PRODUCCIÓN

Con el objetivo de profundizar en el papel de BRC1 en el incremento del diámetro del tallo y del número de haces vasculares inducido por el peso en Arabidopsis, se analizó el fenotipo de los genes blanco-directos *AtHB21*, *AtHB40* y *AtHB53* (González-Grandío y col., 2017). Las plantas mutantes dobles (*athb21/athb40*, *athb40/athb53*) y triples (*athb21/athb40/athb53*) fueron sometidas al tratamiento con peso durante 48 h. En todas las líneas mutantes tanto el diámetro del tallo (Figura 13a) como el número de haces (Figura 13b)

aumentaron luego del tratamiento de manera similar a las plantas WT, lo que sugiere que estos genes que codifican proteínas HD-Zip de tipo I no son esenciales para mediar la respuesta morfológica inducida por el tratamiento con peso.

Además, se analizaron líneas transgénicas *PrAtHB21:GUS*, *PrAtHB40:GUS* y *PrAtHB53:GUS*, en las que los promotores de cada uno de estos genes se encuentran dirigiendo la expresión del gen reportero *GUS*. En todos los casos, la actividad del reportero aumentó en el primer entrenudo luego del estrés mecánico (Figura 13d). Esto indica que, aunque los genes no son críticos para la expansión radial del tallo ni para el incremento en el número de haces, su expresión sí responde al estímulo mecánico.



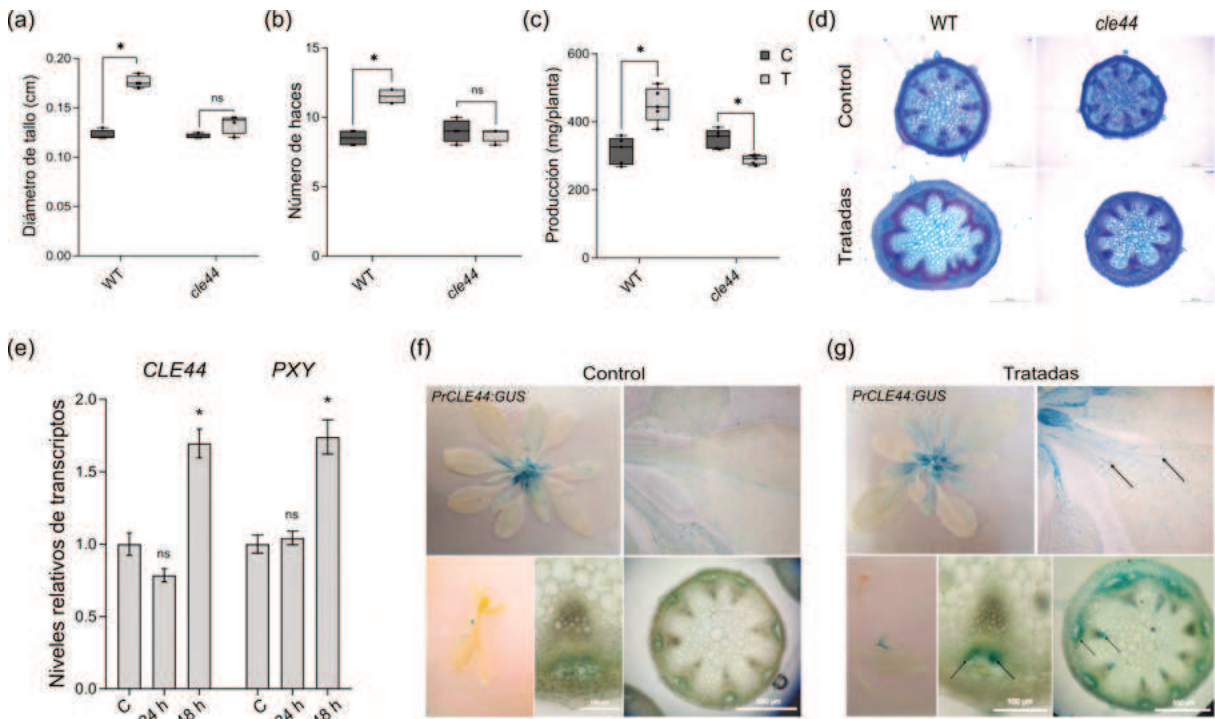
**Figura 13. Los factores de transcripción AtHB21, AtHB40 y AtHB53 no son esenciales para la respuesta al estrés mecánico**

(a) Diámetro del primer entrenudo, (b) número de haces vasculares en el tallo y (c) secciones transversales del primer entrenudo de plantas mutantes dobles y triples (*athb21/40*, *athb40/53* y *athb21/40/53*) y WT como control luego de 48 h del tratamiento con peso. (d) Plantas portadoras de construcciones que contienen las regiones promotoras de los tres HD-Zip I fusionados al reportero *GUS* sometidas a tratamiento mecánico. Las flechas negras indican regiones donde se observa un aumento de la expresión. Las barras representan el error estándar de la media (SEM). Las diferencias significativas se indicaron con asteriscos (\* $P < 0,05$ ; prueba *t* de *Student*) y ns: no significativo.

Otro gen potencialmente regulado por *BRC1* es *CLE44*, cuya región genómica 5' fue identificada como sitio de unión directa mediante ensayos de ChIP-Seq (van Es y col., 2024). Para evaluar su participación en la

respuesta al tratamiento con peso, se analizaron mutantes *cle44* y plantas WT luego de 24 y 48 h de tratamiento. Las secciones transversales del tallo revelaron que el diámetro y el número de haces vasculares no variaron significativamente entre plantas tratadas y no tratadas de *cle44* (Figuras 14a-d), lo que sugiere que este péptido participa en la respuesta al estímulo mecánico.

La evaluación del rendimiento de semillas mostró además que las plantas *cle44* tratadas con peso produjeron incluso menos semillas por planta que los controles sin tratamiento (Figura 14c). Esto indica que, además de no responder morfológicamente al estrés mecánico, la mutación en *CLE44* afectó negativamente la productividad luego del tratamiento. Los análisis de expresión génica mediante RT-qPCR revelaron que *CLE44* aumenta su expresión luego de 48 h de aplicación de peso (Figura 14e). Dado que *CLE44* interactúa con *PXY*, se examinó también la expresión de este último gen, observándose un aumento similar al de *CLE44* después de 48 h de tratamiento (Figura 14e).

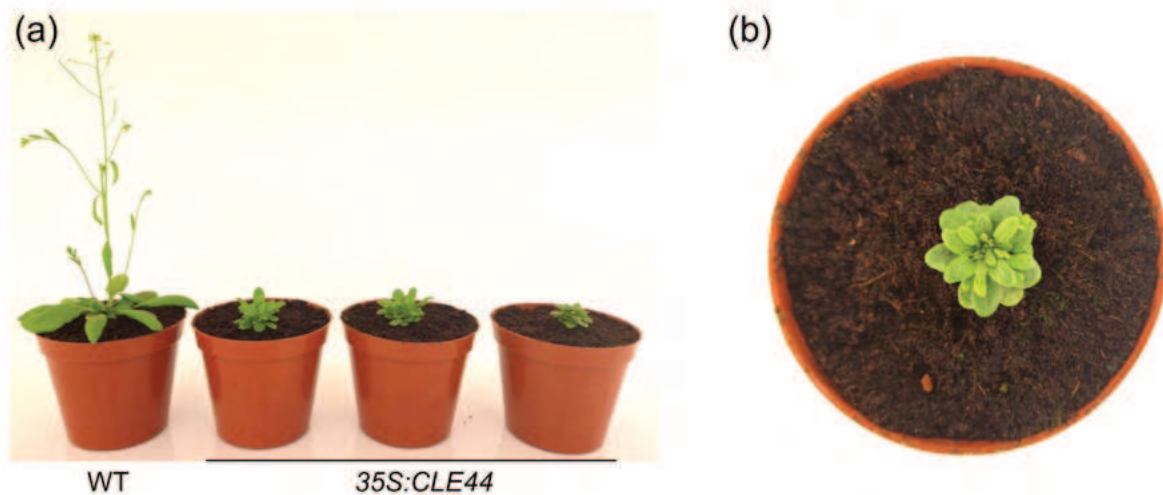


**Figura 14. CLE44, el péptido del floema involucrado en la división cambial, desempeña un papel crucial en el aumento de los haces vasculares tras el tratamiento con peso**

(a) Diámetro del primer entrenudo, (b) número de haces vasculares en el tallo y (c) producción de semillas de plantas mutantes *cle44* y WT como control. El rendimiento se midió como peso (mg) de semillas por planta. (d) Secciones transversales del primer entrenudo de plantas mutantes *cle44* y WT luego de 48 h de tratamiento con peso. Barras = 500  $\mu$ m. (e) Niveles relativos de transcritos de *CLE44* y *PXY* cuantificados mediante RT-qPCR en plantas tratadas con peso (24 y 48 h) y sin tratar. Los valores se normalizaron con los obtenidos en plantas WT en condiciones control. Las barras representan el error estándar de la media (SEM). Las diferencias significativas se indican con asteriscos (\* $P < 0,05$ ; prueba *t* de Student) y ns significa no significativo. (f) Tinción histoquímica en plantas *PrCLE44:GUS* en condiciones

control y (g) luego de 48 h de tratamiento de peso. Las flechas indican los tejidos donde se observó un aumento en la expresión del gen reportero *GUS*. Barras = 100 y 500  $\mu\text{m}$ .

Para caracterizar con mayor detalle la expresión espacial de *CLE44*, se generaron líneas transgénicas *PrCLE44:GUS*, en las que la región promotora de 1556 pb de *CLE44* dirige la expresión del gen reportero *GUS*. En condiciones control, la actividad de *GUS* se detectó en el sistema vascular de hojas y tallos (Figura 14f) y aumentó significativamente luego del tratamiento con peso, especialmente en los tejidos vasculares (Figura 14g). Finalmente, también se obtuvieron líneas sobreexpresantes mediante la clonación de la región codificante de *CLE44* (339 pb) en el vector pBI121. Sin embargo, estas plantas presentaron graves alteraciones en el desarrollo, lo que impidió realizar análisis fenotípicos adicionales (Figura 15).

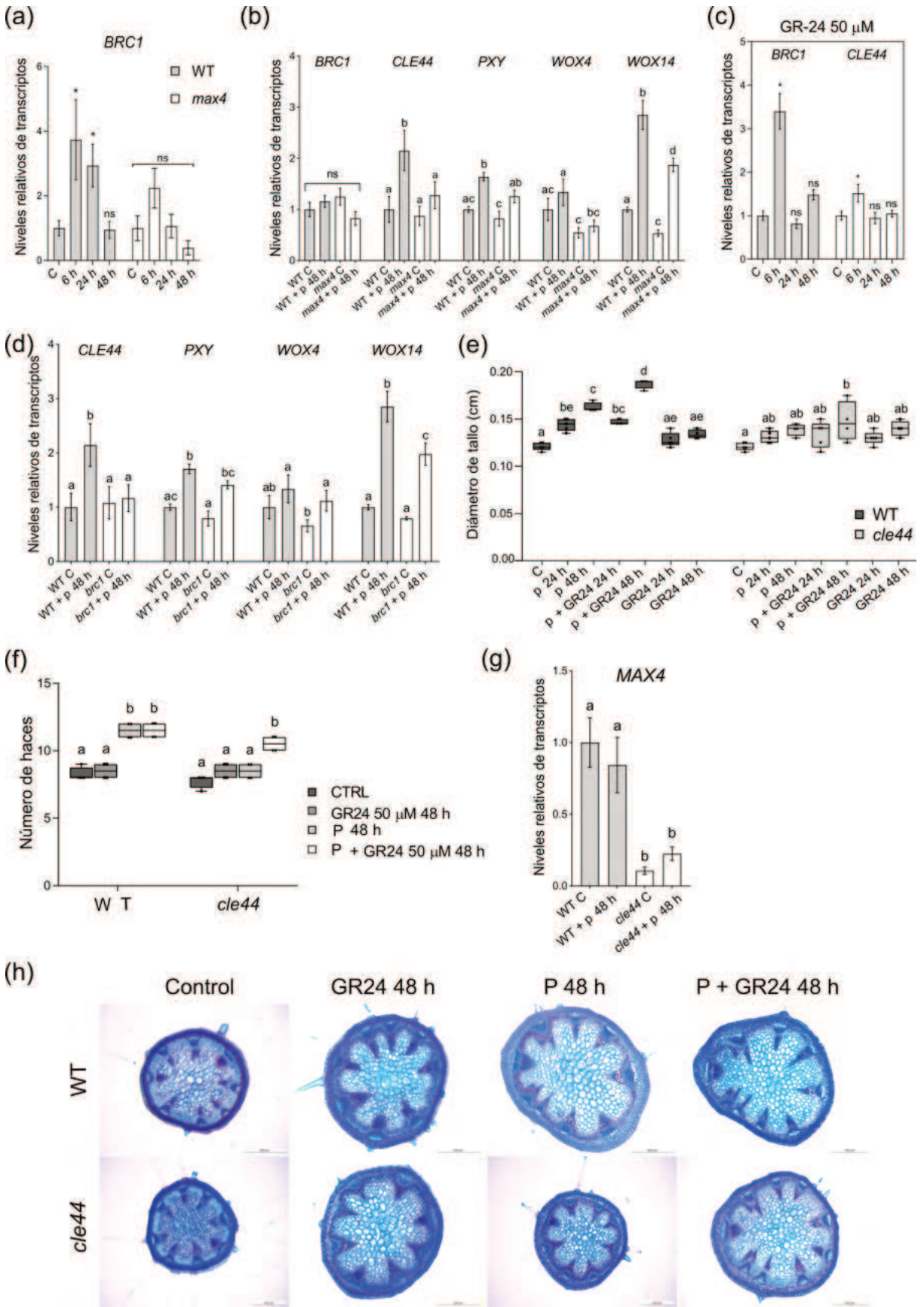


**Figura 15. Líneas sobreexpresantes de *CLE44* muestran penalidad en el desarrollo**

(a) Imagen ilustrativa de líneas *35S:CLE44* de 25 días de edad en comparación con plantas WT crecidas en condiciones normales. (b) Imagen ampliada de una planta sobreexpresante de *CLE44*.

### 4.3 LA INDUCCIÓN DE *BRC1* Y *CLE44* POR PESO DEPENDE DE LAS ESTRIGOLACTONAS

A continuación, se analizó si la inducción de *BRC1* y *CLE44* provocada por el tratamiento con peso dependía de la señalización mediada por SLs. Para ello, se evaluaron los niveles de transcritos de ambos genes en plantas mutantes *max4*, deficientes en la síntesis de SLs. En plantas WT, *BRC1* se indujo marcadamente luego de 6 y 24 h de tratamiento, mientras que en las mutantes *max4* no se observaron cambios significativos en la expresión (Figura 16a). De manera similar, los niveles de transcritos de *CLE44* aumentaron significativamente a las 48 h de tratamiento en las plantas WT, pero no en las mutantes *max4* (Figura 16b). Estos resultados indican que la biosíntesis de SLs es esencial para la inducción de *BRC1* y *CLE44* durante la respuesta al tratamiento con peso.



### Figura 16. El aumento en la expresión de *BRC1* y *CLE44* en respuesta al peso depende de las estrigolactonas

Cuantificación de los niveles de transcritos de (a) *BRC1* en plantas WT y plantas mutantes *max4* luego de 6, 24 y 48 h de tratamiento con peso, (b) *BRC1*, *CLE44*, *PXY*, *WOX4* y *WOX14* en las mismas líneas, (c) *BRC1* y *CLE44* en WT crecidas en condiciones normales y luego de 6, 24 y 48 h de la aplicación de 50  $\mu$ M de GR-24 y (d) *CLE44*, *PXY*, *WOX4* y *WOX14* en WT y mutantes *brc1* crecidas en condiciones normales y luego de 48 h de tratamiento con peso ("p"). Todos los valores se normalizaron con los obtenidos en plantas WT sin tratar crecidas en condiciones control. (e) Diámetro del primer entrenudo de plantas WT y *cle44* crecidas en condiciones normales, tratadas con peso por 24 y 48 h, tratadas con peso y 50  $\mu$ M de GR-24 simultáneamente durante 24 y 48 h, y tratadas solo con 50  $\mu$ M de GR-24 durante 24 y 48 h. (f) Número de haces vasculares en plantas WT y *cle44* en condiciones normales, tratadas con peso, tratadas con peso y 50  $\mu$ M de GR-24 y tratadas solo con 50  $\mu$ M de GR-24. (g) Niveles de transcritos de *MAX4* en plantas WT y plantas mutantes *cle44*, tratadas con peso o no durante 48 h. Las barras representan el SEM y letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias ( $P < 0,05$ , ANOVA de dos vías con prueba *post hoc* de *Tukey-Kramer*), los asteriscos (\*) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ; prueba *t* de *Student*) y ns indica no significativo. (h) Secciones transversales del primer entrenudo *cle44* y WT después de 48 h de tratamiento con 50  $\mu$ M de GR-24, después de 48 h de tratamiento con peso y después de 48 h de tratamiento con peso y aplicación simultánea de 50  $\mu$ M de GR-24. Barras = 500  $\mu$ m.

Consistentemente, las plantas WT tratadas con el análogo sintético de las SLs, GR-24, aplicado localmente sobre el primer entrenudo, mostraron un aumento de expresión de *BRC1* y *CLE44* después de 6 h de tratamiento (Figura 16c). La activación temprana de *BRC1*, en comparación con *CLE44*, sugiere una posible regulación directa de este último por parte de *BRC1*. Para confirmar esta relación, se analizó la expresión de *CLE44* en mutantes *brc1*, comprobándose que la ausencia de *BRC1* impidió la inducción de *CLE44* en respuesta al tratamiento con peso (Figura 16d).

Hasta el momento, *BRC1* y *CLE44* parecen ser los únicos genes claramente identificados en la vía de señalización mediada por SLs luego del estímulo mecánico. Sin embargo, se consideró la posibilidad de la existencia de una vía alternativa. Para explorar esta hipótesis, se evaluó si la aplicación exógena de SLs podía restaurar la respuesta al tratamiento con peso en plantas mutantes *cle44*. Tanto estas plantas como sus controles WT fueron sometidas a tratamiento con peso y/o con GR-24. En las plantas WT, el tratamiento combinado de peso y GR-24 produjo un efecto aditivo luego de 48 h, evidenciado por un mayor diámetro del tallo en comparación con el tratamiento con peso solo. Como era esperable, las mutantes *cle44* no mostraron aumento en el diámetro del tallo (Figuras 16e, h) ni en el número de haces (Figuras 16f, h) en respuesta al estrés mecánico.

Destacablemente, la aplicación combinada de GR-24 y peso durante 48 h rescató en las mutantes *cle44* la capacidad de incrementar tanto el diámetro del tallo (Figura 16e) como el número de haces (Figura 16f). Esto sugiere que GR-24 puede promover estos cambios en el desarrollo de manera independiente de *CLE44*. Además, se evaluaron los niveles de transcritos de *MAX4* en plantas WT y en las mutantes *cle44*, tanto en condiciones control como luego de 48 h de tratamiento con peso. En ambos casos, la expresión de *MAX4* fue

menor en las mutantes respecto a las WT (Figura 16g), lo que sugiere una síntesis reducida de SLs y apoya indirectamente la existencia de una vía alternativa de señalización mediada por SLs. Los detalles anatómicos asociados a estos cambios cuantitativos se observan en las secciones transversales de los primeros entrenudos de plantas WT y *cle44* bajo los distintos tratamientos (Figura 16h).

Finalmente, se analizó la expresión de otros genes de la vía de señalización PXY/CLE44, específicamente el receptor *PXY* y los genes blanco *WOX4* y *WOX14*, dependientes de *CLE44*. Tanto *PXY* como *WOX14* aumentaron su expresión en respuesta al tratamiento con peso en plantas WT, *max4* y *brc1*, en comparación con las condiciones control. Esto sugiere la activación de una vía alternativa, independiente de SL/BRC1, que regula la respuesta al tratamiento con peso. En cambio, *WOX4* no mostró cambios en su expresión, incluso en plantas WT (Figuras 16b, d).

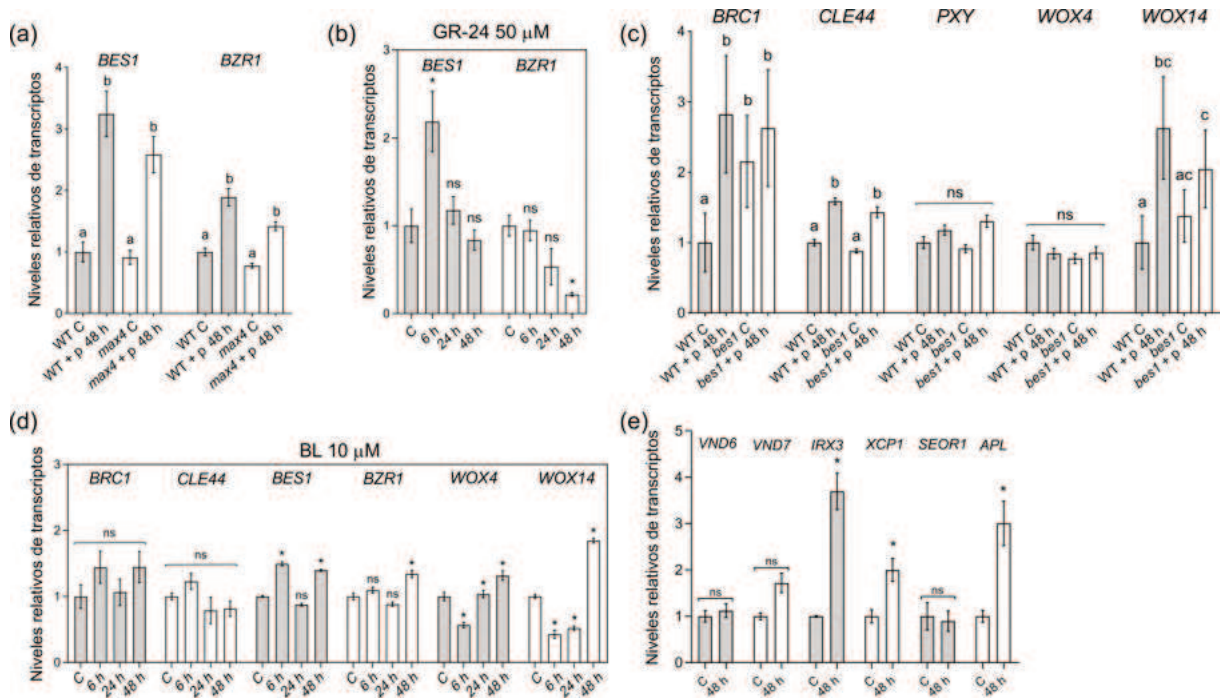
#### **4.4 INTERACCIÓN ENTRE LAS VÍAS DE ESTRIGOLACTONAS Y BRASINOESTEROIDES DURANTE LA RESPUESTA AL ESTRÉS MECÁNICO**

Como se ha mencionado anteriormente, el factor de transcripción *BES1* se presenta como un punto de convergencia en las vías de señalización de SLs y BRs. Consistentemente con esto, *BES1* también es conocido por inhibir la expresión de *BRC1* en las yemas axilares. Para profundizar en las posibles interacciones cruzadas entre SLs y BRs en el proceso de respuesta al estrés mecánico, se evaluó la expresión de *BES1* y *BZR1* en respuesta al tratamiento con peso en mutantes *max4* (deficientes en SLs). Ambos genes aumentaron su expresión luego de 48 h de tratamiento (Figura 17a). La cinética de respuesta de estos genes fue diferente al tratar las plantas con GR-24; aquí, la expresión de *BES1* aumentó tempranamente (a las 6 h de tratamiento con GR-24; Figura 17b). Por el contrario, la expresión de *BZR1* disminuyó luego de 48 h de tratamiento (Figura 17b).

Otro punto de posible conexión entre ambas hormonas es el péptido *CLE44*, cuya expresión se encuentra disminuida en mutantes *bes1* (Saito y col., 2018), lo que sugiere que *CLE44* es un objetivo común de las vías de señalización de SLs y BRs. Por lo tanto, se investigó si la inducción de *BRC1* y *CLE44* en plantas tratadas con peso también dependía de la señalización de BR, específicamente a través de *BES1*.

Se midieron los niveles de transcripto de *BRC1*, *CLE44*, *PXY*, *WOX4* y *WOX14* en plantas WT y mutantes *bes1* después de 48 h de tratamiento con peso. En las mutantes *bes1*, los niveles de *BRC1* fueron constitutivamente altos, lo que concuerda con la función de *BES1* como represor de *BRC1*. En contraste, la expresión de *CLE44* se indujo tanto en plantas WT como en *bes1* luego del tratamiento con peso. De manera similar, la respuesta de *PXY* y *WOX4* fue similar en ambos genotipos (WT y *bes1*). Sin embargo, *WOX14* se indujo en plantas WT, pero no en mutantes *bes1* (Figura 17c).

Para confirmar que los BRs regulan directamente a *BRC1* y *CLE44* en este contexto, las plantas WT fueron tratadas localmente con el análogo sintético de BRs, brasinolide (BL), en el primer entrenudo, y se cuantificaron los niveles de transcritos a las 6, 24 y 48 h. Los resultados mostraron que los niveles de transcritos de *BRC1* y *CLE44* se mantuvieron sin cambios luego del tratamiento con BL. En cambio, los niveles de *BES1*, *BZR1*, *WOX4* y *WOX14* sí aumentaron (Figura 17d). Estos hallazgos sugieren que, bajo estas condiciones, los BRs no regulan directamente la expresión de *CLE44*.



**Figura 17. Brasinoesteroides y estrigolactonas interactúan para modular la respuesta al peso**

Cuantificación de los niveles de transcritos de (a) *BES1* y *BZR1* en WT y plantas mutantes *max4* en condiciones normales y luego de 48 h de tratamiento con peso, (b) *BES1* y *BZR1* en plantas WT crecidas en condiciones normales y luego de 6, 24 y 48 h de la aplicación de 50  $\mu\text{M}$  de GR-24, (c) *BRC1*, *CLE44*, *PXY*, *WOX4* y *WOX14* en plantas WT y mutantes *bes1*, (d) *BRC1*, *CLE44*, *BES1*, *BZR1*, *WOX4* y *WOX14* en plantas WT crecidas en condiciones normales o tratadas con 10  $\mu\text{M}$  de brasinolide y (e) *VND6*, *VND7*, *IRX3*, *XCP1*, *SEOR1* y *APL1* en plantas WT. Todos los valores se normalizaron con los obtenidos en las plantas WT crecidas en condiciones control. Las barras representan el error estándar de la media (SEM). Las diferencias significativas se indican con asteriscos (\* $P < 0,05$ ; prueba *t* de Student) y ns significa no significativo. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias ( $P < 0,05$ ; ANOVA de dos vías con prueba *post hoc* de Tukey-Kramer).

Finalmente, se analizó el efecto del tratamiento con peso en la expresión de genes marcadores del desarrollo vascular. Se evaluaron genes marcadores del xilema y del floema en tallos de plantas tratadas con peso en comparación con sus controles sin tratar. Los niveles de expresión de los genes marcadores del xilema *IRX3*

(*IRREGULAR XYLEM 3*) y *XCPI* (*XYLEM CYSTEINE PEPTIDASE 1*), así como el marcador de floema *APL* (*ALTERED PHLOEM DEVELOPMENT*), aumentaron en las plantas tratadas con peso. En contraste, los genes *VND6*, *VND7* y el marcador de floema *SEORI* (*SIEVE-ELEMENT-OCCLUSION RELATED 1*) no mostraron cambios significativos en su expresión (Figura 17e). Estos resultados en conjunto indican que el estrés mecánico ejercido por el peso promueve activamente la diferenciación del xilema y el floema a partir de las células procambiales.

## 5. DISCUSIÓN

La aplicación del estímulo mecánico sobre plantas de *Arabidopsis* promovió un marcado engrosamiento del tallo acompañado por un aumento en el número de haces vasculares, en concordancia con lo previamente descrito por Cabello y Chan (2019), quienes además destacaron el rol esencial de los transportadores de auxinas. Respuestas similares a éstas también han sido informadas tanto en especies herbáceas como leñosas expuestas a condiciones de viento o roce, y se asocian con una redistribución del crecimiento y una reprogramación hormonal y transcripcional (Braam, 2005; Telewski, 2006). De manera similar, se ha descrito un efecto análogo en plantas de tomate, donde intervienen el etileno y las auxinas (Castro Estrada y col., 2025). Estos antecedentes, junto con nuestros resultados, demuestran que la respuesta morfológica al peso implica una reorganización activa del desarrollo del tejido vascular, mediada no solo por las auxinas, sino también por otras fitohormonas.

### 5.1 INTEGRACIÓN DE SEÑALES HORMONALES EN RESPUESTA AL ESTÍMULO MECÁNICO

Si bien las auxinas son esenciales para la formación y diferenciación de los tejidos vasculares, los BRs han sido identificados como moduladores clave del número de haces al promover divisiones procambiales tempranas (Ibañez y col., 2009). Además, los FTs de respuesta a esta fitohormona, como BES1, están directamente implicados en la regulación de la proliferación y diferenciación de células vasculares durante el desarrollo del crecimiento secundario (Caño-Delgado y col., 2004).

En esta Tesis se demostró que el aumento del diámetro del tallo y del número de haces vasculares inducido por el tratamiento con peso depende estrictamente de la señalización de BRs. En mutantes *bes1*, incapaces de activar adecuadamente esta vía hormonal, ambos fenómenos quedaron completamente abolidos, lo que confirma que los BRs, al igual que las auxinas, son componentes esenciales de la respuesta al estímulo mecánico. Este resultado indica que el rol de los BRs no se limita al control del crecimiento secundario en condiciones normales, sino que también es necesario para dar lugar a la respuesta adaptativa asociada al estrés mecánico. Adicionalmente, el uso de brasinazole, un inhibidor de la biosíntesis de BRs, mostró que la presencia de esta hormona es requerida durante todo el período de aplicación del peso. En conjunto, estos datos permiten proponer que la vía de señalización de BRs actúa como un punto de convergencia entre la percepción del estímulo mecánico y la reorganización del crecimiento secundario.

Por otra parte, las SLs también demostraron ser necesarias para la respuesta al estrés mecánico, dado que las líneas mutantes *max4* (deficientes en la biosíntesis de SLs) y *brc1* no exhibieron aumento en el número de haces vasculares ni en la producción de semillas bajo tratamiento con peso. Este resultado coincide con estudios previos que describen el papel de las SLs en la modulación del crecimiento secundario del tallo y la

generación de ramificaciones (Gómez-Roldán y col., 2008; Brewer y col., 2009; Agustí y col., 2011), pero aporta evidencia novedosa sobre su papel en la plasticidad del sistema vascular en respuesta a estímulos externos. La ausencia de respuesta en plantas mutantes defectivas en la síntesis de SLs sugiere que esta hormona actúa corriente arriba de los procesos de proliferación cambial, posiblemente regulando la expresión de genes como *CLE44* y *BRC1*, cuya inducción se observó únicamente en plantas con señalización de SLs funcional.

Las SLs muestran una estrecha relación con las auxinas y los BRs. Se ha informado que las plantas mutantes *max4* presentan una mayor capacidad de transporte de auxinas mediante la regulación de PIN, una proteína facilitadora del eflujo de auxinas (Bennett y col., 2006). Además, el crecimiento radial del tallo en plantas tratadas con peso depende del transportador de salida de auxinas: PIN3 (Carrió-Seguí y col., 2024), lo que evidencia la fuerte interconexión entre las auxinas y las SLs durante el estrés mecánico.

En cuanto a los BRs, uno de los principales nodos de interacción entre ambas vías se establece a través de BES1, que participa como integrador transcripcional de ambas hormonas, necesarias para una activación completa del crecimiento cambial. Esta comunicación cruzada es crucial para el correcto crecimiento del tallo de la planta (Hu y col., 2022). En la vía de señalización de SLs, las formas fosforiladas y desfosforiladas de BES1 (que median la regulación de su actividad) pueden interactuar con proteínas SMXL, similares a D53, y su degradación es inducida por MAX2 en respuesta a SLs (Wang y col., 2013; Zhou y col., 2013), indicando que la regulación de la estabilidad de BES1 es un punto de conexión clave. Además, BES1 puede unirse directamente al promotor de *BRC1*, que también responde a SLs, e inhibir su expresión (Hu y col., 2020).

El gen que codifica el factor de transcripción *BRC1*, reconocido mediador de la respuesta a SLs en la inhibición de yemas laterales (Aguilar-Martínez y col., 2007), también se mostró inducido frente al estrés mecánico. Aunque normalmente se expresa de forma casi exclusiva en yemas axilares, en este estudio se observó que la expresión de *BRC1* aumentó tempranamente (6 h) en tallos tratados con peso, en un patrón que fue dependiente de las SLs. Este hallazgo amplía el espectro funcional de *BRC1* más allá del control de la ramificación, sugiriendo que también participa en la regulación del crecimiento secundario del tallo.

*BRC1* también regula positivamente la transcripción de tres HD-Zip I: *AtHB21*, *AtHB40* y *AtHB53* (González-Grandío y col., 2017). Si bien la ausencia de una respuesta diferencial en las líneas mutantes *athb21*, *athb40* y *athb53* sugiere que estos factores de transcripción no son esenciales para la respuesta morfológica principal, sí se observó un aumento en la actividad GUS en sus líneas reporteras *Pr:GUS* en los tallos tras la aplicación de peso. Esta inducción, que concuerda con la regulación informada de *AtHB53* por hipergravidad (Tamaoki y col., 2014), sugiere un papel auxiliar o redundante y propone que, aunque no son indispensables para obtener el fenotipo de respuesta al tratamiento con peso, podrían estar involucrados en la respuesta al estímulo mecánico. Esta observación también justifica la hipótesis de una regulación transcripcional de los HD-Zip I en respuesta al peso, la cual se explorará con más detalle en el Capítulo III,

centrándose en el rol de AtHB5 en la regulación de características asociadas al estrés mecánico y al transporte de fotoasimilados.

Finalmente, la interacción entre las vías de BRs y SLs emergió como un eje central en la respuesta al estrés mecánico. La inhibición de cualquiera de las dos vías impidió la respuesta vascular incluso en presencia de la otra, lo que sugiere que ambas son necesarias para una activación completa del crecimiento cambial. Este tipo de comunicación cruzada ha sido reportada en otros contextos del desarrollo en los que BRs y SLs regulan conjuntamente la elongación del tallo y la arquitectura de la planta mediante reguladores compartidos como BES1 y BZR1 (Hu y col., 2022). En el contexto del estrés mecánico, proponemos que las SLs actúan corriente arriba de los BRs, facilitando la activación de BES1, que promueve la expansión celular y la diferenciación del xilema.

## 5.2 EL PÉPTIDO CLE44 COMO MEDIADOR CENTRAL DE LA RESPUESTA VASCULAR

En condiciones normales CLE44 actúa junto a su par, CLE41, para promover la división cambial mediante la activación de su receptor PXY/TDR y el factor de transcripción WOX4 (Etchells y Turner, 2010; Hirakawa y col., 2008). En este trabajo, el análisis de este péptido permitió establecer que su inducción por el estrés mecánico constituye un evento clave en la respuesta del tallo. *CLE44* mostró una inducción significativa en respuesta al peso, tanto a nivel de transcripto como en el análisis histoquímico del reportero, que localizó su expresión en el cámbium de los haces vasculares diferenciados. Además, la supresión de la respuesta morfológica al peso en plantas mutantes *cle44* (las cuales no exhibieron aumento en el diámetro del tallo ni en los haces vasculares) respalda que la señalización mediada por este péptido es indispensable para activar la proliferación vascular bajo el estímulo.

Notablemente, las plantas mutantes *cle44* tratadas con peso produjeron significativamente menos semillas que sus controles, lo que sugiere que la señalización CLE44 no sólo afecta el desarrollo estructural del tallo, sino también la eficiencia del transporte de fotoasimilados y la producción de semillas.

El aumento de la expresión de *CLE44* bajo estímulo mecánico fue dependiente de la señalización de SLs, como se demostró por la ausencia de inducción del ARNm de *CLE44* en las plantas mutantes *max4* y *brc1*, lo que sugiere que *BRC1* es necesario para la respuesta de *CLE44* al peso y actúa corriente arriba de este. Esto es coherente con el hecho de que las SLs regulan la expresión de genes asociados al crecimiento del tallo y a la respuesta vascular (Agustí y col., 2011). Además, que *CLE44* también se regulara negativamente en experimentos de microarreglos con mutantes *bes1* (Saito y col., 2018) sugiere que podría ser un gen diana común de las vías de señalización de SL y BR, reforzando la idea de una red hormonal integrada.

El módulo de regulación TDIF/PXY (donde TDIF se compone de los péptidos CLE44/CLE41 secretados desde el floema hacia el receptor PXY ubicado en el cámbium) es crucial para la proliferación y

diferenciación cambial (Hirakawa y col., 2008). La inducción de *PXY* tras el tratamiento con peso sugiere que el módulo completo es activado para impulsar la división celular cambial, incluyendo genes clave ubicados corriente abajo de esta vía, como *WOX4* y *WOX14*. Nuestros resultados se alinean, entonces, con la función previamente descrita para esta vía en la regulación del cámbium vascular (Etchells y Turner, 2010; Hirakawa y col., 2010), pero aportan una nueva dimensión al identificar un vínculo directo entre ésta y la respuesta al estímulo mecánico externo.

Corriente abajo del receptor *PXY*, el tratamiento con peso indujo la expresión de *WOX14*, un gen involucrado en la diferenciación y lignificación de las células vasculares en los tallos de la inflorescencia de *Arabidopsis* (Denis y col., 2017). Por otro lado, se ha demostrado que *BES1* inhibe la expresión de *WOX4* (Hu y col., 2022), lo que sugiere que la ausencia de respuesta de este gen al tratamiento con peso podría deberse a una regulación negativa mediada por dicho factor. Asimismo, el aumento de la expresión de *WOX14* inducido por el peso en plantas mutantes *bes1* indica que su regulación no depende directamente de la señalización de BRs. No obstante, tanto *WOX4* como *WOX14* mostraron una disminución de sus niveles de transcripción luego de 6 h de tratamiento con BL, mientras que *WOX14* aumentó su expresión luego de 48 h, evidenciando una respuesta temporal diferencial. Es importante señalar que esta modulación inducida por BL se observó en plantas no sometidas al tratamiento mecánico. Del mismo modo, hasta el momento no se ha reportado evidencia que relacione la señalización de las SLs con la regulación de *WOX14*.

Adicionalmente, la inducción de *CLE44* y *BES1* a las 6 h de la aplicación exógena del análogo sintético de SLs, GR-24, sugiere que estos genes son regulados por SLs. La inducción de *CLE44* mediada por SLs es una respuesta temprana al estrés mecánico, aunque la respuesta morfológica completa al peso apareció más tarde (48 h), lo que indica que la vía de señalización de SLs se encuentra corriente arriba de la generada por el estímulo mecánico. Además, la recuperación parcial del fenotipo en plantas mutantes *cle44* que fueron tratadas con peso y con GR-24 sugiere que las SLs también podrían actuar a través de una vía independiente de *CLE44*.

### **5.3 UN MODELO DE RESPUESTA INTEGRAL: ESTRIGOLACTONAS, BRASINOESTEROIDES Y CLE44**

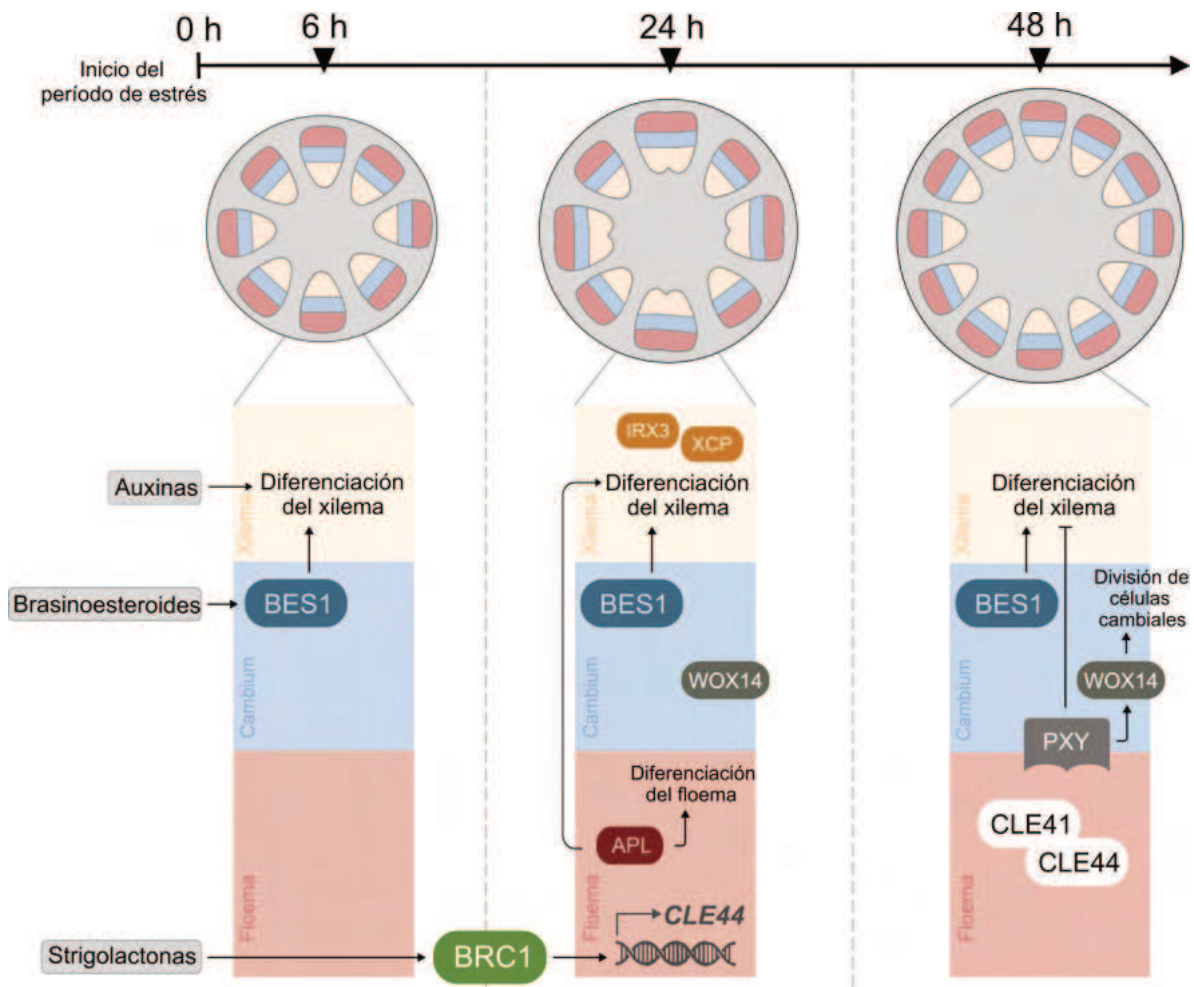
En conjunto, los resultados presentados en este capítulo demuestran que la respuesta al estrés mecánico en *Arabidopsis* involucra una compleja interacción jerárquica entre vías hormonales y señales peptídicas que coordinan la respuesta del tallo (Figura 18):

1. La percepción del estímulo mecánico activa, directa o indirectamente, las vías de BRs y SLs.
2. Los BRs, a través de *BES1*, y las SLs, a través de *BRC1*, convergen para modular la inducción de la señal peptídica *CLE44*.

3. CLE44 activa el módulo PXY/TDIF en el cámbium, promoviendo la proliferación cambial, mediante la vía de WOX4/WOX14, y el engrosamiento del tallo.
4. En vías paralelas, el estrés mecánico también genera inducción de marcadores clásicos del xilema y el floema, como *IRX3*, *XCP1* y *APL1*.

Este modelo de comunicación cruzada y jerárquica integra la señal mecánica como una señal instructiva que modula la asignación de recursos y el desarrollo vascular. El sistema permite a la planta equilibrar su desarrollo normal con la respuesta al estrés percibido, asegurando su supervivencia y éxito reproductivo en entornos variables.

Más allá de su valor en *Arabidopsis*, estos hallazgos ofrecen una base conceptual para entender cómo especies de interés agronómico podrían aprovechar mecanismos similares para incrementar su rendimiento frente a desafíos mecánicos y ambientales. En los capítulos siguientes, se abordarán los efectos de estas modificaciones sobre el transporte de azúcares y las redes transcripcionales que subyacen a la respuesta a estímulos mecánicos, extendiendo este modelo hacia una visión sistémica del control del crecimiento vegetal.



**Figura 18. Modelo de regulación propuesto para el tejido vascular del tallo luego del tratamiento mecánico.** Arriba se indica el tiempo transcurrido luego de la aplicación de peso. Abajo, representación esquemática de un corte transversal del tallo en los mismos tiempos. Las flechas indican la regulación directa. Las hormonas y los genes se localizan en diferentes tejidos según la literatura previa citada y los resultados descriptos.

## CAPÍTULO II

---

Alteraciones en el transporte de azúcares y su impacto en la respuesta al estrés mecánico  
e hídrico en *Arabidopsis*

# 1. INTRODUCCIÓN AL CAPÍTULO II

En el capítulo anterior se analizó cómo el estrés mecánico integra señales hormonales, mediadas principalmente por BRs y SLs, con la señalización molecular dependiente de la vía PXY/TDIF, generando una respuesta coordinada de engrosamiento del tallo y aumento del número de haces vasculares. Durante el estudio de las líneas mutantes (*bes1*, *bzr1*, *max4* y *cle44*), se observó que la ausencia de esta doble respuesta morfológica impide la manifestación de otra característica clave del estrés mecánico: el incremento en la producción de semillas. Este comportamiento coincide con los fenotipos descritos por Cabello y Chan (2019) en las mutantes *aux1*, *lax1* y *lax2*, donde, si bien algunas líneas presentaron un aumento del diámetro del tallo, ninguna mostró cambios en el número de haces vasculares, y en el caso particular de *lax2*, no se detectó ni engrosamiento del tallo ni incremento en la cantidad de haces vasculares. En todos los casos, las mutantes carecieron del aumento en la producción de semillas observado en las plantas WT expuestas al mismo tratamiento mecánico.

Dado que el tejido vascular, y en particular el floema del tallo constituye la vía principal para el transporte a larga distancia del carbono fijado en hojas y tejidos fotosintéticos hacia los órganos reproductivos (como flores y silicuas jóvenes), resulta razonable suponer que el mayor desarrollo vascular inducido por el estrés mecánico podría favorecer un flujo más eficiente de carbono hacia los órganos sumidero, posibilitando así un aumento en la producción de semillas.

Con el fin de profundizar en esta hipótesis, en este capítulo se plantea el análisis del transporte de fotosintatos a larga distancia en plantas sometidas a estrés mecánico, considerando aspectos claves de este proceso, tales como la función de los transportadores de sacarosa de las familias SWEET y SUC, el mecanismo de carga y descarga activa del floema, y las posibles alteraciones en el flujo de carbono en respuesta a estímulos mecánicos e hídricos.

## 1.1 TRANSPORTE DE AZÚCARES DE ORGANOS FUENTE A SUMIDERO

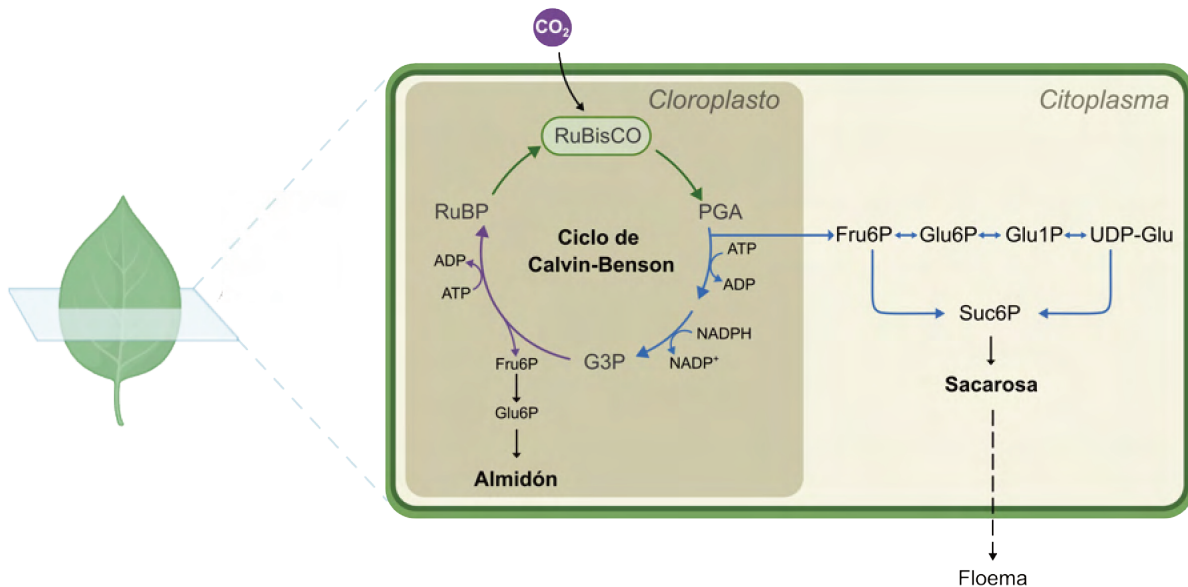
La eficiencia con que una planta distribuye los productos de la fotosíntesis hacia los órganos en crecimiento determina, en gran medida, su desarrollo y su capacidad de adaptación frente a condiciones adversas. Este proceso, conocido como transporte fuente-sumidero, integra la asimilación de carbono en tejidos fotosintéticos (fuentes), su carga en el floema y su posterior descarga en tejidos consumidores o de almacenamiento (sumideros), que son aquellos incapaces de realizar fotosíntesis o que tienen una demanda de carbono tan alta que su propia maquinaria no alcanza a cumplir (Lemoine y col., 2013).

En *Arabidopsis*, el sistema de transporte de fotosintatos a larga distancia juega un papel fundamental en la homeostasis energética y en la respuesta a estreses abióticos, e inicia con la fijación de carbono atmosférico, a través de la fotosíntesis, para generar sacarosa, el principal azúcar transportado.

### 1.1.1 Fotosíntesis

La fotosíntesis es, quizá, el rasgo que más caracteriza al reino vegetal. Constituye la fuente primaria de carbono para la planta, en la que la energía lumínica y el  $\text{CO}_2$  atmosférico se convierten en compuestos orgánicos a través del ciclo de Calvin-Benson (Figura 19).

En plantas como *Arabidopsis*, la fotosíntesis se produce mayormente en las células del mesófilo, células alargadas que se encuentran directamente por debajo de la epidermis superior y que contienen a los cloroplastos (Curtis y col., 2008). El  $\text{CO}_2$  ingresa a la planta desde el ambiente por medio de los estomas y luego a la célula por difusión. Una vez dentro de la célula, el proceso fotosintético involucra dos fases: la fase luminosa (en la que se produce  $\text{O}_2$ , ATP y NADPH) y el ciclo de Calvin-Benson, en el cual el  $\text{CO}_2$  es reducido a carbohidratos y se consumen el ATP y NADPH generados en la fase luminosa. Durante el día, ambas fases suceden simultáneamente, pero en regiones diferentes del cloroplasto: las reacciones de la fase lumínica tienen lugar en las membranas tilacoides y el ciclo de Calvin-Benson se lleva a cabo en el estroma (Buchanan y col., 2015). El principal producto carbonado proveniente del ciclo es el gliceraldehído 3-fosfato (G3P), un azúcar simple que puede ser exportado al citosol para la síntesis de sacarosa.



**Figura 19. Ciclo de Calvin-Benson y síntesis de sacarosa en *Arabidopsis***

La fijación de  $\text{CO}_2$  ocurre principalmente en células del mesófilo, mediante el ciclo de Calvin-Benson. La vía está estrechamente integrada con la síntesis de los principales productos finales de la fotosíntesis: almidón y sacarosa. Figura modificada de Stitt y col., 2010.

### 1.1.2 Biosíntesis de sacarosa

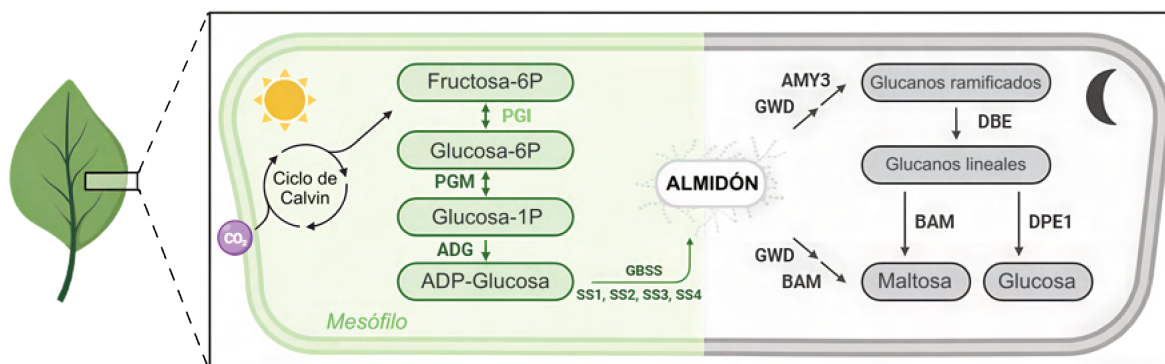
La sacarosa está compuesta por un monómero de glucosa unido mediante enlace glucosídico  $\alpha$  (1-2) a un monómero de fructosa, representa el principal producto soluble exportado desde las hojas hacia otros tejidos y su síntesis ocurre en el citosol a partir del carbono fijado en los cloroplastos (Stitt y col., 2010; Figura 19).

Durante el día, la fotosíntesis y subsiguiente generación de sacarosa pueden exceder los requerimientos energéticos y de transporte. Ese exceso de carbono fluye hacia la acumulación de almidón transitorio en cloroplastos, que es almacenado para suplir las necesidades de carbono en momentos en los que la fotosíntesis no es posible, por ejemplo, durante la noche, cuando se degrada para regenerar sacarosa permitiendo así igualar las tasas de exportación diurnas de este azúcar (Fondy y Geiger, 1982; Stitt y Zeeman, 2012; Buchanan y col., 2015).

Este equilibrio dinámico entre la síntesis, degradación y transporte de sacarosa es esencial para sostener la presión osmótica y energética del floema, que depende del gradiente de concentración de sacarosa generado entre los tejidos fuente y sumidero (Ayre, 2011).

### 1.1.3 Síntesis y degradación de almidón transitorio

Los glúcidos provenientes de la fotosíntesis que no son utilizados como fuente de energía o transportados fuera de la célula pueden ser almacenados por las plantas de varias formas, siendo la más común la síntesis de almidón.



**Figura 20. Vías de síntesis y degradación de almidón transitorio en hojas del mesófilo de Arabidopsis**

Durante el día, el exceso de carbono fijado con la fotosíntesis fluye hacia la biosíntesis de almidón transitorio. Durante la noche, este almidón es degradado para suplir las necesidades energéticas de la planta. El esquema muestra las principales enzimas y metabolitos implicados en este proceso.

En órganos o tejidos de almacenamiento, como las semillas, el almidón se sintetiza en los amiloplastos donde puede ser almacenado por largos períodos de tiempo. Allí, el carbono necesario para la síntesis del polímero proviene del metabolismo de la sacarosa que llega transportada. A esta forma de almacenar el almidón se la conoce como “almacenamiento de reserva”. En otros tejidos, como las hojas, el almidón se acumula, pero de manera transitoria, sintetizándose durante el día y degradándose durante la noche para sostener el metabolismo y crecimiento de la planta (Stitt y Zeeman, 2012; Figura 20). Este almidón se utiliza casi totalmente al final de la noche en plantas que crecen con un nivel adecuado de nutrientes y una temperatura favorable.

Las enzimas que participan en estas vías de síntesis y degradación de almidón transitorio se encuentran bien descritas y su correcta regulación es lo que permite a la planta controlar la homeostasis de este polímero. El proceso de síntesis inicia con la conversión de fructosa 6-fosfato, proveniente del ciclo de Calvin-Benson, en ADP-glucosa, en una vía que involucra la intervención de varios metabolitos intermedios y la acción de una fosfoglucoisomerasa (PGI), una fosfoglucomutasa (PGM1) y una pirofosforilasa (ADG) (Stitt y Zeeman, 2012; Figura 20). Las plantas mutantes de *Arabidopsis* en las que las actividades de estas enzimas se reducen o eliminan presentan niveles considerablemente reducidos de almidón en las hojas, lo que demuestra que esta vía es responsable del principal flujo de carbono hacia el almidón (Caspar y col, 1985; Lin y col., 1988).

Los pasos posteriores en la biosíntesis del almidón son catalizados por las sintasas del almidón (SS1, SS2, SS3 y SS4) y las enzimas ramificadoras (GBSS), que generan gránulos complejos y de gran tamaño (Stitt y Zeeman, 2012)

La degradación del polímero, por otro lado, puede generar dos productos principales: glucosa y maltosa, y puede darse por más de una vía. Inicia con una fosforilación, mediada por la glucano-agua-diquinasa (GWD), que fosforila residuos de glucosilo alterando el empaquetamiento del gránulo. Luego actúan un conjunto de enzimas, entre las que destacan las  $\beta$ -amilasas (BAM, liberan maltosa), enzimas desramificantes (DBE),  $\alpha$ -amilasas (AMY) y la enzima desproporcionadora (DPE, una  $\alpha$ -1,4-glucanotransferasa; Stitt y Zeeman, 2012; Figura 20).

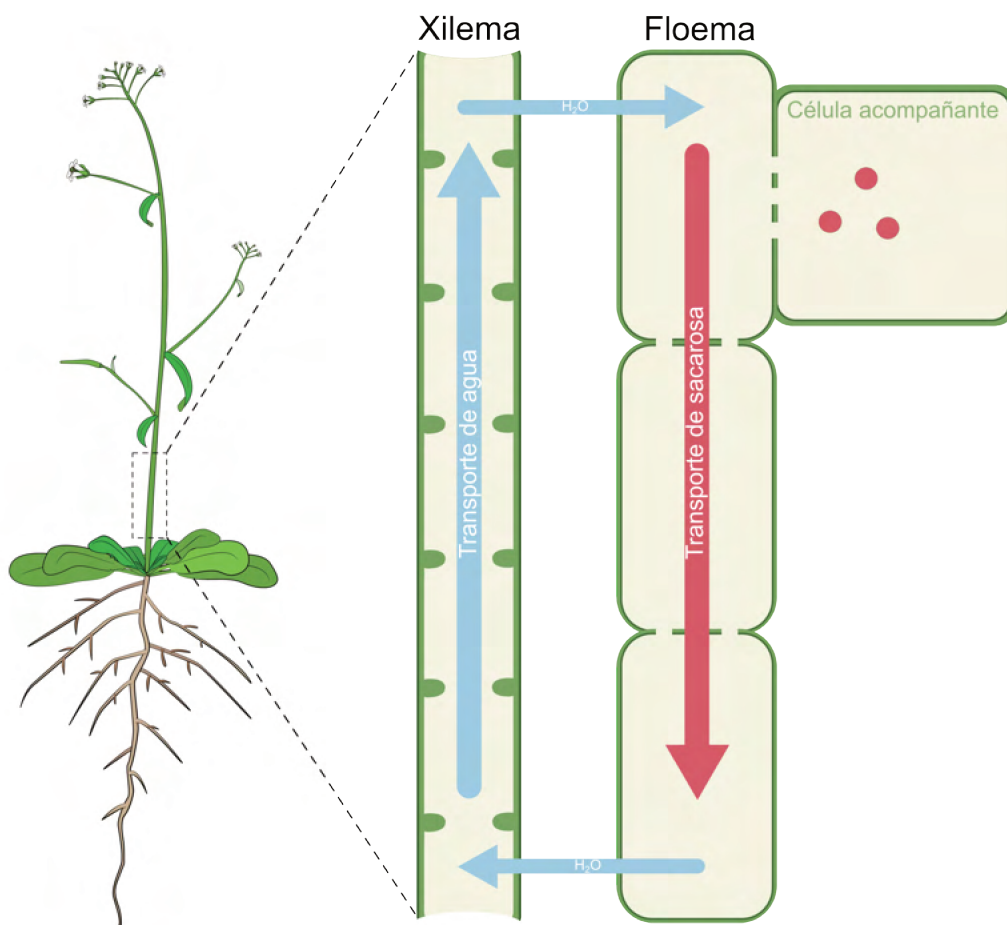
Las plantas mutantes de *Arabidopsis* que carecen de una o más de las enzimas de estas vías presentan alteraciones en la homeostasis del almidón. Las plantas mutantes *pgm* presentan tasas de crecimiento reducidas y acumulan el carbono asimilado como azúcares más simples (Gibon y col., 2004) y las mutantes *gwd1* de *L. japonicus*, con un marcado fenotipo de exceso de almidón, presentan graves defectos de crecimiento (Vriet y col., 2010), lo que muestra que la acumulación excesiva de carbono como reserva afecta el crecimiento.

El carbono fijado durante la fotosíntesis, entonces, es dirigido principalmente a la síntesis de sacarosa y almidón y la distribución de ese carbono entre ambos compuestos depende del estadio de desarrollo de la planta y de las condiciones ambientales.

### 1.1.4 Transporte de carbono a larga distancia

Luego de su síntesis en los tejidos fuente, la sacarosa, si no es requerida por los mismos, es enviada hacia tejidos sumideros, constituidos por células que no cuentan con la maquinaria necesaria para realizar la fotosíntesis por lo que requieren de una provisión externa de carbono para utilizar como fuente de energía. La partición de carbono es el proceso mediante el cual los fotoasimilados se distribuyen por el cuerpo de la planta a partir de tejidos fotosintéticos (Lemoine y col. 2013).

La partición de carbono a los distintos sumideros varía durante los distintos estadios de desarrollo de la planta y en respuesta a condiciones ambientales. Durante el crecimiento vegetativo, las raíces y las hojas jóvenes son sumideros importantes, mientras que las semillas se convierten en sumideros dominantes durante las etapas reproductivas (Wardlaw, 1990).



**Figura 21. Representación del transporte a larga distancia a través del floema**

La sacarosa (puntos rojos) es transportada a través de los elementos de tubo criboso del floema por gradiente de concentración desde las células de tejidos fuente hacia los sumideros. El xilema (izquierda) se encarga del transporte de agua y minerales.

Para que la sacarosa llegue, por ejemplo, desde las hojas de roseta donde es sintetizada, hasta las silicuas o semillas, se requiere de un transporte a larga distancia (Figura 21). Este transporte se realiza principalmente a través del floema del tallo, impulsado por diferencias osmóticas entre las regiones de carga y descarga (Keller, 2010).

Este transporte a través de los plasmodesmos de los elementos de tubo criboso que componen el floema es rápido y eficiente, sin embargo, es de relevancia destacar que, para llegar hasta el floema, desde las células del mesófilo donde fue sintetizada, la sacarosa requiere de la acción de transportadores específicos.

### **1.1.5 Transportadores de sacarosa**

El transporte de la sacarosa hacia los tejidos sumidero comienza con su salida desde las células del mesófilo hacia las células del parénquima del floema, utilizando los plasmodesmos. Luego, en la membrana plasmática de las células parenquimáticas, su movilización requiere de la acción de transportadores de membrana específicos.

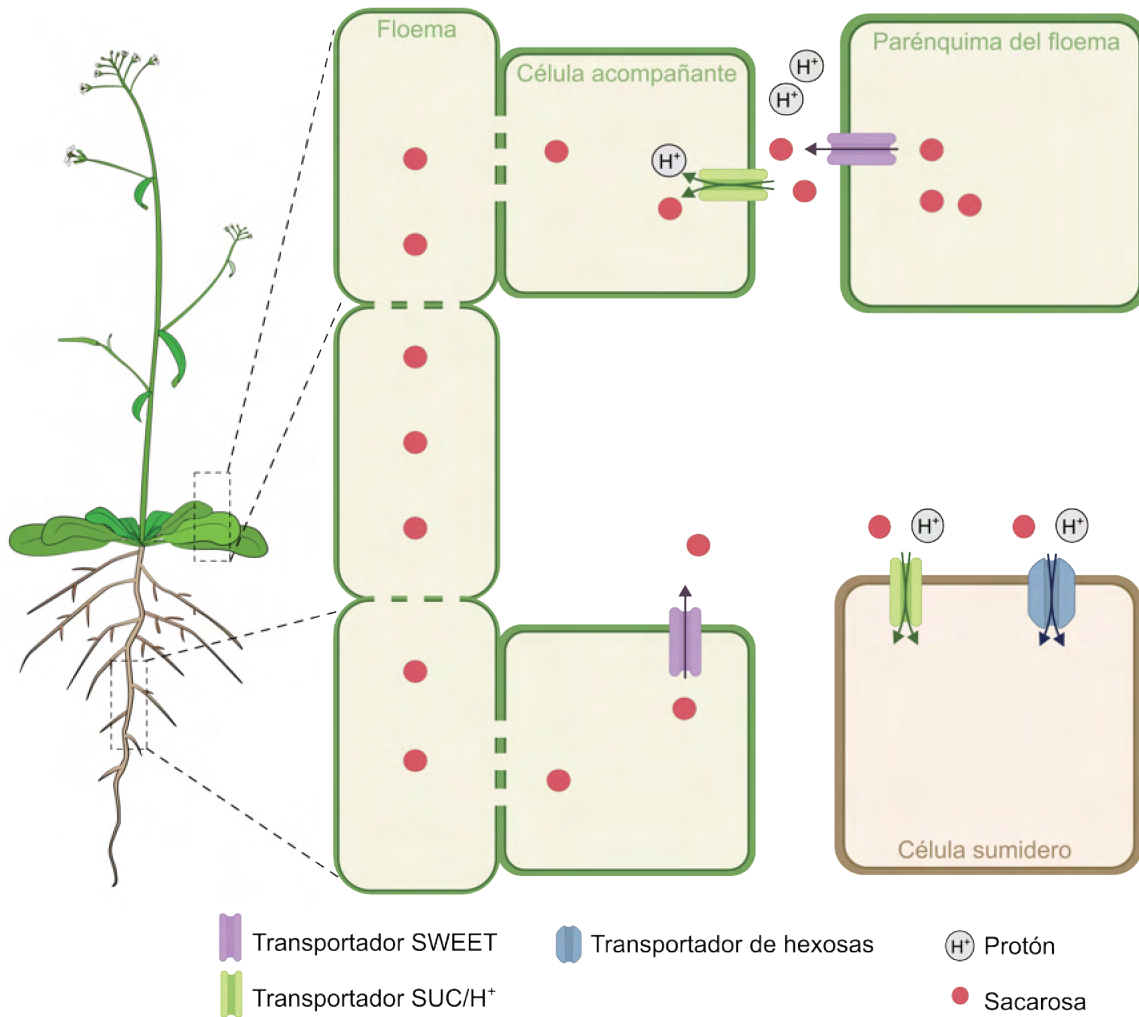
El movimiento de sacarosa a través de las membranas celulares depende de proteínas transportadoras especializadas, entre las que destacan las familias SUC/SUT (*SUCROSE TRANSPORTER*) y SWEET (*SUGARS WILL EVENTUALLY BE EXPORTED TRANSPORTERS*). Los transportadores SUC son de alta afinidad y están involucrados en la carga activa de sacarosa al floema, utilizando gradientes de protones como fuerza motriz (Kühn y Grof, 2010). En contraste, los SWEETs median la difusión facilitada bidireccional de azúcares y participan tanto en la descarga del floema como en la movilización de carbono hacia tejidos de almacenamiento o defensa (Chen y col., 2009).

## **1.2 TRANSPORTADORES ESPECÍFICOS DEL TIPO SWEET Y SUC**

Los transportadores SWEET y SUC desempeñan roles complementarios en el movimiento de azúcares hacia los tejidos vasculares. En hojas, SWEET11 y SWEET12 liberan sacarosa al apoplasto (Chen y col., 2012), donde es posteriormente recapturada por SUC2, ubicados en la membrana plasmática del complejo de células formado por el elemento del tubo criboso y su célula acompañante, completando el proceso de carga (Haritatos y col., 2000). En tejidos sumidero, la descarga se lleva a cabo mediante la actividad de SWEETs específicos, permitiendo la redistribución del carbono hacia órganos en crecimiento o almacenamiento (Figura 22).

Debido a que la sacarosa debe acumularse contra gradiente de concentración en la célula acompañante, el transportador SUC se encuentra asociado a una H<sup>+</sup>/ATPasa (Geiger y col., 1973; Evert y col., 1978; Stadler y Sauer, 1996; Gottwald y col., 2000; Gaxiola y col., 2007). La transición desde la célula acompañante a los elementos de tubo criboso se realiza mediante plasmodesmos.

La descarga de sacarosa ocurre siempre donde la presión de la turgencia cae, o sea, en los tejidos sumidero y puede ser simplástica o apoplástica. El primer caso sólo requiere de la presencia de plasmodesmos, mientras que el segundo involucra una nueva liberación al apoplasto mediada por transportadores SWEET y posterior captación de la sacarosa por simportadores SUC ubicados en la membrana plasmática de las células sumidero. Aquí, la sacarosa también puede ingresar a las células en forma de hexosas, glucosa y fructosa, que se generan por acción de una invertasa de pared celular (Ayre, 2011; Ludewig y Flüge, 2013; Ruan, 2014; Figura 22).



**Figura 22. Rol de los transportadores SUC y SWEET de Arabidopsis en la carga y descarga al floema**

Representación esquemática de la carga y descarga de sacarosa al floema: la sacarosa presente en las células del parénquima del floema sale al apoplasto en las proximidades de la célula acompañante (CA) a través de transportadores SWEET. Es cargada en la CA por transportadores SUC/H<sup>+</sup>. La fuerza protón-motriz se genera por la hidrólisis del ATP en la membrana plasmática mediante el bombeo de protones de ATPasas. Por gradiente de concentración la sacarosa se transporta a larga distancia hasta los tejidos sumidero. El transporte, una vez descargada la sacarosa del floema, puede

ser por plasmodesmos o por transportadores de membrana tipo SUC o de glucosa y fructosa, previa hidrólisis de la sacarosa por acción de invertasas apoplásticas.

La expresión y localización subcelular de los diferentes miembros de estas familias de transportadores varía entre tejidos, y su regulación responde a señales de desarrollo, estado energético y condiciones de estrés (Klemens y col., 2013; Durand y col., 2018). AtSUC2, AtSWEET11 y AtSWEET12 están involucrados en la carga de sacarosa al floema, por lo que los genes que los codifican se expresan mayormente en hojas y sus niveles de expresión aumentan cuando la exportación de sacarosa es alta (Durand y col., 2018). En *Arabidopsis*, se ha demostrado que las plantas mutantes *atsuc2* crecen lentamente, acumulan carbohidratos en sus hojas y no producen semillas debido a la importación deficiente de sacarosa en el complejo elemento de tubo criboso-célula acompañante (Gottwald y col., 2000; Srivastava y col., 2008). AtSWEET11 y AtSWEET12 son parálogos cercanos que se localizan en la membrana plasmática de las células del parénquima del floema y su mutación también conduce a una mayor acumulación de azúcares en hojas (Chen y col., 2012).

*AtSWEET13* se expresa comúnmente en hojas en niveles bajos, aunque éstos se inducen en la doble mutante *atsweet11/atsweet12* (Chen y col., 2012). Durand y col., (2017) han propuesto su participación en la asignación de carbono a raíces, ya que *AtSWEET13* es el de mayor expresión en ese órgano. Las actividades promotoras de *AtSWEET13* y *AtSWEET14* también se detectaron en anteras durante las últimas etapas del desarrollo de la flor y la doble mutante *atsweet13/atsweet14* presenta fertilidad reducida y produce menor cantidad de semillas por silicua, fenotipo que no se observa en las mutantes simples (Kanno y col., 2016).

A nivel celular, AtSWEET16 y AtSWEET17 se localizan predominantemente en la membrana del tonoplasto, donde median el intercambio de azúcares entre el citosol y la vacuola (Klemens y col., 2013; Guo y col., 2014). *AtSWEET16* presenta expresión dentro del sistema vascular de pecíolos, tallos y flores (Klemens y col., 2013). Los intercambios de azúcar en el tonoplasto, regulados por SWEET16, son importantes para la división celular del xilema. Las plantas mutantes *atsweet16* presentan un número reducido de células del xilema y las mutantes dobles *atsweet16/17* tienen alteraciones en la composición de las paredes de células del xilema, probablemente debido a la baja disponibilidad de azúcar citosólica (Aubry y col., 2022). Esto sugiere que la disponibilidad de azúcares modulada por estos transportadores es crítica para el desarrollo vascular.

AtSWEET17 se localiza en tejido vascular de hojas, raíces y tallos (Chardon y col., 2013, Aubry y col., 2022) y se sabe que su sobreexpresión causa alteraciones en la acumulación de azúcares (Chardon y col., 2013; Guo y col., 2014). También se ha observado una respuesta diferencial al estrés hídrico en mutantes *atsweet17*, que presentan menor tolerancia a la sequía (Chardon y col., 2013; Valifard y col., 2021).

En condiciones de estrés abiótico, como déficit hídrico o estrés mecánico, la regulación de estos transportadores permite ajustar el flujo de carbono hacia tejidos críticos, preservando la integridad celular y la homeostasis osmótica (Durand y col., 2018; Valifard y col., 2021).

### **1.3 ALMACENAMIENTO DE COMPUESTOS DE RESERVA EN SEMILLAS**

Dos sumideros de carbono importantes en *Arabidopsis* son las silicuas y las semillas en formación. Durante el desarrollo de las semillas, la sacarosa proveniente del floema es transportada hacia el endospermo y el embrión, donde se reconfigura en diferentes moléculas de reserva que sostendrán la germinación y el crecimiento inicial de la plántula (Baud y col., 2008).

En *Arabidopsis*, la sacarosa que llega a las semillas atraviesa las células del tegumento y del endospermo mediante transportadores específicos (como SWEETs y SUCs) y luego es convertida en hexosas. Estas rutas canalizan el carbono hacia la síntesis de almidón, ácidos grasos y proteínas de reserva en el embrión en desarrollo (Fait y col., 2006).

La principal forma de almacenamiento de carbono en las semillas de *Arabidopsis* es en ácidos grasos (predominantemente triacilglicéridos), que representan entre el 30 y el 40 % del peso seco, seguidos por proteínas de reserva (Baud y Lepiniec, 2010). El almidón transitorio, aunque presente en etapas intermedias del desarrollo, es casi completamente degradado hacia el final de la maduración, cediendo su carbono a la biosíntesis de lípidos.

Una vez completada la desecación, estas reservas se mantienen inactivas hasta la germinación, momento en el cual son movilizadas nuevamente hacia rutas catabólicas que abastecen al embrión en crecimiento.

### **1.4 LA RELACIÓN DE LAS PLANTAS CON EL DÉFICIT HÍDRICO**

El estrés hídrico es uno de los factores abióticos más limitantes para el crecimiento vegetal y afecta directamente la fotosíntesis, la transpiración y el transporte de asimilados (Osakabe y col., 2014). La reducción del potencial hídrico del suelo genera una respuesta fisiológica coordinada que incluye el cierre estomático, la acumulación de osmolitos compatibles y la reprogramación de la expresión génica para reducir el consumo energético.

Uno de los procesos más afectados por la falta de agua es la translocación de azúcares a través del floema, debido a la disminución de la turgencia, la alteración en la carga y descarga de sacarosa, y los cambios en la expresión de transportadores de sacarosa (Chardon y col., 2013; Durand y col., 2016; Valifard y col., 2021). Durante la sequía, se observa una redistribución del carbono fotoasimilado, que generalmente resulta en una

reducción del flujo hacia los órganos sumideros, lo que impacta negativamente sobre la floración, la formación de semillas y el rendimiento final (Lemoine y col., 2013).

En *Arabidopsis*, varios miembros de la familia SWEET (como *AtSWEET11*, *AtSWEET12*, *AtSWEET16* y *AtSWEET17*) muestran modulación de su expresión bajo estrés osmótico o hídrico, sugiriendo un papel central en la redistribución del carbono entre la vacuola, el citosol y el floema (Durand y col., 2016; Klemens y col., 2014). Estos ajustes coordinados permiten a la planta sostener la integridad del flujo de carbono y mejorar su resiliencia frente al déficit hídrico, aunque a costa de un menor crecimiento y productividad.

#### **1.4.1 Estrés mecánico y su relación con la tolerancia a otros estreses bióticos y abióticos**

En la naturaleza, los estímulos mecánicos como el viento, el peso propio, la lluvia o el roce con otros organismos forman parte del entorno cotidiano de las plantas y pueden actuar como señales frente a futuros desafíos ambientales. Se ha demostrado que la percepción de fuerzas mecánicas desencadena ajustes estructurales y moleculares que, en muchos casos, confieren una mayor tolerancia frente a distintos tipos de estrés biótico y abiótico. Por ejemplo, la estimulación mecánica leve puede activar respuestas de defensa y aumentar la resistencia a los patógenos mediante la inducción de genes asociados a la inmunidad basal y al fortalecimiento de la pared celular (Benikhlef y col., 2013). Se ha observado que las plantas sometidas a estímulos mecánicos pueden presentar mayor capacidad de sostén, acumulación diferencial de metabolitos protectores y modificaciones en la arquitectura foliar, lo que mejora su desempeño frente a nuevas condiciones adversas (Chehab y col., 2012; Brenya y col., 2020; Brenya y col., 2022). En términos de estrés abiótico, se conoce que la aplicación prolongada de estrés mecánico promueve la tolerancia a frío en plantas de tomate y maíz, lo que se relaciona con el aumento de metabolitos de almidón y azúcares solubles de las plantas estresadas mecánicamente durante el enfriamiento (Keller y Steffen, 1995; Li y Gong, 2011) y, por otro lado, en plantas de *P. vulgaris* el frotamiento del tallo aumenta la concentración de ácido abscísico lo que permitió mejorar la recuperación a sequía (Jaffe y Biro, 1979).

Los cambios estructurales asociados al estrés mecánico descritos en el Capítulo I, incluyendo el incremento del diámetro del tallo, la expansión del xilema y del floema, y el aumento de la lignificación informada por Cabello y Chan (2019), son particularmente relevantes para comprender cómo esta señal podría influir sobre la tolerancia a otros estreses. El fortalecimiento del sistema vascular resulta fundamental para sostener la integridad de los haces conductores bajo condiciones desfavorables. En el caso del xilema, una mayor área de conducción y un incremento en la lignificación pueden reducir el riesgo de colapso o cavitación, facilitando así un transporte hídrico más estable (Thonglim y col., 2021). En el floema, la expansión de los tejidos y el aumento en la capacidad de carga pueden favorecer el movimiento de fotoasimilados aún en escenarios de demanda alterada o bajo estrés.

A partir de estos elementos, planteamos la hipótesis de que la exposición previa al estímulo mecánico podría mejorar determinados aspectos de la tolerancia a la sequía, particularmente en plantas WT. La mayor proporción de tejido de xilema generada por el peso podría sostener de manera más eficiente el transporte de agua en condiciones de disponibilidad reducida, mientras que las modificaciones observadas en el floema podrían facilitar la redistribución de carbono hacia órganos críticos durante el estrés hídrico. Sobre esta base se formularon los objetivos experimentales que se desarrollan en este capítulo.

## 2. OBJETIVOS DEL CAPÍTULO II

Teniendo en cuenta que las plantas mutantes en *lax2*, *brc1* y *cle44* no mostraron la respuesta de crecimiento radial del tallo y aumento de haces vasculares que hemos asociado al tratamiento mecánico y tampoco fueron capaces de mejorar su rendimiento de semillas, planteamos una asociación entre ambas características y proponemos evaluar qué mecanismos subyacen a esta relación putativa. Para esto, proponemos:

1- Evaluar alteraciones en la acumulación y el transporte de fotosintatos en plantas WT y las mutantes mencionadas, crecidas en condiciones normales y sometidas a estrés mecánico. Cuantificando directamente los metabolitos (almidón y sacarosa) o los niveles de transcriptos de genes claves de las vías de síntesis y degradación de almidón transitorio.

2- Cuantificar, dentro de cada haz vascular de plantas control o tratadas, las áreas correspondientes a xilema, cámbium y floema, para determinar si el tratamiento genera alteraciones en la proporción entre ellas.

3 – Evaluar el contenido de sustancias de reserva (lípidos y proteínas) en semillas, para conocer si el tratamiento afecta su calidad.

4 – Medir niveles de transcriptos de transportadores de sacarosa SWEET y SUC en plantas WT sometidas al tratamiento mecánico, para investigar si su expresión se ve alterada por el tratamiento.

5 – Estudiar el transporte a través del floema, evaluando su velocidad mediante el uso de la sonda fluorescente CFDA (5(6)-carboxyfluoresceín diacetato).

6 – Aplicar el tratamiento con peso en mutantes *atsuc2*, *atsweet11*, *atsweet12*, *atsweet16* y la doble mutante *atsweet11/12* para analizar su rol en la respuesta al estrés.

7 – Analizar los efectos de la combinación de estrés mecánico y estrés hídrico, para descubrir si la aplicación del primero favorece la respuesta de las plantas frente a la falta de agua.

8 – Finalmente, también se propone evaluar mediante un ensayo de transcriptómica (*RNA-Seq*) alteraciones en los niveles de transcriptos, medidas en tallos de plantas tratadas con peso, que puedan ser disparadores iniciales de la respuesta.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIALES

##### 3.1.1 Especies vegetales

Ver sección 3.1.2 del Capítulo I

##### 3.1.2 Plantas mutantes de *A. thaliana*

Las líneas mutantes *brc1* y *cle44* han sido descritas en la Sección 3.1.5 del Capítulo I de este trabajo y la línea mutante *lax2* fue descrita por Cabello y Chan (2019). Las mutantes *atsweet11* (AT3G48740; SALK\_073269), *atsweet12* (AT5G23660; SALK\_031696) y la doble mutante *atsweet11/12* fueron previamente descritas por Chen y col., 2015.

Las mutantes *atsuc2-a* (AT1G22710; SALK\_208617C), *atsuc2-b* (AT1G22710; SALK\_038124) y *atsweet16* (AT3G16690; SAIL\_889\_C05.C) fueron obtenidas del sitio ABRC.

##### 3.1.3 Oligonucleótidos

En la Tabla 4 se muestra el nombre, el ID del locus y la secuencia de los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de RT-qPCR.

**Tabla 4.** Oligonucleótidos utilizados para las reacciones de RT-qPCR

Nombre	ID del locus	Secuencia 5' → 3'	Uso
SWEET9-F	AT2G39060	ACGCCGTCATGTGGTTCTTT	RT-qPCR
SWEET9-R	AT2G39060	TGCTAGTTGGTTCTCTGTTGGC	RT-qPCR
SWEET10-F	AT5G50790	AACTCCTTGCCTTTGTCGTACA	RT-qPCR
SWEET10-R	AT5G50790	GTCAACACGAAGATTGCGCC	RT-qPCR
SWEET11-F	AT3G48740	AACAAGTGTACCTGCGAAATGAT	RT-qPCR
SWEET11-R	AT3G48740	AAGAGGACTGCTTGCCATGTTTAG	RT-qPCR
SWEET12-F	AT5G23660	CATATGGCTCCTTTATGGTCTTGC	RT-qPCR
SWEET12-R	AT5G23660	ACGTTTGGGAAGGCAACATAGATA	RT-qPCR
SWEET13-F	AT5G50800	CTTCTACGTTGCCCTTCCAATG	RT-qPCR
SWEET13-R	AT5G50800	CTTTGTTTCTGGACATCCTTGTTGA	RT-qPCR
SWEET14-F	AT4G25010	AAACGCTGTGGGATGCTTCA	RT-qPCR
SWEET14-R	AT4G25010	TTCAAGAGCCCAAGAACCTTCA	RT-qPCR

SWEET15-F	AT5G13170	CAATGACATATGCATAGCGATTCCAA	RT-qPCR
SWEET15-R	AT5G13170	GGACTCATCAGACAATACTCTTAAG	RT-qPCR
SWEET16-F	AT3G16690	GAGATGCAAACTCGCGTTCTAGT	RT-qPCR
SWEET16-R	AT3G16690	GCACACTTCTCGTCGCACA	RT-qPCR
SWEET17-F	AT4G15920	AGTGACAACAAAGAGCGTGAAATAC	RT-qPCR
SWEET17-R	AT4G15920	ACTTAAACCGTTGCTTAAACCAACC	RT-qPCR
SUC1-F	AT1G71880	GACCTTTCGACGCCTTGTTT	RT-qPCR
SUC1-R	AT1G71880	AATACTCCACTAATCGCCGCTG	RT-qPCR
SUC2-F	AT1G22710	CATTCTTTTGCCTAGCTTCCAT	RT-qPCR
SUC2-R	AT1G22710	AGAACACCTAGGGAAAGTCCTTGG	RT-qPCR
SUC3-F	AT2G02860	CAAGAACCGCAGCCGTAATC	RT-qPCR
SUC3-R	AT2G02860	CTTGACCGCCACCGGAAT	RT-qPCR
SUC4-F	AT1G09960	AGTGTCAAGCGAGGAACGCATA	RT-qPCR
SUC4-R	AT1G09960	AGTCACACGAGAAGCCATTGC	RT-qPCR
SUC5-F	AT1G71890	GGGCTATGGGATTCCATTAG	RT-qPCR
SUC5-R	AT1G71890	TAAAAGACAGACGACCAAGG	RT-qPCR
SUC6-F	ATG543610	TCCTGTCTCCGGCCTGCTT	RT-qPCR
SUC6-R	ATG543610	AGGCGCCATAGCGATGA	RT-qPCR
SUC7-F	AT1G66570	GTCTTTAAGAGACAAGCCCAC	RT-qPCR
SUC7-R	AT1G66570	AGACTGTCTATCCACAGTCGT	RT-qPCR
SUC8-F	AT2G14670	CTAGCTTCCATAATCTCAAGT	RT-qPCR
SUC8-R	AT2G14670	TTGGTAAAGTTTCCACCTCCAAAA	RT-qPCR
SUC9-F	AT5G06170	GTGGTTCCTGATGAGCCG	RT-qPCR
SUC9-R	AT5G06170	GAGAAGCTGAACGTATGGG	RT-qPCR
PGM-F	AT5G51820	GTGAAAGAGTATTGGGCGACA	RT-qPCR
PGM-R	AT5G51820	CCGTGAACACAAACCGAACA	RT-qPCR
ADG1-F	AT5G48300	CACCGTCTAAGATGCTTGATGC	RT-qPCR
ADG1-R	AT5G48300	GATGTGCGAGTTTTTCCCAAT	RT-qPCR
ADG2-F	AT5G19220	ATCAAGGAGAAACCTGCCACCA	RT-qPCR
ADG2-R	AT5G19220	TCGTAGTAATCTGCCCAAGC	RT-qPCR
GBSS-F	AT1G32900	ATAGGGAGATTGGAGGAGCAGA	RT-qPCR
GBSS-R	AT1G32900	CAATGTGGAAACCTGTGTAGC	RT-qPCR
SS1-F	AT5G24300	CTTGATTACCAGAAGGGCATTG	RT-qPCR
SS1-R	AT5G24300	CGTTTTCCCAAGAGTAGTTTCG	RT-qPCR
SS2-F	AT3G01180	AGATAAAGCACGGGGATGGG	RT-qPCR

SS2-R	AT3G01180	CCAACCAAGACCCGTTTCAC	RT-qPCR
SS3-F	AT1G11720	CTGGGGCTGACTTTATTCTTGT	RT-qPCR
SS3-R	AT1G11720	AGTCTTGCTCCATCACCGTCT	RT-qPCR
SS4-F	AT4G18240	ACACGCCCTTAGAAAGCAGC	RT-qPCR
SS4-R	AT4G18240	ACAAATCGGAGGCTGCGTAA	RT-qPCR
GWD-F	AT1G10760	AACGAGAGAGCATACTTCAGC	RT-qPCR
GWD-R	AT1G10760	CAATCGGTTTGCTTGGGTAG	RT-qPCR
AMY3-F	AT1G69830	ATTATCATTCCGAGATTGCTGC	RT-qPCR
AMY3-R	AT1G69830	CGGCTACAGACCAGTTTTGC	RT-qPCR
BAM1-F	AT3G23920	AACGAGAGAGCATACTTCAGC	RT-qPCR
BAM1-R	AT3G23920	CAATCGGTTTGCTTGGGTAG	RT-qPCR
BAM3-F	AT4G17090	AACGAGAGAGCATACTTCAGC	RT-qPCR
BAM3-R	AT4G17090	CAATCGGTTTGCTTGGGTAG	RT-qPCR
Actinas-F	Normalizador	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	RT-qPCR
Actinas-R	Normalizador	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC	RT-qPCR

## 3.2 MÉTODOS

Los métodos de cultivo de plantas en cámara, cortes y tinciones histológicas, cuantificación de haces vasculares, tratamiento con peso, evaluación de características fenotípicas, extracción y cuantificación de ARN total a partir de tejido vegetal y análisis de expresión por RT-qPCR que se emplean en este capítulo fueron descritos en la Sección 3.2 del Capítulo I.

Cabe destacar que en todos los experimentos de determinación de carbohidratos y cuantificación de transcritos posteriores al estrés mecánico, las muestras se recolectaron a mitad del período de luz, y los tratamientos siempre se iniciaron en el mismo punto del fotoperíodo para garantizar la estandarización de las respuestas.

### 3.2.1 Cuantificación de sustancias de reserva: lípidos y proteínas

La cuantificación de sustancias de reserva se hizo sobre semillas maduras, previamente cosechadas, limpias y puras.

#### Cuantificación de lípidos

El procedimiento se basa en el descrito por Siloto y col. (2006), con algunas modificaciones. 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:H<sub>2</sub>O (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 enérgica 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 triacilglicerolos) 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:H<sub>2</sub>O 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.

### **Cuantificación de proteínas**

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 µl 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<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 50mM, EDTA 10 mM, SDS 0,1 % (p/v), Tritón 1 % (v/v), β-mercaptoetanol 10 mM.

### **3.2.2 Cuantificación de glúcidos: almidón, glucosa y sacarosa**

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 µl de solución amortiguadora de homogeneización para carbohidratos y se incubó en hielo durante 30 min. Transcurrido ese tiempo, se agregaron 300 µl 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.

### **Cuantificación de glucosa y sacarosa**

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 µl 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.

El contenido de glucosa se determinó 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 Gluc1 ( $\mu\text{g}$  glucosa/mg muestra). En la muestra tratada con invertasa se determinó el contenido de glucosa Gluc2 ( $\mu\text{g}$  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 Gluc2- Gluc1.

### Cuantificación de almidón

La interfase insoluble, que contiene el almidón, se lavó con etanol absoluto y se secó en estufa a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante una h aproximadamente. Luego se resuspendió en  $250\ \mu\text{l}$  de hidróxido de sodio  $0,1\ \text{N}$ . Una vez que el precipitado se disolvió, se agregaron  $75\ \mu\text{l}$  de ácido acético  $0,5\ \text{N}$  ( $\text{pH}\ 5,1$ ). Finalmente se tomaron  $50\ \mu\text{l}$  y se trataron durante toda la noche a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  con  $2,5\ \text{U}$  de amilogucosidasa (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.

Finalmente, las cuantificaciones se expresaron como  $\mu\text{moles}$  de glucosa por mg de tejido.

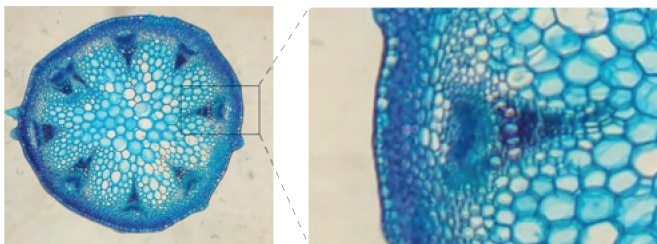
- Solución amortiguadora de homogeneización para carbohidratos: metanol  $62,5\ \%$  (v/v), cloroformo  $26,8\ \%$  (v/v), buffer fosfato de sodio  $5,4\ \text{mM}$  ( $\text{pH}\ 7,5$ ), EDTA  $0,1\ \text{mM}$ .

### 3.2.3 Ensayo de transporte por floema con la sonda CFDA

Se diluyó CFDA (diacetato de 5(6)-carboxifluoresceína,  $6\ \text{mg/ml}$  en acetona)  $1:10$  (v/v) en agua estéril inmediatamente antes del ensayo como fue informado por Jiang y col. (2019). Se cortaron muestras de silicuas, flores e inflorescencias y se colocaron con la base cortada en el fondo de un tubo de  $1,5\ \text{ml}$  para permitir la penetración de CFDA ( $6\ \mu\text{l/tubo}$ ). La incubación se realizó durante  $5-10\ \text{min}$ . La visualización se realizó con un láser a  $488\ \text{nm}$ , monitoreando la fluorescencia a  $500-566\ \text{nm}$ . El tejido teñido se fotografió utilizando una cámara Nikon D5300 montada sobre un microscopio óptico Eclipse E200 (Nikon).

### 3.2.4 Cuantificaciones de área de xilema, floema y cámbium

Se cuantificó el área de xilema, floema y cámbium de los cortes histológicos teñidos y fotografiados como se mencionó anteriormente utilizando el *software* ImageJ. Los tejidos de cada haz vascular fueron cuantificados de manera separada, realizando ampliaciones sobre las imágenes de cortes de tallos individuales como se ilustra en la Figura 23. Se utilizaron al menos 4 tallos distintos por cuantificación.



**Figura 23. Ilustración de un haz vascular individual dentro del tallo de Arabidopsis**

Las ampliaciones para las cuantificaciones se realizaron sobre cada uno de los haces que compone el tallo de al menos cuatro tallos separados.

### 3.2.5 Ensayos de estrés hídrico

Los ensayos de estrés hídrico se realizaron en cámaras de cultivo, con una densidad de siembra de una planta por maceta. Las plantas se dejaron crecer en condiciones normales de riego hasta que la vara floral principal alcanzó 4 cm de altura. En este momento se realizó el tratamiento de estrés mecánico de 48 h. Finalizado el tratamiento, todas las macetas fueron pesadas y llevadas a una capacidad de campo de 100 %. En este momento se suspendió el riego y se llevó a las plantas a un peso correspondiente a un 50 % de capacidad de capo, que se mantuvo hasta el final del ciclo de vida de las plantas, regando cada 48 h y tomando registro del consumo de agua en cada punto. Las plantas utilizadas como control se mantuvieron en 100 % de capacidad de campo durante todo el ciclo. Una vez alcanzada la senescencia, las plantas se embolsaron, las semillas se cosecharon y se cuantificó la producción total por planta.

### 3.2.6 Análisis de transcriptómica por secuenciación masiva de ARN

El ARN total se aisló según lo descrito en la Sección 3.2.14 del Capítulo I a partir de secciones de tallo correspondientes al primer entrenudo de plantas con una vara floral de 4 cm de altura sometidas o no al tratamiento mecánico durante un período de 6 h. *Novogene* (Sacramento, CA, EE. UU.) secuenció tres réplicas biológicas por genotipo. Las bibliotecas se secuenciaron en la plataforma *Illumina NovaSeq X-Plus*, generando lecturas de extremos emparejados de 150 pb con una profundidad mínima de 12 millones de lecturas por muestra. Las lecturas de RNA-seq se analizaron en la plataforma *Galaxy*. Se eliminaron las secuencias adaptadoras de las lecturas utilizando *Trimmomatic* (*Galaxy versión 0.39+galaxy2*). Las lecturas filtradas por calidad se alinearon con el genoma de referencia de *A. thaliana* (*TAIR10*) mediante *RNA STAR* (*Galaxy versión 2.7.11a+galaxy1*), empleando una longitud máxima de intrón de 10.000 pb y guiado por la anotación de genes y exones de *Araport V11*. Los recuentos de lecturas en cada gen se calcularon posteriormente utilizando *featureCounts* (*Galaxy versión 2.0.3+galaxy2*). El análisis de expresión diferencial se realizó con *edgeR* (*Galaxy versión 3.36.0+galaxy5*). Los archivos de cobertura *Bigwig* se generaron con *bamCoverage* (*Galaxy versión 3.5.4+galaxy0*) y posteriormente se utilizaron para la representación gráfica con *pyGenomeTracks* (*Galaxy versión 3.8+galaxy2*). El análisis de enriquecimiento funcional se realizó con *agriGO v2.0* (Tian y col., 2017). Se generaron gráficos *UpSet* para visualizar las intersecciones entre conjuntos de genes que responden al peso (Ko y col., 2004; este estudio), la hipergravedad (Tamaoki y col., 2014) o el tacto (Xu y col., 2019), utilizando la herramienta de diagramas *UpSet* (*Galaxy versión 0.6.5+galaxy2*). Los datos de secuenciación de ARN se depositaron en la base de datos *Gene Expression Omnibus* (GEO). Este análisis fue llevado a cabo por el Dr. Matías Capella del Instituto de Agrobiotecnología del Litoral.

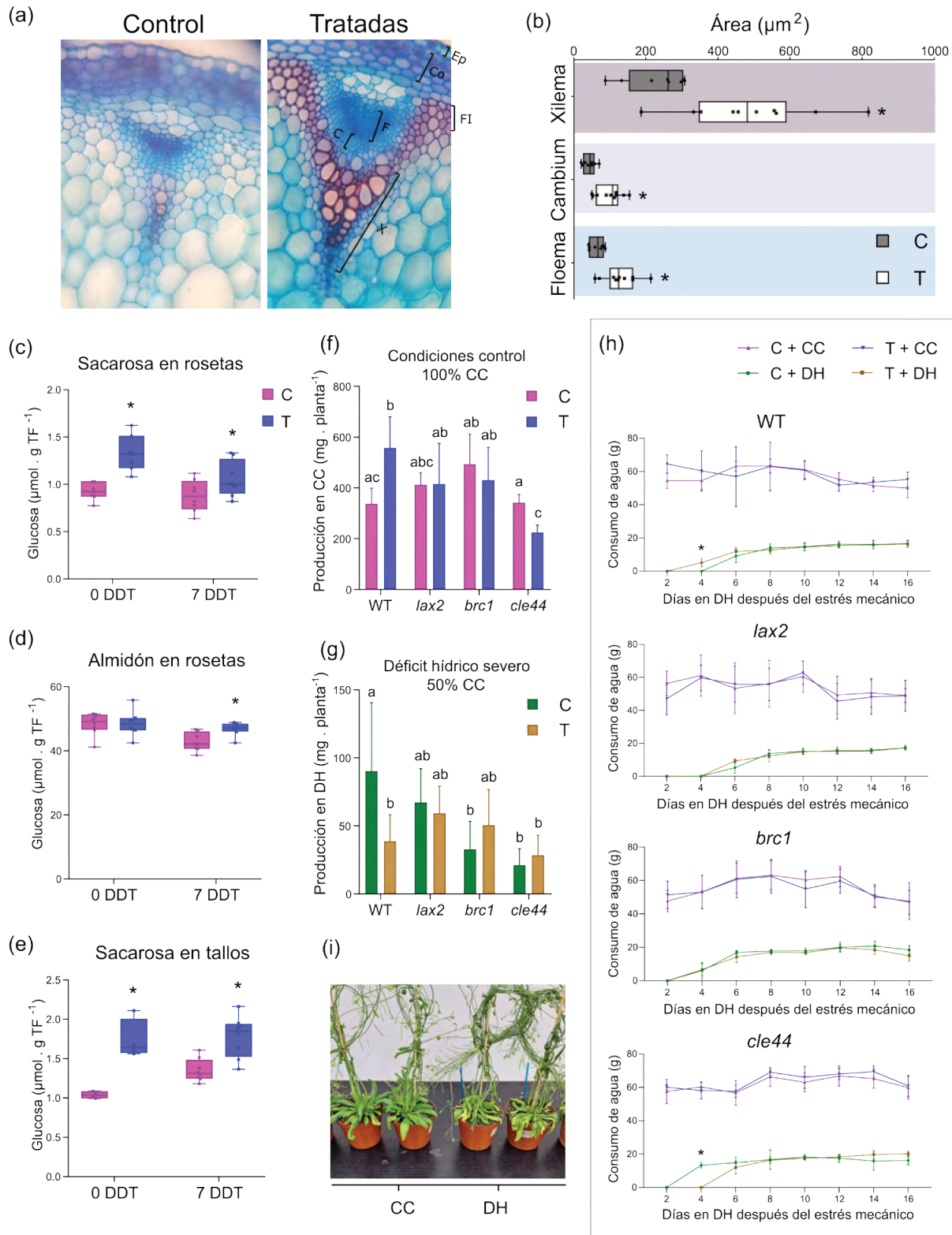
## 4. RESULTADOS

### 4.1 EL AUMENTO DEL TEJIDO VASCULAR Y LA MOVILIZACIÓN DE FOTOSINTATOS INDUCIDOS POR EL ESTRÉS MECÁNICO COMPROMETEN LA RESPUESTA DE LA PLANTA AL DÉFICIT HÍDRICO

Cabello y Chan (2019) describieron un aumento en el número total de haces vasculares dentro del tallo principal de plantas de *Arabidopsis* WT sometidas a 48 h de estrés mecánico, que pasó de 6-8 a 10-12 luego de finalizado el estímulo. Durante el desarrollo del Capítulo I hemos descrito como este tratamiento modifica la expresión de genes relacionados a la proliferación celular de tejido cambial y diferenciación a tejido vascular, lo que podría tener un impacto no sólo sobre el número total de haces vasculares sino también sobre el área del xilema, floema y cámbium vascular dentro de cada uno de estos haces.

Para comprobarlo, se cuantificaron estos parámetros en haces individuales provenientes de cortes histológicos de secciones transversales del primer entrenudo de tallos de plantas WT crecidas en condiciones control o sometidas a estrés mecánico. Las áreas cuantificadas se ilustran en la Figura 24a. Se observó un aumento significativo del área relativa de los tres tejidos cuantificados en las plantas tratadas. Sin embargo, todos los tejidos aumentaron proporcionalmente; el área del floema aumentó de 65 a 130  $\mu\text{m}^2$ , la del cámbium de 44 a 100  $\mu\text{m}^2$  y la de xilema de 230 a 487  $\mu\text{m}^2$  (Figura 24b). Esto indica que el estrés mecánico no solo genera duplicación de los haces vasculares, sino que también promueve una mayor proliferación y diferenciación celular dentro de cada haz individual.

A fin de evaluar si este aumento de los tejidos vasculares se acompañaba, o no, de un aumento en los carbohidratos sintetizados y/o transportados a los tejidos sumideros, cuantificamos los niveles de sacarosa y almidón en tallos y hojas de roseta. Apenas finalizó el período de estrés, las plantas tratadas presentaron mayor acumulación de sacarosa en hojas (Figura 24c) sin detrimento en la acumulación de almidón (Figura 24d). Al mismo tiempo, se vio incrementada la sacarosa transportada a través del tallo (Figura 24e). Cuando el análisis se repitió 7 días después de finalizado el tratamiento (7 DDT), se vio un incremento en los tres parámetros cuantificados en las plantas tratadas respecto de sus controles (Figura 24c-e). Este aumento de la sacarosa sin penalidad en los niveles de almidón es un indicador de un flujo total de carbono aumentado dentro de la planta.



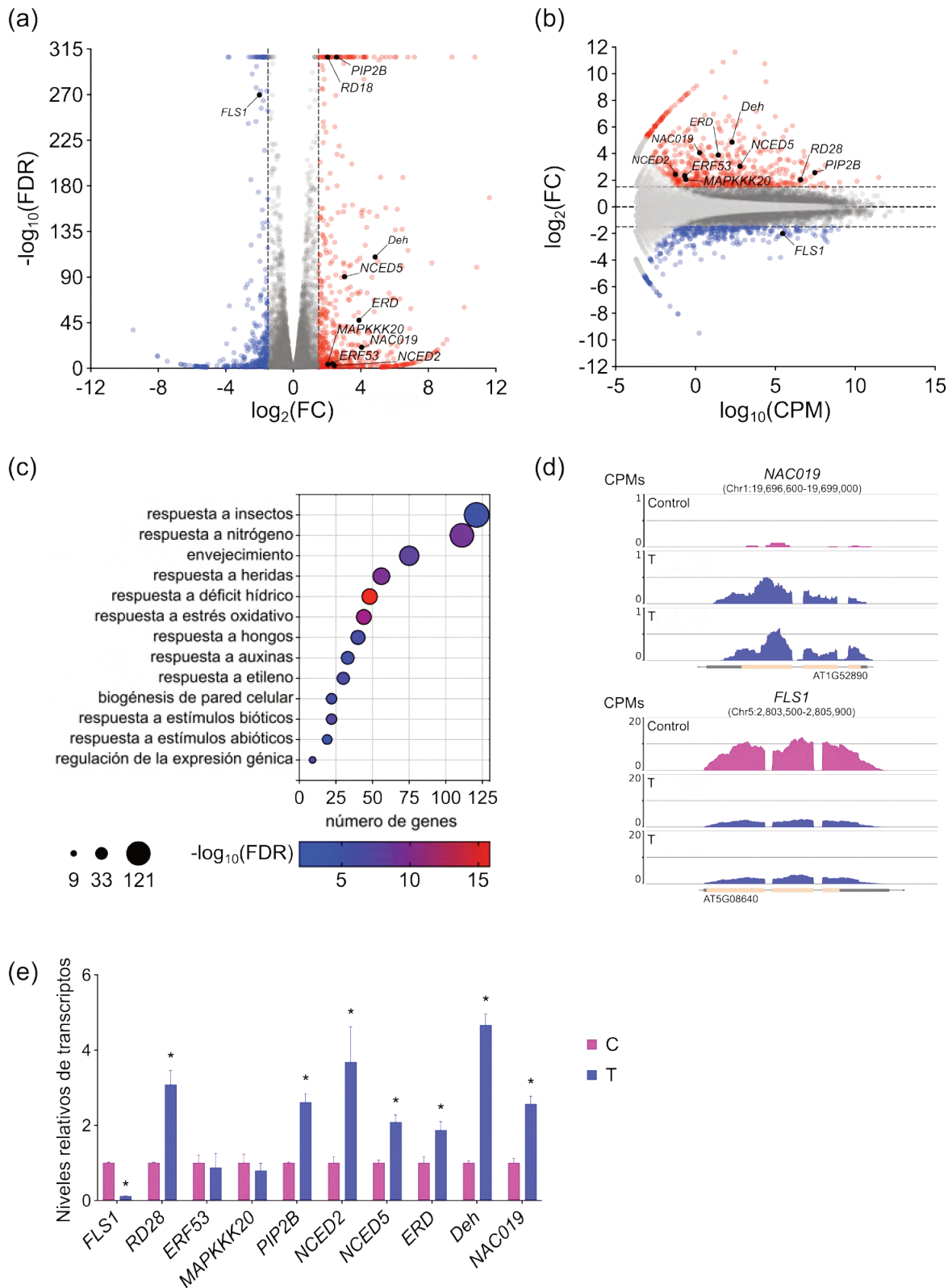
**Figura 24. El crecimiento vascular y el transporte de fotosintatos estimulados por estrés mecánico afectan la adaptación de las plantas al estrés hídrico**

(a) Imagen ilustrativa de un haz vascular del tallo de una planta control sometida a estrés mecánico. Se señalan las áreas que corresponden al xilema (X), cámbium (C), floema (F), córtex (Co), epidermis (Ep) y xilema interfascicular (FI). (b)

Cuantificación del área de xilema, floema y cámbium dentro de haces vasculares de plantas WT control y tratadas con peso. Cuantificación de (c) sacarosa y (d) almidón en hojas de rosetas y (e) sacarosa en tallos, medidas apenas finaliza el estrés mecánico (0 DDT) y 7 días después. (f) Producción de semillas de plantas WT, *lax2*, *brc1* y *cle44* crecidas con un riego correspondiente al 100 % de la capacidad de campo (CC) o (g) al 50 % CC expresados en mg de semillas por planta. (h) Consumo de agua de plantas en condiciones control (C + CC), estrés mecánico y 100 % CC (T + CC), plantas no sometidas a estrés mecánico, pero sí a déficit hídrico (C + DH) y plantas sometidas a ambos tipos de estrés (T + DH). (i) Foto ilustrativa de plantas WT con riego de 100 % CC (CC) y 50 % CC (DH) seis días después de iniciado el estrés hídrico. Las barras representan el SEM y letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias ( $P < 0,05$ , ANOVA de dos vías con prueba *post hoc* de *Tukey-Kramer*). Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ; prueba *t* de *Student*).

El tejido del xilema es el encargado de transportar agua y azúcares, factores implicados comúnmente en la respuesta al estrés hídrico. Debido a que el tratamiento con peso aumenta el área de este tejido, surge la hipótesis de que esta modificación podría tener un impacto sobre la respuesta de la planta a condiciones de sequía. Para evaluar esta posibilidad, una vez finalizado el estrés mecánico, se inició un período de déficit hídrico (DH) severo, llevando a las plantas a un 50 % de su capacidad de campo (CC). Las líneas mutantes *lax2*, *brc1* y *cle44*, carentes de genes clave para la respuesta vascular al estrés mecánico también fueron sometidas al estrés combinado. En condiciones control (100 % CC), las plantas WT presentaron su típico aumento de la producción de semillas luego del estrés mecánico, fenómeno que no se observó en ninguna de las líneas mutantes (Figura 24f). En las plantas que sufrieron el déficit hídrico, las líneas WT que habían pasado por el tratamiento con peso tuvieron una penalidad significativa en la producción final de semillas y no se observaron cambios con significado estadístico en las líneas mutantes (Figura 24g). En cuanto al consumo de agua durante el período de estrés con un 50 % de CC las plantas WT, que también recibieron estímulo mecánico, mostraron un mayor consumo de agua en los primeros días del estrés (Figura 24h, panel superior), ya que se veían considerablemente más deshidratadas que sus controles (Figura 24i). Lo opuesto se observó en las líneas mutantes *cle44*, ya que las líneas *cle44* en condiciones control parecieron deshidratarse más tempranamente que aquellas que sufrieron estrés mecánico previo (Figura 24h, panel inferior).

Con el objetivo de caracterizar la respuesta transcripcional temprana inducida por el estrés mecánico, se realizó un análisis de secuenciación masiva de ARN en tallos de plantas WT tratadas con peso por un período de 6 h. El análisis reveló cambios significativos en la expresión de 864 genes (cambio de  $\log_2 > 1,5$  o  $< -1,5$ ), entre los cuales 556 aumentaron su expresión y 308 la disminuyeron en las plantas tratadas con peso respecto a los controles sin tratar (Figura 25a, b).



**Figura 25. Cambios transcriptómicos en tallos de Arabidopsis luego de 6 h de estrés mecánico**

(a) *Volcano plot* de datos de RNA-seq de plantas sometidas a 6 h de tratamiento de peso versus control sin tratar. Los genes significativamente regulados al alza (rojo) y a la baja (azul) están resaltados ( $\log_2(\text{FC}) > 1,5$  o  $< -1,5$  con  $\text{FDR} <$

0,05, según lo determinado usando el marco *edgeR*). Las transcripciones de interés seleccionadas están etiquetadas en negro. (b) Gráfico MA que compara plantas tratadas con controles. El eje *x* muestra  $\log_2$  (CPM) y el eje *y* muestra  $\log_2$  (FC). Se muestran todos los genes detectados, con aquellos significativamente regulados al alza o a la baja resaltados en rojo y azul, respectivamente. Los genes que muestran  $FDR > 0,05$  se muestran en gris claro. (c) Análisis de enriquecimiento funcional de genes que se expresan de forma diferencial, como se define en el panel (a). El tamaño del punto refleja el número de genes en cada categoría y los valores *p* están codificados por colores. (d) Gráficas de cobertura que muestran los niveles de transcripción de *NAC019* y *FLS1* en plantas control (rosa) y tratadas (azul). Las lecturas se muestran como recuentos por millón (CPM) y las coordenadas genómicas se indican en pares de bases (pb). (e) Niveles relativos de transcripción de *FLS1*, *RD28*, *ERF53*, *MAPKKK20*, *PIP2B*, *NCED2*, *NCED5*, *ERD*, *Deh* y *NAC019* en plantas control (rosa) y tratadas (azul), cuantificados mediante RT-qPCR. Los datos se normalizaron a los niveles de transcripción de *ACTIN2/8* y se presentan en relación con los no tratados (control), cuyo valor se estableció en uno. Todos los datos representan la media  $\pm$  EEM de *n* = 5 réplicas biológicas independientes, con puntos de datos individuales mostrados. CPM, recuentos por millón; FC, cambio en el factor de multiplicación; FDR, tasa de falsos descubrimientos. El análisis de los datos y confección de la imagen fueron realizados con la ayuda del Dr. Matías Capella.

Para identificar las vías biológicas afectadas por el tratamiento de peso, realizamos un análisis de enriquecimiento de ontologías génicas (GO) de los genes diferencialmente expresados. Entre los términos GO enriquecidos, encontramos procesos funcionales que incluyen genes asociados con respuestas a insectos y compuestos nitrogenados, envejecimiento y respuestas a heridas, privación de agua y estrés oxidativo. Además, otras categorías significativamente enriquecidas incluyeron genes involucrados en la respuesta a auxinas y etileno, así como en la organización y biogénesis de la pared celular (Figura 25c,d). Con base en la respuesta diferencial de tolerancia a la sequía observada en las plantas tratadas con peso (Figura 24g, h, i), nos enfocamos en los genes involucrados en esta respuesta.

El análisis de términos GO reveló que cuarenta y tres genes, la mayoría de ellos inducidos, están implicados en la respuesta al déficit hídrico, lo que sugiere que el tratamiento mecánico podría impactar sobre la tolerancia a la sequía mediante la regulación diferencial de estos genes. En este contexto, se evaluó la expresión de *FLS1*, *RD28*, *ERF53*, *MAPKKK20*, *PIP2B*, *NCED2*, *NCED5*, *ERD*, *Deh* y *NAC019* en plantas tratadas y no tratadas con peso. *RD28*, *PIP2B*, *NCED2*, *NCED5*, *ERD*, *Deh* y *NAC019* mostraron un aumento de expresión, mientras que con *FLS1* se observó una disminución de la expresión. En consecuencia, la transcripción inversa seguida de PCR cuantitativa (RT-qPCR) confirmó que la mayoría de los genes seleccionados y relacionados con la sequía estaban regulados en las plantas tratadas con peso en comparación con los controles (Figura 25e), lo que sugiere que el tratamiento mecánico se asocia con la activación de una respuesta transcripcional relacionada con la sequía en momentos tempranos durante un déficit hídrico severo.

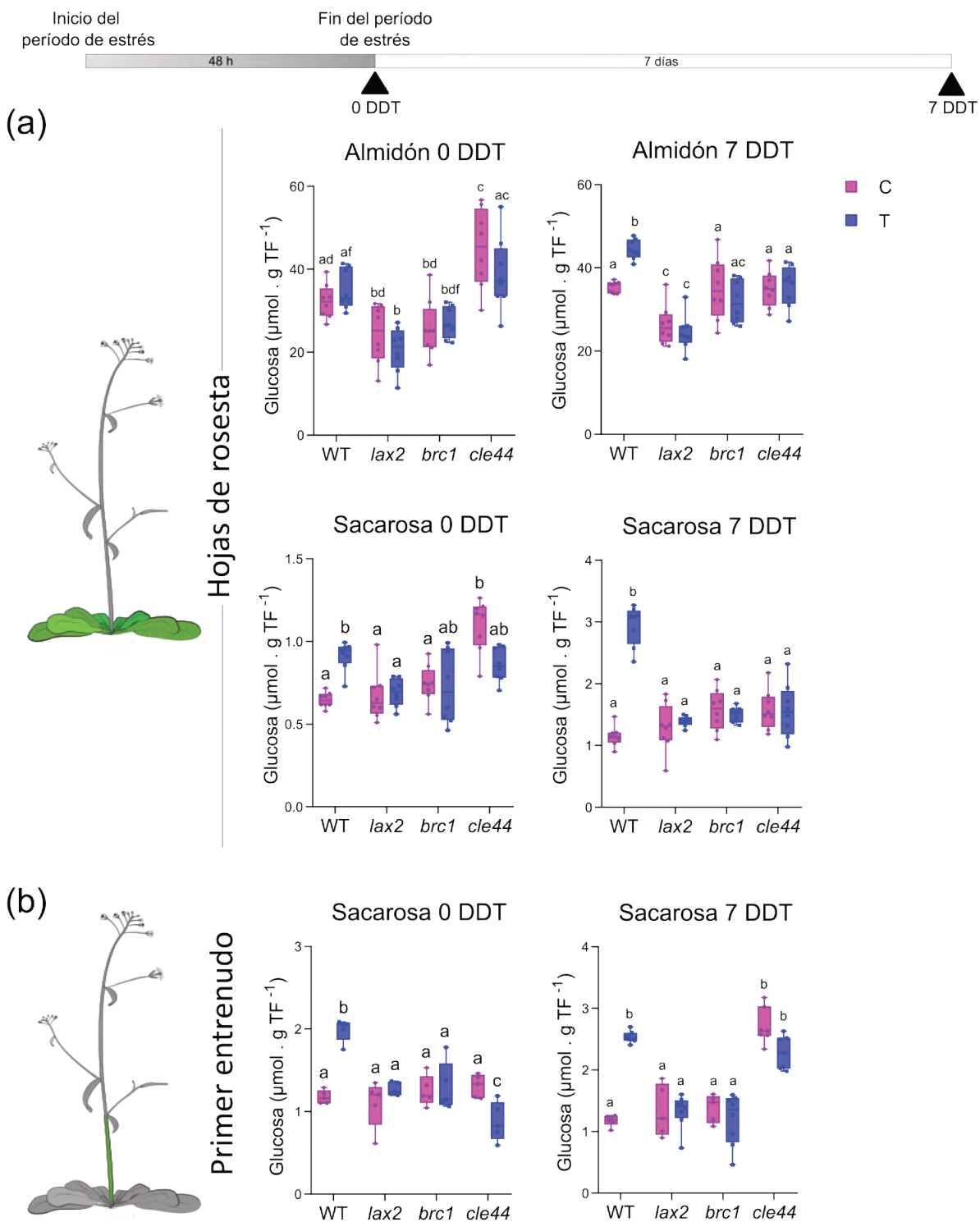
En conjunto, estos resultados indican que el estrés mecánico induce una reprogramación transcripcional temprana en tallos de plantas tratadas, caracterizada por la regulación coordinada de genes asociados a la respuesta al estrés, señalización hormonal y modelado de la pared celular.

#### **4.2 EL ESTRÉS MECÁNICO AUMENTA EL FLUJO DE CARBONO HACIA LA ACUMULACIÓN DE ALMIDÓN Y EL TRANSPORTE DE FOTOSINTATOS A TEJIDOS SUMIDERO**

Con el fin de determinar si el incremento en la acumulación de almidón y el transporte de azúcares observado en plantas WT sometidas a estrés mecánico (Figura 24c-e) depende de las modificaciones estructurales inducidas en el tallo por el tratamiento, se aplicó peso sobre líneas mutantes que no desarrollan dicho ensanchamiento ni aumento de haces vasculares, es decir, las mutantes *lax2*, *brc1* y *cle44* y se midieron las concentraciones de sacarosa y almidón inmediatamente después de las 48 h de tratamiento con peso (0 DDT) y luego de 7 días de finalizado (7 DDT), tanto en hojas de roseta como en el primer entrenudo.

En hojas de roseta, se observó una mayor acumulación de almidón en las plantas WT tratadas con peso siete días después del tratamiento (Figura 26a). Este aumento no se detectó en los demás genotipos analizados. No obstante, las plantas *cle44* presentaron, en condiciones control, un contenido de almidón superior al de sus correspondientes WT cuando las varas florales alcanzaban aproximadamente 4 cm de longitud, diferencia que desapareció siete días más tarde (Figura 26a). Las plantas WT tratadas también mostraron un incremento en los niveles de sacarosa en las hojas de rosetas en ambos tiempos.

Para evaluar el transporte a larga distancia de fotosintatos a través del tallo, se cuantificaron los niveles de sacarosa (principal azúcar transportada en *Arabidopsis*) en el primer entrenudo de tallos control y tratados. Este parámetro refleja el movimiento de sacarosa desde las hojas de roseta (tejido fuente) hacia los principales sumideros en este estadio de desarrollo: las inflorescencias y las silicuas en formación. Las plantas WT sometidas a estrés mecánico presentaron una mayor concentración de sacarosa transportada, tanto inmediatamente después del tratamiento como siete días más tarde (Figura 26b). En contraste, las mutantes *lax2* y *brc1* no mostraron variaciones, mientras que las plantas *cle44* tratadas exhibieron una disminución significativa en la cantidad de sacarosa transportada respecto a su control (Figura 26b).

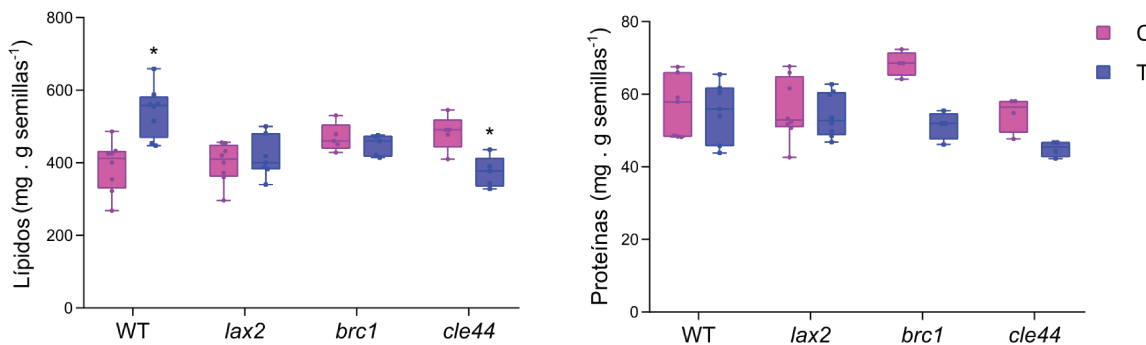


**Figura 26. El estrés mecánico aumenta la movilización de carbono hacia tejidos sumideros y acumulación de almidón en plantas que generan la respuesta de crecimiento radial del tallo**

Arriba se muestra el tiempo transcurrido tras el inicio del período de estrés mecánico y los momentos de toma de muestra. (a) Cuantificación de almidón y sacarosa en hojas de roseta, en plantas control y sometidas a tratamiento,

realizadas inmediatamente después de retirado el peso (0 DDT) y repetidas siete días después (7 DDT) en plantas WT, *lax2*, *brc1* y *cle44*. (b) Cuantificación de sacarosa en secciones de tallo del primer entrenudo en los mismos tiempos. Las cuantificaciones se expresaron como  $\mu$ moles de glucosa por g de tejido fresco (TF). Las barras representan el SEM y letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias ( $P < 0,05$ , ANOVA de dos vías con prueba *post hoc* de Tukey-Kramer).

Considerando estas alteraciones en el transporte fuente-sumidero y los resultados previos sobre el impacto del estrés mecánico en la producción de semillas, se analizaron los compuestos de reserva en semillas maduras provenientes de plantas tratadas. Las plantas WT produjeron semillas con un mayor contenido de lípidos luego del tratamiento con peso, mientras que en *cle44* se observó el efecto opuesto, con una reducción en el porcentaje de lípidos (Figura 27). Las líneas *lax2* y *brc1* no presentaron diferencias significativas respecto a su control. En cuanto al contenido proteico de las semillas, no se detectaron variaciones significativas en ninguno de los genotipos analizados (Figura 27), lo que sugiere que el aumento en el flujo de carbono hacia las semillas en formación se destina principalmente a la síntesis de ácidos grasos y no de proteínas.



**Figura 27. El estrés mecánico promueve la acumulación de lípidos en semillas sin alterar la cantidad de proteínas de reserva**

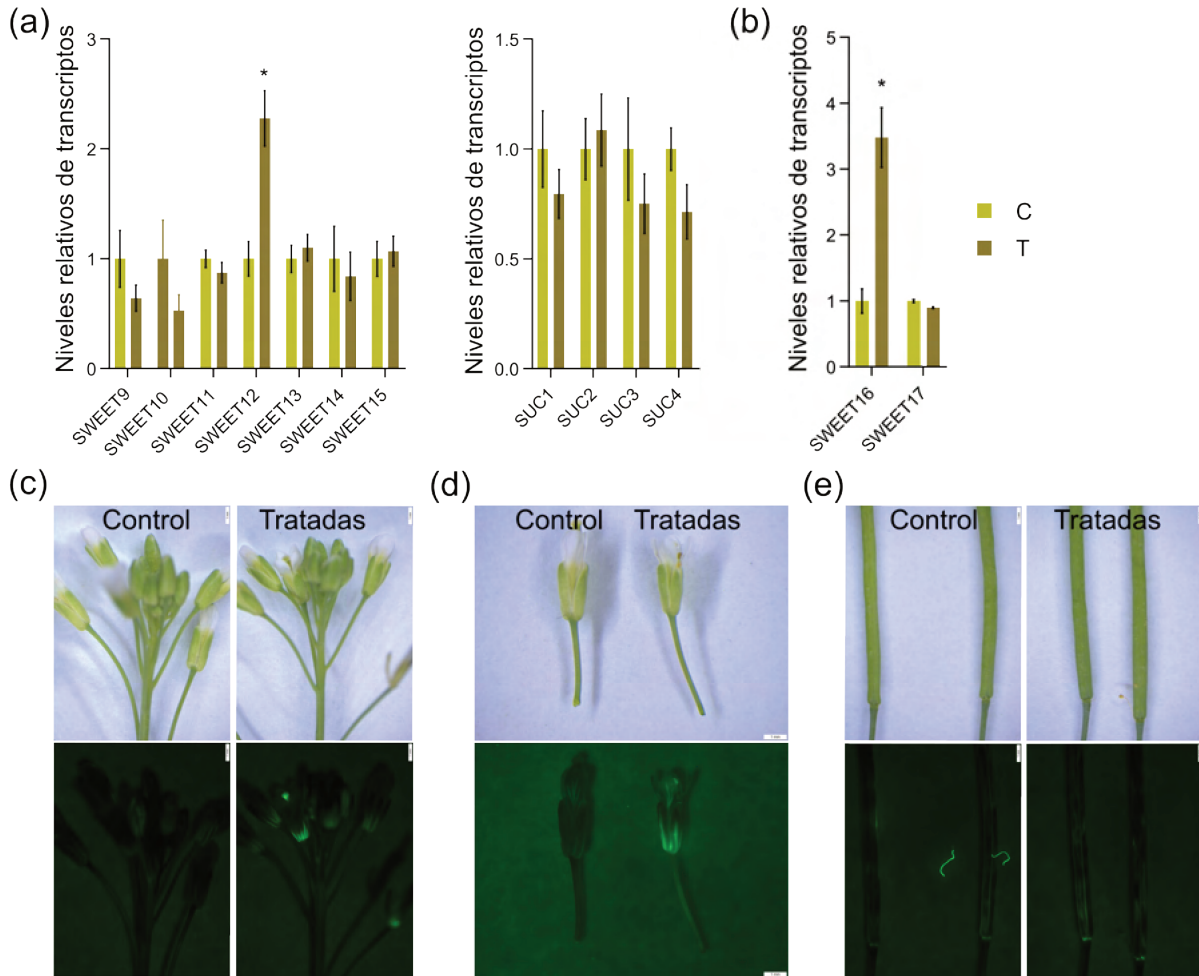
Cuantificación del contenido total de lípidos (izquierda) y proteínas (derecha) en semillas provenientes de plantas WT, *lax2*, *brc1* y *cle4* sometidas a estrés mecánico. Las medidas se expresaron en mg de metabolito por gramo de semilla. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ; prueba *t* de Student).

#### 4.3 EL ESTRÉS MECÁNICO ALTERA EL FLUJO DE CARBONO MEDIANTE LA INDUCCIÓN DE GENES *SWEET* Y *SUC*, EL AUMENTO DEL TRANSPORTE PASIVO Y LA MODIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE BIOSÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE ALMIDÓN

Los transportadores de sacarosa de las familias *SWEET* y *SUC* cumplen un papel central en la carga y descarga de sacarosa a través del floema, posibilitando su transporte a larga distancia hacia órganos

sumideros y su liberación en las cercanías de las células que la utilizan. Para analizar si el estrés mecánico modula estas rutas, se cuantificaron por RT-qPCR los niveles de transcritos de los genes *AtSUC1-4* y *AtSWEET9-17* en plantas WT control y tratadas durante 48 h (Figura 28a-b).

En hojas de roseta, el tratamiento con peso provocó un aumento significativo en la expresión de *AtSWEET12*, uno de los principales transportadores involucrados en la descarga de sacarosa desde las células del parénquima del floema hacia las células acompañantes (Figura 28a). En el tallo, por su parte, se detectó una inducción del transportador vacuolar *AtSWEET16* (Figura 28b).

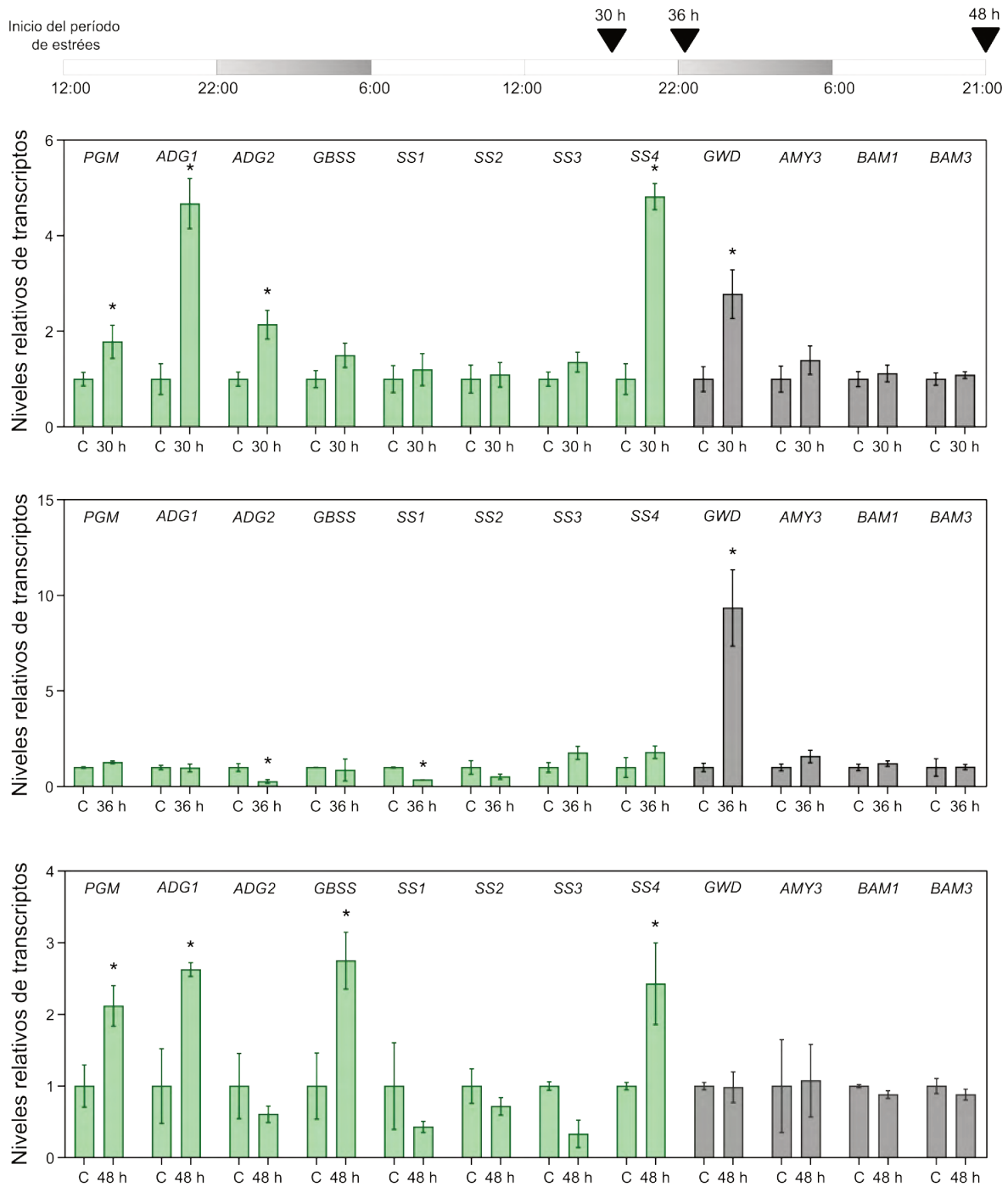


**Figura 28. El estrés mecánico altera la expresión de transportadores de sacarosa y favorece el transporte simplástico a través del floema**

Arriba, cuantificación de los niveles de transcritos de transportadores de sacarosa en plantas WT control y tratadas con peso realizado en (a) hojas de roseta y (b) tallos. Las barras representan el SEM y los asteriscos (\*) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ; prueba *t* de Student). Abajo, análisis del avance de la sonda fluorescente CFDA a través del floema de (c) inflorescencias, (d) flores y (e) silicuas de plantas control y tratadas. Arriba se observa la imagen en campo claro y abajo el mismo plano visto bajo microscopio de fluorescencia.

Para evaluar la velocidad del transporte simplástico a través del floema, se utilizó la sonda fluorescente CFDA, que ingresa a la célula a través de los plasmodesmos. Una vez dentro, es escindida por esterases, lo que la vuelve fluorescente y evita su salida del sistema vascular, permitiendo seguir su desplazamiento de manera análoga al de la sacarosa. La sonda CFDA se aplicó en la base cortada de silicuas, flores e inflorescencias de plantas WT sometidas a estrés mecánico. Cinco minutos después de la aplicación, se observó un desplazamiento significativamente mayor de la fluorescencia a través del floema en los tres tejidos analizados de plantas tratadas (Figura 28c-e), indicando un aumento en la velocidad de transporte.

Dado que el tratamiento mecánico también incrementa la acumulación de almidón transitorio en hojas de plantas WT, se cuantificaron los niveles de transcritos de genes relacionados con la biosíntesis y degradación de almidón para profundizar en la regulación de esta vía metabólica. Considerando que la acumulación de almidón se detecta inmediatamente después del estrés, la expresión de estos genes se midió mientras el tratamiento estaba en curso. Y como se sabe que su transcripción varía según el momento del fotoperíodo, se tomaron muestras a las 30 h (final del período de luz), 36 h (inicio del período oscuro) y 48 h (final del tratamiento, a mitad del período de luz) desde el inicio del estrés (Figura 29).



**Figura 29. Los transcritos de genes que codifican para enzimas clave en el metabolismo del almidón se ven alterados durante el estrés mecánico**

Arriba se muestra un esquema del tiempo transcurrido desde el inicio del período de estrés y los momentos de toma de muestra, marcando los períodos que corresponden a luz (blanco) u oscuridad (gris). Abajo, la cuantificación de los niveles de transcritos de enzimas de síntesis y degradación del almidón a las 30, 36 y 48 h luego de iniciado el estrés mecánico en plantas WT. Las barras verdes corresponden a genes involucrados en la síntesis y las grises en la degradación. Las barras representan el SEM y los asteriscos (\*) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ; prueba *t* de Student).

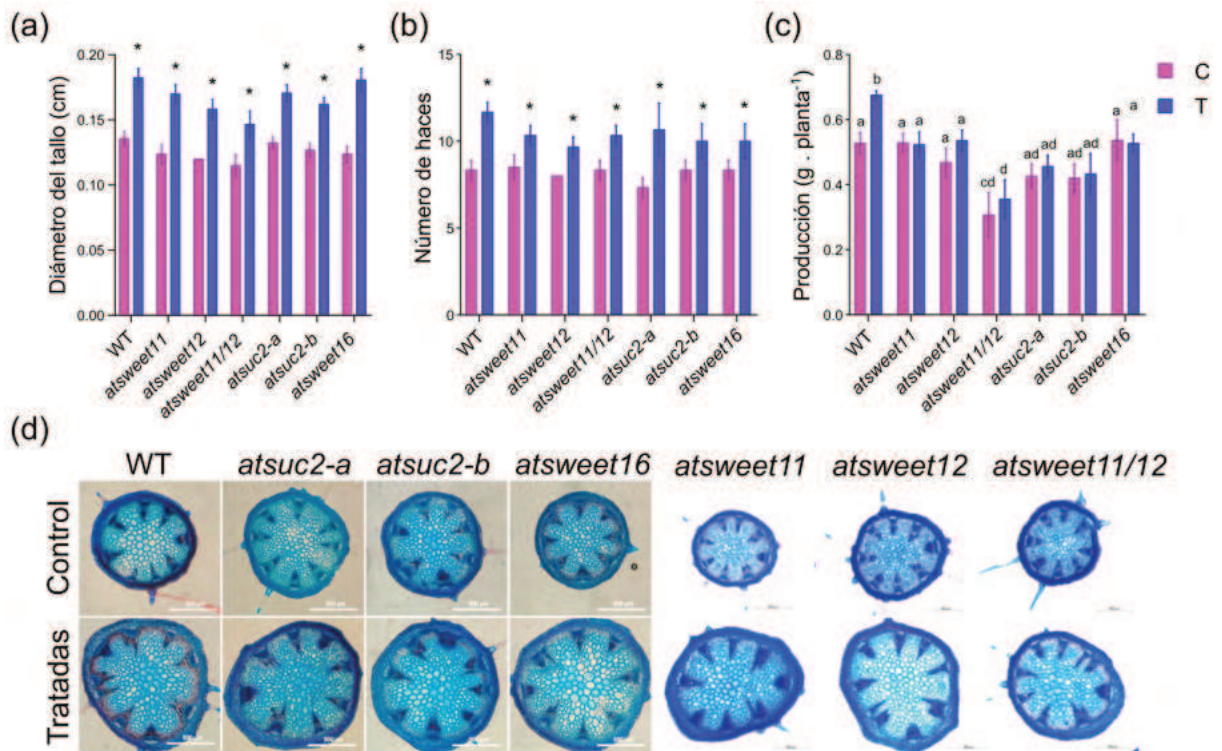
En la muestra recolectada a las 30 h, se observó una inducción significativa de genes asociados a la biosíntesis de almidón, incluyendo *PGM*, *ADG1*, *ADG2* y *SS4*. Al mismo tiempo, se observa un aumento de la expresión de *GWD*, que se mantiene a las 36 h, siendo el único gen de la vía de degradación del almidón que se encontró inducido en la muestra tomada durante el período de oscuridad (36 h). Finalmente, en la muestra recolectada a las 48 h las alteraciones en los niveles de transcritos fueron similares a los observados a las 30 h: se observó aumento en la expresión de *PGM*, *ADG1*, *GBSS* y *SS4*, sin cambios significativos en los genes relacionados a la degradación del almidón (Figura 29).

#### **4.4 LOS TRANSPORTADORES SUC2, SWEET11, SWEET12 Y SWEET16 SON CRUCIALES PARA EL INCREMENTO DE LA PRODUCCIÓN DE SEMILLAS EN RESPUESTA AL ESTRÉS MECÁNICO, PERO NO MEDIAN LA RESPUESTA DE AUMENTO VASCULAR**

Con el objetivo de profundizar en el papel de los transportadores de sacarosa durante la respuesta al tratamiento con peso, se analizaron las líneas mutantes *atsuc2*, *atsweet11*, *atsweet12*, *atsweet16* y la doble mutante *atsweet11/12*. Las mutantes *atsweet12* y *atsweet16* fueron seleccionadas debido a que mostraron alteraciones en sus niveles de transcritos frente al estrés mecánico, mientras que *atsuc2* y *atsweet11* se incluyeron por su expresión casi ubicua y su rol esencial en el transporte activo de sacarosa.

Para caracterizar la respuesta de estas líneas mencionadas al estrés mecánico, se evaluaron los parámetros clásicos asociados a este tipo de estímulo: el crecimiento radial del tallo, el número de haces vasculares y la producción de semillas. Tal como se muestra en la Figura 30 (a, b), todas las mutantes analizadas respondieron al tratamiento con un incremento significativo tanto en el diámetro del tallo como en el número de haces vasculares. Esto indica que estos genes no son imprescindibles para la respuesta morfológica asociada al tallo. Imágenes representativas de las secciones transversales de tallos de estas plantas se presentan en la Figura 30d.

La producción de semillas no se vio modificada en ninguna de las mutantes evaluadas luego del tratamiento mecánico, en comparación con sus respectivos controles (Figura 30c). Estos resultados sugieren que los transportadores de sacarosa analizados son determinantes para el aumento de la productividad inducido por estrés mecánico. En otras palabras, los fenotipos de ensanchamiento del tallo y aumento en el número de haces vasculares constituyen condiciones necesarias, pero no suficientes, para promover la mayor producción de semillas observada en plantas WT sometidas a peso.



**Figura 30. Los transportadores SUC2, SWEET11, SWEET12 y SWEET16 son esenciales para el aumento de la producción en respuesta al estímulo mecánico**

(a) Diámetro del primer entrenudo, (b) número de haces vasculares en el tallo y (c) producción de semillas de plantas mutantes y WT como control. El rendimiento se midió como peso de semilla (mg) por planta. (d) Secciones transversales del primer entrenudo. Barras = 500 μm. Las barras representan el SEM y los asteriscos (\*) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ; prueba *t* de Student) entre cada línea tratada y su respectivo control crecido en condiciones normales. En (c) las barras representan el SEM y letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias ( $P < 0,05$ , ANOVA de dos vías con prueba *post hoc* de Tukey-Kramer).

## 5. DISCUSIÓN

Los fenotipos morfológicos asociados a la respuesta al estímulo mecánico en *Arabidopsis* incluyen un marcado engrosamiento del tallo y un incremento del tejido vascular. En conjunto, estas dos características permiten a la planta alcanzar una mayor producción de semillas, ya que, como se observó en este trabajo, las mutantes que no desarrollan estas respuestas, como *cle44* o *brc1*, tampoco exhiben un aumento en la producción. Además, otras mutantes que muestran engrosamiento del tallo, pero no un incremento del tejido vascular, como *lax1* o *lax3*, demostraron que ninguna de estas características por sí sola es suficiente para aumentar el rendimiento, sino que ambas deben ocurrir simultáneamente (Cabello y Chan, 2019).

En este estudio se observó, además, que dicho incremento estructural se acompañó de un aumento en el área del xilema, del floema y del cámbium dentro de cada haz vascular, reflejando una mayor proliferación y diferenciación celular dentro del sistema conductor. Si bien estos tejidos son los principales responsables del transporte de agua y azúcares, los estudios previos en *Arabidopsis* se han centrado principalmente en el control genético del desarrollo vascular, sin evaluar su impacto funcional sobre la movilización de fotoasimilados ni sobre la producción de semillas. Sin embargo, en cultivos de interés agronómico sí existen evidencias que apoyan una relación directa entre la arquitectura vascular y la productividad: en maíz, las líneas con mayor número de haces vasculares en el entrenudo de la mazorca presentan un aumento en el número de granos por hilera (Wang y col., 2025), mientras que en arroz el tamaño floema del cuello de la panícula se asocia positivamente con el transporte de azúcares y con el rendimiento de grano (Zhai y col., 2023). De modo similar, en tomate, una planta que produce frutos, el aumento del área del floema en la mutante *hawaiian skirt* mejora la eficiencia del transporte de azúcares (Lombardo y col., 2021).

El incremento en la producción de semillas requiere una mayor movilización de fotosintatos hacia estos órganos sumidero. En especies que producen semillas o frutos, el rendimiento depende tanto de la eficiencia fotosintética como de la capacidad de translocar los productos fotosintéticos. En este contexto, la expansión vascular inducida por el estrés mecánico, junto con la acumulación simultánea de sacarosa y almidón, sugiere que la respuesta involucra no solo una reprogramación morfológica, sino también metabólica, orientada a optimizar la distribución del carbono dentro de la planta. Este efecto persiste incluso después de finalizado el estímulo, ya que las plantas tratadas mantienen niveles elevados de azúcares siete días más tarde.

La literatura disponible sobre la interacción entre desarrollo vascular y tolerancia al déficit hídrico en *Arabidopsis* es limitada, aunque en otras especies se han informado relaciones directas entre ambas variables. En papa, el silenciamiento del microARN *miR169a* promovió la formación de haces vasculares, incrementando el número de vasos de xilema en tallos y raíces, lo que resultó en una mayor eficiencia en el uso del agua y una mejor tolerancia a la sequía (Lei y col., 2025). En arroz, se demostró que la tolerancia a la sequía está relacionada con el grosor de los vasos del xilema y la morfología radicular (De Bauw y col., 2019). Asimismo, en *Arabidopsis*, la sobreexpresión del gen de girasol *HaHB11* incrementa el número de

haces vasculares y confiere tolerancia al estrés hídrico durante el estadio vegetativo, aunque genera una penalidad en la producción de semillas cuando el estrés se sostiene durante el estadio reproductivo (Cabello y col., 2017; Cabello y Chan, 2019).

Los resultados obtenidos aquí muestran que las plantas WT previamente sometidas al tratamiento con peso presentan una reducción significativa en la producción de semillas bajo estrés hídrico severo. Este detrimento se asoció directamente con los cambios morfológicos inducidos por el peso, ya que las mutantes que no responden al estímulo mecánico (*lax2*, *brc1*) tampoco mostraron variaciones en la producción de semillas. Es probable que el mayor tamaño y la expansión vascular de las plantas tratadas incrementen sus requerimientos hídricos, acelerando el consumo de agua durante el déficit, como se observó durante los primeros días del estrés hídrico, en que las plantas WT previamente tratadas con peso perdieron agua más rápido que sus controles. Curiosamente, el comportamiento opuesto se observó en *cle44*: bajo déficit hídrico, las plantas tratadas se deshidrataron más lentamente que sus controles, lo que sugiere que, en este genotipo, el tratamiento mecánico modula de manera diferente la dinámica de transporte de agua y azúcares, como se discutirá abajo. En conjunto, estos resultados indican que la expansión vascular inducida por el estrés mecánico representa una ventaja bajo condiciones óptimas, pero puede convertirse en una desventaja cuando la disponibilidad de agua es limitada.

Esta respuesta diferencial observada a nivel fisiológico bajo condiciones de estrés hídrico sugiere que la exposición previa al estímulo mecánico compromete la capacidad adaptativa posterior frente a la falta de agua. En este contexto, el análisis transcriptómico por secuenciación masiva de ARN reveló alteraciones significativas en la expresión de 43 genes directamente asociados a la respuesta a déficit hídrico y desecación, entre ellos *FLS1*, *RD28*, *ERF53*, *MAPKKK20*, *PIP2B*, *NCED2*, *NCED5*, *ERD*, *Deh* y *NAC019* (Tan y col., 2003; Tran y col., 2004; Alexandersson y col., 2005; Cheng y col., 2012; Frey y col., 2012; Puranik y col., 2012; Hickman y col., 2013; Hsieh y col., 2013; Moustafa y col., 2014; Nguyen y col., 2016; Wu y col., 2023; Vaseva y col., 2025).

Resulta particularmente relevante que, con excepción de *FLS1*, todos estos genes se encontraron inducidos en plantas tratadas con peso. Muchos de ellos codifican reguladores tempranos o componentes centrales de la respuesta al déficit hídrico, incluyendo factores de transcripción (*ERF53*, *NAC019*), quinasas de señalización (*MAPKKK20*), genes implicados en la biosíntesis de ABA (*NCED2*, *NCED5*) y proteínas asociadas al transporte de agua (*RD28*, *PIP2B*) o a la protección celular frente a la desecación (*ERD*, *Deh*) (Tan y col., 2003; Tran y col., 2004; Alexandersson y col., 2005; Frey y col., 2012; Hsieh y col., 2013; Wu y col., 2023). La activación de este conjunto de genes sugiere que el estímulo mecánico desencadena una reprogramación molecular del tallo que comparte elementos sustanciales con las respuestas clásicas al estrés hídrico.

Sin embargo, esta activación transcripcional no se traduce en una mejora funcional de la tolerancia a la sequía, sino que se asocia con una mayor sensibilidad al déficit hídrico. Este desacople entre la inducción de genes de respuesta a sequía y el desempeño fisiológico ha sido previamente descrito en plantas sometidas a

estreses combinados o secuenciales, donde la activación de programas moleculares no necesariamente conlleva una mejora adaptativa, sino que puede incluso generar efectos antagónicos sobre la tolerancia final (Mittler, 2006; Zandalinas y Mittler, 2022). En el caso particular de la combinación de estrés mecánico e hídrico, una explicación posible es que la expansión vascular inducida por el estímulo mecánico podría exacerbar la sensibilidad frente a la escasez de agua, tal como ha sido propuesto para otros contextos en los que el incremento del crecimiento del xilema o de la conductividad hidráulica se asocia a una mayor vulnerabilidad frente a sequía (Barry y col., 2025).

El aumento del número y tamaño de los haces vasculares en las plantas tratadas con peso parece favorecer la translocación de azúcares hacia las semillas, evidenciado por el incremento sostenido de sacarosa en tallos y el aumento de la cantidad y el contenido de lípidos en semillas. Este efecto coincide con observaciones previas en especies leñosas, en las que los estímulos mecánicos promueven la expansión del xilema y del floema y mejoran la eficiencia en el transporte de fotoasimilados (Telewski, 2006). En contraposición, las plantas *cle44* tratadas con peso presentaron una reducción tanto en la producción como en la calidad de las semillas, evidenciada por el menor contenido de lípidos, lo que sugiere un transporte ineficiente de carbono hacia los órganos sumidero.

En condiciones normales de crecimiento, las plantas mutantes *cle44* mostraron alteraciones transitorias en la acumulación de carbohidratos en hojas, con mayores niveles de almidón y sacarosa en estadios tempranos del desarrollo reproductivo, diferencias que se atenúan en etapas posteriores. Esta dinámica sugiere que la ausencia de CLE44 no compromete de manera permanente la homeostasis de carbono, sino que induce desajustes temporales que pueden ser compensados a lo largo del desarrollo. En este contexto, la capacidad de las plantas *cle44* para transportar sacarosa por el tallo en magnitudes comparables a las plantas WT cuando la vara floral alcanza los 4 cm indica que, bajo condiciones no estresantes, la señalización mediada por CLE44 no es estrictamente requerida para sostener el flujo fuente-sumidero. Esta observación es consistente con la existencia de mecanismos de redundancia funcional dentro de la familia CLE (Eitchells y Turner, 2010).

Sin embargo, el hecho de que plantas *cle44* con varas de mayor longitud (12 cm) presenten incluso mayores niveles de transporte de sacarosa que las plantas WT control, sin que ello se traduzca en un aumento en la producción o calidad de semillas, sugiere que el incremento del flujo de carbono, por sí solo, no es suficiente para mejorar la productividad. Estos resultados refuerzan la idea de que la eficiencia en la generación de semillas depende no solo de la cantidad de fotoasimilados transportados, sino también de una adecuada coordinación entre desarrollo vascular, temporización del transporte y capacidad de los órganos sumidero para utilizar esos recursos, como ha sido propuesto en estudios previos sobre asignación de carbono y rendimiento en *Arabidopsis* (Lemoine y col., 2013; Sonnewald y Fernie, 2018).

Este escenario cambia de manera sustancial bajo condiciones de estrés mecánico. En este contexto, CLE44 se vuelve un componente esencial para generar la respuesta vascular al peso y su ausencia conduce a un

desarrollo vascular incompleto que compromete la eficiencia del transporte de azúcares apenas finaliza el estrés mecánico. Mientras que en plantas WT el estímulo mecánico induce un aumento sostenido del transporte de sacarosa a través del tallo, que persiste incluso varios días después de finalizado el tratamiento, las plantas *cle44* no logran generar este incremento post-estrés. Esto indica que la actividad de CLE44 es crucial para sostener la respuesta de alta capacidad conductora inducida por el peso. Además, dado que las plantas mutantes *cle44* sometidas al estrés mecánico producen menos semillas y con menor contenido lipídico, al mismo tiempo que muestran altos niveles de sacarosa en tallo (si bien el contenido de sacarosa varía dentro del genotipo *cle44* sometida o no a estrés mecánico, en ambos casos es mayor que el que se encuentra en una WT), es posible que la alteración se manifieste en las etapas finales del transporte, desde el tallo hacia las silicuas o semillas. Fenómenos similares han sido informados por Spies y col., (2022) quienes encontraron que mutantes en *phl1* y *athb23* presentan una deficiencia general en el transporte de fotosintatos hacia los órganos reproductivos y por Chen y col., (2015) quienes observaron que la triple mutante *sweet11/12/15* presenta desarrollo embrionario retardado y bajo contenido de almidón y lípidos en semillas. Este parámetro fue evaluado aquí mediante el uso de la sonda fluorescente CFDA en inflorescencias, flores y silicuas de plantas WT previamente sometidas al estrés mecánico, observándose que este paso final de transporte de azúcares hacia los sumideros también se ve acelerado luego del tratamiento.

La mayor velocidad de transporte medida con la sonda fluorescente CFDA confirma que el estrés mecánico incrementa el flujo de sacarosa a través del floema, esto sumado a la inducción de los transportadores *AtSWEET12* en hojas y *AtSWEET16* en tallos refuerza la hipótesis de que el tratamiento promueve un estado de alta capacidad conductora y de movilización activa y pasiva del carbono, en concordancia con modelos que postulan que la eficiencia del transporte floemático depende tanto de la arquitectura del tejido como de la actividad de transportadores específicos (Lemoine y col., 2013).

Los transportadores SWEET y SUC desempeñan un papel central en la movilización de la sacarosa, permitiendo su carga, transporte y descarga a lo largo del floema (Chen y col., 2012; Ayre, 2011). En arroz, la expresión ectópica de *AtSUC2* incrementa el tamaño y peso de los granos (Wang y col., 2015), mientras que en *Arabidopsis*, plantas mutantes *atsuc2* presentan una fuerte acumulación de almidón y un transporte ineficiente hacia los sumideros (Gottwald y col., 2000; Srivastava y col., 2009), similar a lo que ocurre con la doble mutante *atsweet11/12* (Chen y col., 2012; Gebauer y col., 2017). Asimismo, *AtSUC5* es esencial para el desarrollo y acumulación de lípidos en semillas (Baud y col., 2005; Pommerrenig y col., 2013), y otros miembros de la familia (*AtSUC6–8*) se expresan en tejidos reproductivos y de transporte, aunque no se han encontrado fenotipos claros asociados a sus mutantes (Sauer y col., 2004; Rottmann y col., 2018). En diversos cultivos de interés agronómico, como arroz, maíz y soja, los SWEET también controlan la partición de carbono a semillas y determinan su composición de carbohidratos, proteínas y lípidos (Sosso y col., 2015; Ma y col., 2017; Yang y col., 2018; Wang y col., 2020; Fei y col., 2021).

En este contexto, la inducción de *AtSWEET12* bajo estrés mecánico resulta coherente con un estado de alta demanda metabólica, análogo al que ocurre durante la floración o la maduración de semillas (Durand y col.,

2016). Por su parte, *AtSWEET16*, localizado en vacuolas de tejido vascular de tallos, podría facilitar la redistribución interna de sacarosa necesaria para el crecimiento radial del tallo y la diferenciación del xilema (Klemens y col., 2013; Vu y col., 2020; Aubry y col., 2022).

El aumento concomitante en los niveles de almidón en hojas tratadas y la inducción de genes relacionados con su biosíntesis, como *PGM*, *ADG1*, *SS4*, *GBSS*, indican que el estrés mecánico también estimula la conversión transitoria de carbono fotosintético en reservas de almidón. Esta acumulación no ocurre a expensas del transporte, sino de forma complementaria, reflejando una sobreproducción de fotoasimilados que abastece tanto las reservas como los sumideros. Es posible que esta respuesta esté acompañada por un incremento en la fijación de carbono, como se ha informado que ocurre cuando una mayor demanda de un sumidero estimula la actividad fotosintética (Ainsworth y Bush, 2011).

Los estudios de mutaciones en las enzimas de síntesis o degradación de almidón refuerzan la relevancia de esta vía: *pgm* y *adg1* son carentes de almidón (Caspar y col., 1991; Zhai y col., 2017), *gbss* no produce amilosa y puede generar un aumento en la acumulación de lípidos en hojas cuando su mutación se combina con la sobreexpresión de factores lipogénicos (Zhai y col., 2021), mientras que *ss4* afecta el número y morfología de los gránulos de almidón, lo que impacta en el suministro nocturno de azúcares, influyendo indirectamente el crecimiento y la reserva de energía (Roldán y col., 2007). En contraposición, las plantas mutantes en enzimas de degradación como *bam3* acumulan grandes cantidades de almidón (Monroe y col., 2014). Además, cabe destacar que ciertos miembros de la familia BAM tienen funciones regulatorias nucleares, ya que poseen un dominio de unión al ADN de tipo BZR1, lo que las hace capaces de activar genes de respuesta a BRs. Los BRs son hormonas esenciales para la respuesta a estrés mecánico, como se describió en el Capítulo I, y esto podría implicar un sistema de retroalimentación positiva entre las vías de azúcares y de BRs que sería interesante explorar en el futuro (Reinhold y col., 2011; Monroe, 2020)

Finalmente, el análisis de las plantas mutantes *atsuc2*, *atsweet11*, *atsweet12*, *atsweet16* y *atsweet11/12* permitió establecer que los transportadores de sacarosa no son necesarios para la remodelación vascular inducida por peso, pero sí son determinantes para que el aumento del flujo de carbono se traduzca en una mayor producción de semillas. La línea doble mutante *atsweet11/12* presentó una producción de semillas significativamente menor que la WT ya en condiciones normales. Estudios previos han demostrado que la doble mutante *atsweet11/12* exhibe una reducción significativa en el peso seco total de semillas (~23 %) en comparación con plantas WT, sin reducción en el número de semillas por silicua, lo que indica un defecto en el llenado y nutrición de las semillas (Chen y col., 2015). En este contexto, la falta de respuesta al estrés mecánico podría explicarse, al menos en parte, por una limitación intrínseca en la capacidad de transporte de carbono. No obstante, la comparación con las mutantes simples *atsweet11* y *atsweet12*, que sí alcanzan niveles de producción normales en condiciones control, pero no responden al peso, señala que cuando la capacidad basal de producción se mantiene intacta estos transportadores son componentes clave para canalizar el incremento del flujo de carbono hacia una mayor producción de semillas.

En conjunto, los resultados de este capítulo demuestran que la respuesta al estrés mecánico en *Arabidopsis* no se limita a un refuerzo estructural del tallo, sino que implica una reconfiguración metabólica integral. En una primera etapa, el estímulo promueve la proliferación y diferenciación vascular, incremento del número de haces y de tejido vascular dentro de cada haz, acompañado de una inducción de genes de pared celular y respuesta hormonal. En paralelo, se activan los transportadores SWEET y SUC, que incrementan el flujo de sacarosa hacia los órganos sumidero, mientras que en los tejidos fuentes se ajusta la homeostasis del almidón para sostener el suministro continuo de carbono. La activación coordinada de las vías de transporte y metabolismo de carbohidratos incrementa el rendimiento bajo condiciones óptimas, pero compromete la tolerancia a la sequía.

## CAPÍTULO III

---

Control transcripcional del transporte de azúcares por AtHB5

# 1. INTRODUCCIÓN AL CAPÍTULO III

Hasta este punto se ha descrito cómo el estrés mecánico desencadena una compleja red de señales hormonales y moleculares que promueven el engrosamiento del tallo, el aumento del tejido vascular y una mayor asignación de carbono hacia los tejidos sumidero, lo que en conjunto conduce a un incremento en la producción de semillas. Al igual que ocurre frente a otros tipos de estrés o condiciones ambientales que demandan una reorganización del desarrollo vegetal, la respuesta al estrés mecánico debe estar finamente regulada. Esta regulación es esencial para que la planta pueda mantener su crecimiento y desarrollo normales, al tiempo que ajusta sus programas fisiológicos y morfológicos frente al estímulo mecánico.

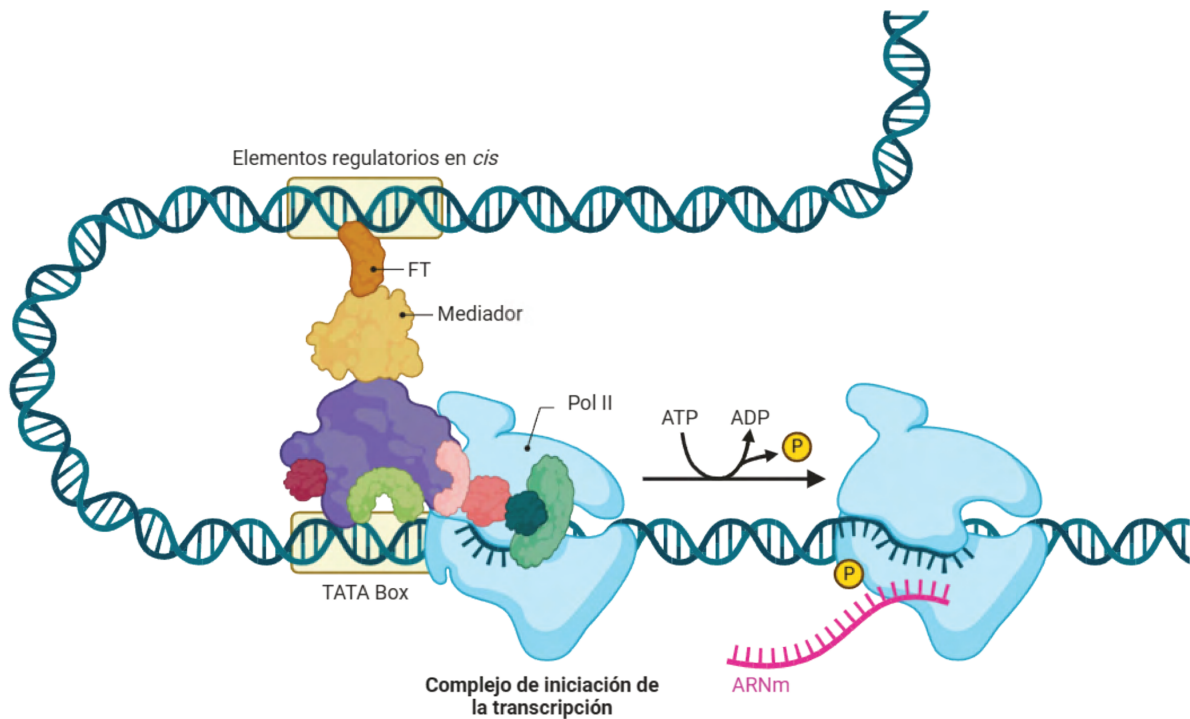
La regulación de la respuesta al estrés ocurre en múltiples niveles (epigenético, transcripcional, postraduccional y metabólico), siendo este último uno de los más determinantes. En las primeras etapas de la respuesta, los factores de transcripción actúan como nodos centrales en la red de señalización, modulando la expresión de genes blanco que codifican proteínas efectoras responsables de ejecutar los cambios estructurales y fisiológicos asociados al estímulo (Mitsuda y Ohme-Takagi, 2009). De esta forma, los factores de transcripción permiten una respuesta rápida y coordinada, integrando señales de diversa naturaleza.

En este Capítulo se explorará qué factores de transcripción podrían estar implicados en la respuesta al estrés mecánico, más allá de los ya identificados como reguladores directos de la proliferación y diferenciación vascular —por ejemplo, *WOX4* y *WOX14*— o de la señalización hormonal, como *BES1*, descritos en el Capítulo I. Es posible que existan factores de transcripción adicionales que actúen corriente arriba de estas rutas, o que participen en la integración de señales provenientes de otras vías clave aún no caracterizadas. Para entender como estos factores de transcripción ejercen su acción primero se debe conocer cómo ocurre en las plantas la regulación transcripcional de la expresión génica.

## 1.1 REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL

La regulación de la expresión génica constituye un eslabón central en los procesos que determinan el crecimiento, desarrollo y adaptación de las plantas a las condiciones ambientales. En las células vegetales, esta regulación se ejerce en distintos niveles: **pretranscripcional**, mediante cambios en la condensación de la cromatina y la metilación del ADN; **transcripcional**, que controla cuándo y con qué frecuencia se transcribe un gen (Figura 31); **postranscripcional**, mediante el procesamiento del ARN primario (corte, empalme, transporte y degradación mediada por microARNs); **traduccional**, a través de la selección de los ARNm que serán traducidos por los ribosomas; **postraduccional**, mediante la activación o inactivación selectiva de proteínas una vez sintetizadas; y por **silenciamiento génico**, cuando una secuencia de ácidos nucleicos es reprimida por moléculas de ARN homólogas de pequeño tamaño (Alberts, 2002; Baulcombe,

2004). Entre estos mecanismos, la regulación transcripcional se destaca como uno de los más relevantes, ya que permite una respuesta rápida y coordinada ante señales endógenas o ambientales.



**Figura 31. Maquinaria de regulación transcripcional en eucariotas**

Los elementos regulatorios en *cis* corresponden a secuencias del genoma capaces de unir los elementos en *trans*, como los factores de transcripción. Imagen creada con BioRedner.

La regulación transcripcional opera a través de cascadas jerárquicas de control, donde uno o pocos reguladores pueden inducir o reprimir la expresión de numerosos genes de una vía metabólica de forma orquestada. Este tipo de control amplifica la señal percibida, permitiendo que la planta ajuste su metabolismo y desarrollo con rapidez frente a las demandas de crecimiento o supervivencia. Como consecuencia, se producen modificaciones integrales en el transcriptoma, el proteoma y el metaboloma de las células afectadas (Aarts y Fiers, 2003). Un trabajo pionero de Riechmann y col. (2000) propuso que la regulación transcripcional podría desempeñar un papel aún más determinante en plantas que en animales, dado el alto porcentaje de genes codificantes de factores de transcripción en los genomas vegetales.

Los factores de transcripción son los componentes más representativos de la regulación transcripcional. Cumplen un rol esencial en la elaboración de los programas morfogénicos y en la respuesta a estímulos ambientales, y se considera que han sido fundamentales en la evolución adaptativa de las especies vegetales. Su acción se basa en la interacción específica con regiones promotoras de los genes diana, que contienen elementos reguladores en *cis*: secuencias no codificantes del ADN que modulan la transcripción de los genes cercanos. Estos elementos pueden ser basales, (como la *TATA box*, necesaria para el posicionamiento de la

ARN polimerasa II), o distales, responsables de aumentar o disminuir la tasa de transcripción en función de la unión de elementos reguladores en *trans*, es decir, proteínas codificadas en otras regiones del genoma (Buchanan y col., 2015).

Los factores de transcripción son justamente estos elementos en *trans*, capaces de reconocer y unirse a elementos *cis* específicos dentro del promotor. Las regiones promotoras suelen contener múltiples motivos *cis*, a menudo organizados en módulos regulatorios, que permiten la acción cooperativa de varios factores de transcripción simultáneamente (Buchanan y col., 2015). Esta cooperación posibilita una regulación fina y combinatoria de la expresión génica. Además, la actividad de los factores de transcripción puede ser modulada por proteínas coactivadoras o represoras, que facilitan su unión al ADN, promueven cambios conformacionales o bloquean su interacción con la maquinaria transcripcional (Aarts y Fiers, 2003).

Estructuralmente, los factores de transcripción presentan al menos dos dominios principales: un dominio de unión al ADN, que reconoce la secuencia específica del elemento *cis*, y un dominio de transactivación, encargado de interactuar con la maquinaria transcripcional para activar o reprimir la expresión génica. A menudo incluyen además un dominio de localización nuclear, que dirige su transporte al núcleo tras la síntesis en el citoplasma (Buchanan y col., 2015), y dominios de interacción proteína-proteína, que permiten la formación de complejos con otros factores de transcripción, incluso de diferentes familias, aumentando así la versatilidad y especificidad de la regulación transcripcional (Liu y col., 1999; Bornberg-Bauer y col., 2005).

En *Arabidopsis* se han identificado aproximadamente 1500 genes que codifican factores de transcripción, agrupados en distintas familias y subfamilias según la estructura de sus dominios de unión al ADN y otros motivos conservados (Riechmann y col., 2006). Entre ellas podemos ejemplificar a las siguientes:

- bZIP (*Basic Leucine Zipper*) implicados en dormancia de semillas, desarrollo foliar y floral, fotomorfogénesis y señalización hormonal (Jakoby y col., 2002).
- MYC y MYB, asociados al ritmo circadiano, respuesta a fitocromos, señalización del ácido abscísico (ABA) y metabolismo secundario (Ambawat y col., 2013).
- MADS-box, esenciales en la determinación de la identidad floral y meristemática (Honma y Goto, 2001).
- WRKY, involucrados en defensa ante patógenos (Rushton y col., 2010).
- HB (*Homeobox*), relacionados con respuestas a estrés biótico y abiótico (Perotti y col., 2017).
- TCP, reguladores de la proliferación celular y morfogénesis de hojas (Li, 2015).

Aunque también se debe destacar que cada vez se encuentran nuevas respuestas relacionadas a estos factores, por lo que su función no se limita solo a la ejemplificada arriba. La enorme diversidad de factores de transcripción y de elementos *cis* que regulan constituye la base de una complejidad combinatoria que permite controlar con precisión la expresión específica de genes y generar un amplio rango de fenotipos de desarrollo y respuesta ambiental. No sorprende, por tanto, que la manipulación experimental de factores de

transcripción produzca con frecuencia cambios fenotípicos drásticos, lo que los convierte en herramientas claves para la biotecnología vegetal (Tiessen y col., 2009). En este contexto, los factores de transcripción han sido empleados con éxito para modular vías de crecimiento, desarrollo y estrés, permitiendo incrementos en el flujo metabólico y mejoras en tolerancia ambiental, superiores a los obtenidos mediante la sobreexpresión de genes estructurales individuales (Levitus y col., 2010).

## 1.2 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE LA FAMILIA HD-ZIP I

Entre las familias de factores de transcripción mencionadas anteriormente, este capítulo se centrará en el estudio de un miembro perteneciente a la familia HD-Zip I (*HOMEODOMAIN-LEUCINE ZIPPER I*).

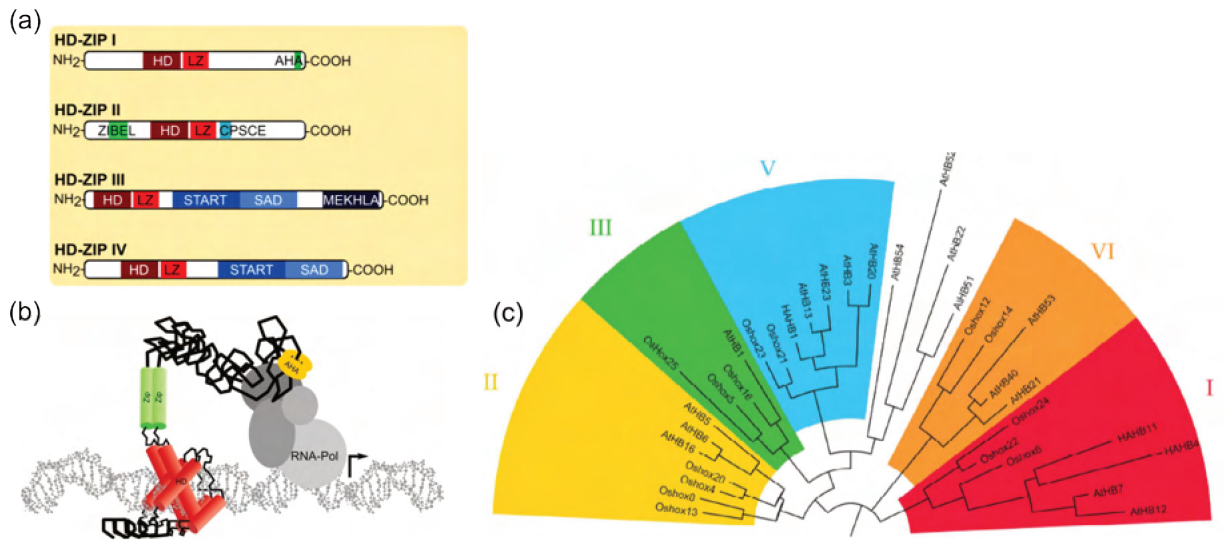
La superfamilia de los factores de transcripción con dominio HB está constituida por proteínas que contienen un homeodominio (HD), un motivo conservado presente en FTs de todos los organismos eucariotas. Este dominio fue caracterizado por primera vez en *Drosophila melanogaster* (Garber y col., 1983), organismo en el que se observó que algunos factores de transcripción que lo poseen ejercen efectos homeóticos, es decir, determinan la identidad de los órganos. En plantas, el primer factor de transcripción con dominio HD identificado fue *KNOTTED1* en maíz (*Zea mays*), descrito por Vollbrecht y col. (1991). Desde entonces, se ha identificado una amplia variedad de miembros de esta superfamilia distribuidos en numerosas especies vegetales.

La caja homeótica (*homeobox*) corresponde a una secuencia consenso de 180 pares de bases, que codifica un motivo de unos 60 aminoácidos capaz de plegarse en una estructura característica de unión al ADN. Este dominio permite el reconocimiento específico de secuencias reguladoras en regiones promotoras de otros genes, lo que le confiere su función como regulador transcripcional (Chan y col., 1998). Los factores de transcripción que contienen dominios HD participan en una gran diversidad de procesos del desarrollo y se agrupan en distintas familias. Entre ellas se destacan la familia WOX, cuyos miembros WOX4 y WOX14 han sido descritos en el Capítulo I por su rol en la proliferación cambial y desarrollo vascular; los ZF-HD, involucrados en el desarrollo floral (Tan e Irish, 2006); y los PHD-*finger*, asociados con la maduración del polen (Yang y col., 2003). Dentro de esta superfamilia, también encontramos a los HD-Zip, proteínas que presentan características únicas del reino vegetal.

Los HD-Zip se distinguen por la presencia de un motivo de cierre de leucinas (LZ, *leucine zipper*) adyacente al dominio HD, que actúa como módulo de dimerización entre distintas proteínas de la familia. La combinación de ambos dominios es exclusiva de las plantas (Schena y Davis, 1992), y su interacción es esencial para la unión al ADN: en ausencia del dominio LZ, los HD-Zip no pueden reconocer sus secuencias diana (Tron y col., 2004). De esta manera, los HD-Zip representan un grupo de factores de transcripción altamente especializado dentro de los vegetales.

Los HD-Zip se clasifican en cuatro subfamilias (I-IV), divididas según la conservación de secuencias, los motivos adicionales fuera del dominio HD-Zip y las rutas biológicas en las que participan (Capella y col., 2015; Figura 32a).

Los HD-Zip I cumplen funciones esenciales en el crecimiento y desarrollo vegetal, participando en la elongación de raíces y tallos, la morfología foliar, la ramificación del tallo floral, la floración y la formación de polen. Además, son actores claves en las respuestas a estreses abióticos como sequía, salinidad, altas temperaturas o estrés osmótico y en la señalización hormonal (Ariel y col., 2007; Perotti y col., 2017). Por otro lado, las proteínas HD-Zip II se asocian con la respuesta a la luz, la evasión de la sombra y la señalización por auxinas, las HD-Zip III regulan embriogénesis, polaridad foliar, iniciación de órganos laterales y mantenimiento meristemático, mientras que las HD-Zip IV están implicadas en la diferenciación epidérmica, formación de tricomas, acumulación de antocianinas y desarrollo radicular (Ariel y col., 2007).



**Figura 32. Subfamilias de factores de transcripción HD-Zip, representación esquemática de la estructura de los HD-Zip I y árbol filogenético de los HD-Zip I de *A. thaliana*, *Oryza sativa* y *Helianthus annuus*.**

(a) Distribución de los diferentes dominios dentro de la familia de genes que codifican para HD-Zip I. Figura modificada de Capella y col., 2015. (b) Representación esquemática de un factor de transcripción de la subfamilia HD-ZIP I y su interacción con el ADN. Tomado de Perotti y col., 2017. (c) 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.

Estos factores de transcripción contienen el motivo HD-Zip en la región central de la proteína y se unen como dímeros a la secuencia pseudopalindrómica CAAT(A/T)ATTG (Palena y col., 2001). El dominio de transactivación se localiza en la región C-terminal, responsable de interactuar con la maquinaria

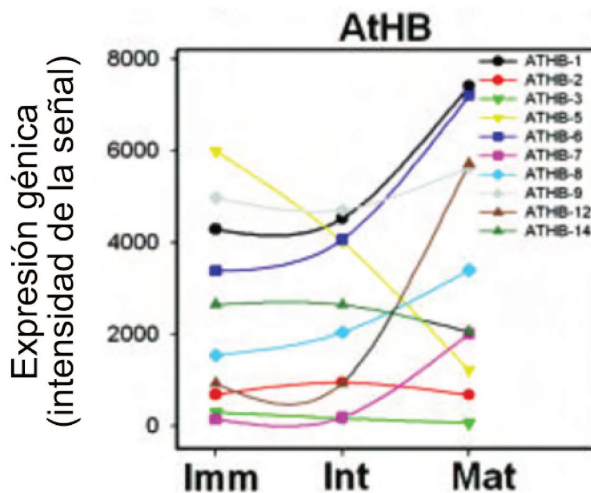
transcripcional basal, mientras que la región N-terminal presenta un brazo flexible que favorece la interacción con el ADN, incrementando su afinidad sin alterar la especificidad de unión (Figura 32b).

La subfamilia está compuesta por 17 miembros, separados en seis grupos (I–VI) definidos por la estructura génica, la distribución de motivos conservados y las relaciones evolutivas entre proteínas (Arce y col., 2011; Figura 32c). Estos genes han evolucionado mediante duplicaciones sucesivas, generando pares de parálogos que comparten la organización intrón/exón y regiones de alta identidad aminoacídica (Henriksson y col., 2005). Sin embargo, a pesar de su homología, las funciones de estos genes no siempre son redundantes y pueden diferenciarse en su rol durante el desarrollo (Ré y col., 2014; Ribone y col., 2016).

Entre los pares mejor caracterizados se encuentran *AtHB7* y *AtHB12*, dos genes parálogos que muestran una regulación recíproca y participan en la respuesta a ABA y déficit hídrico (Ré y col., 2014); *AtHB13* y *AtHB23*, también parálogos, con funciones diferenciadas durante el desarrollo (Ribone y col., 2015; Perotti y col., 2019), y *AtHB6* y *AtHB16*, los parálogos más cercanos a *AtHB5*, que conforman el grupo II dentro de la subfamilia HD-Zip I (Arce y col., 2011).

### 1.2.1 Factores de transcripción HD-Zip I involucrados en la respuesta al estrés mecánico

Un análisis de transcriptoma realizado por Ko y col. (2004), centrado en el crecimiento secundario del tallo floral de *Arabidopsis* inducido por peso, reveló cambios transcripcionales clave en la familia HD-Zip que integran la señal mecánica. El estudio mostró que, durante la transición del crecimiento primario al secundario, los genes de la subfamilia HD-Zip III, como *AtHB8*, aumentan sus niveles de transcritos en los tallos. Este aumento de expresión también se observó con HD-Zip de tipo I como *AtHB6*, *AtHB7* y *AtHB12*. Sorpresivamente, sólo uno de los HD-Zip medidos mostró disminución en los niveles de transcritos en respuesta a este tratamiento: *AtHB5*, un HD-Zip I.



**Figura 33. Variación de los niveles de expresión de genes que codifican factores de transcripción de la familia HD-Zip durante el desarrollo del crecimiento secundario de Arabidopsis**

Alteraciones en la transcripción de los HD-Zip en respuesta a un tratamiento mecánico que induce el crecimiento del tallo. Imm: tallos inmaduros (5 cm de altura), Int: tallos con maduración intermedia (10-15 cm) y Mat: tallos maduros (>25 cm). Cada gen se normalizó consigo mismo creando un control positivo sintético para ese gen y dividiendo todas las mediciones para ese gen por este control positivo. Figura modificada de Ko y col., 2004.

Existen también estudios de transcriptómica realizados sobre plantas sometidas a otros tipos de estrés mecánico, como hipergravedad (Tamaoki y col., 2014) o tacto (Xu y col., 2019). En el primer caso, se demostró que la hipergravedad altera los niveles de expresión de *AtHB12* y *AtHB53*, mientras que el tacto o “touching” hace lo mismo con *AtHB12* y *AtHB20*. Estos datos sugieren que los HD-Zip I podrían tener un papel relevante en la respuesta al estímulo mecánico.

### 1.3 AtHB5

Entre los HD-Zip I, *AtHB5* resultó particularmente interesante para este trabajo, dado que es el único miembro de la subfamilia que reduce sus niveles de transcripto en respuesta al crecimiento secundario inducido por peso (Ko y col., 2004). Este comportamiento diferencial lo posiciona como un candidato relevante para explorar posibles vínculos entre la regulación transcripcional y las respuestas estructurales del tallo.

*AtHB5* codifica una proteína de 312 aminoácidos perteneciente al grupo II dentro de la clasificación filogenética de los HD-Zip I, junto con *AtHB6* y *AtHB16*. Se ha demostrado que *AtHB5* es capaz de formar homo- y heterodímeros *in vitro* con otros miembros de la misma subfamilia (Johannesson y col., 2001), lo cual sugiere que puede participar en redes reguladoras complejas, probablemente redundantes o complementarias.

En *Arabidopsis*, la expresión de *AtHB5* se inicia tempranamente tras la germinación y se localiza en la región apical del hipocótilo y en la zona de transición entre éste y la raíz. En plántulas más desarrolladas, la expresión se detecta en pecíolos, cotiledones, hojas en desarrollo y en el tejido vascular, tanto de raíces primarias y laterales como de hojas caulinares, tallos, pedicelos florales y silicuas (Johannesson y col., 2003). El análisis del promotor de *AtHB5* frente a diferentes fitohormonas mostró que el ácido abscísico (ABA) es el único regulador capaz de alterar tanto el nivel global como el patrón espacial de su expresión (Johannesson y col., 2003).

Algunos ensayos funcionales demostraron que *AtHB5* actúa como un regulador positivo de la respuesta a ABA, aunque el tratamiento con la hormona reduce su propia expresión. Las líneas que sobreexpresan *AtHB5* presentan una sensibilidad aumentada al efecto inhibitorio del ABA sobre la germinación de semillas

y el crecimiento radicular, y el grado de sensibilidad se correlaciona con el nivel de expresión del factor de transcripción. Además, el gen *RABI8*, marcador clásico de respuesta a ABA, se encuentra inducido en dichas líneas, lo que sugiere que AtHB5 actúa corriente arriba de éste dentro de la vía de señalización, posiblemente en paralelo con otros HD-Zip I como *AtHB7* (Söderman y col., 1996; Johannesson y col., 2003). Por otro lado, la ausencia de fenotipos diferenciales evidentes en plantas mutantes *athb5* indica que su función podría ser parcialmente redundante con otros miembros del grupo, como *AtHB6* o *AtHB16* (Johannesson y col., 2003).

Asimismo, se ha reportado una conexión entre AtHB5 y la vía de señalización de auxinas, a través de la regulación negativa del gen *BDL* (*BODENLOS*), el cual participa en procesos fundamentales de desarrollo embrionario y postembrionario. AtHB5 puede unirse a una secuencia de 36 pb altamente conservada en el promotor de *BDL*, inhibiendo su expresión (De Smet y col., 2013). Dado que *BDL* pertenece a la familia de represores de los ARF (*AUXIN RESPONSE FACTORS*), cuya expresión es controlada por la concentración de auxina (De Smet y Jürgens, 2007; Lau y col., 2008; Vanneste y Friml, 2009), esta interacción sugiere que AtHB5 podría modular la sensibilidad a la hormona durante etapas específicas del desarrollo.

Más allá de los trabajos de Ko y col. (2004), no existen actualmente estudios adicionales que vinculen a *AtHB5* con la respuesta al estrés mecánico. No obstante, considerando su patrón de expresión en tejidos vasculares y relación con las auxinas, resulta razonable plantear la hipótesis de que este factor de transcripción podría desempeñar un papel en la coordinación de procesos asociados al engrosamiento del tallo, la proliferación vascular, la movilización diferencial de fotosintatos y, en última instancia, el incremento de la producción de semillas bajo condiciones de estrés mecánico. Además, el laboratorio donde se desarrolló este trabajo de Tesis posee una reconocida trayectoria en el estudio funcional de la familia HD-Zip I, disponiendo de un amplio conjunto de herramientas genéticas (líneas mutantes, sobreexpresantes y reporteras) que facilitaron el análisis detallado del rol de AtHB5 en la respuesta al estrés mecánico.

## 2. OBJETIVOS DEL CAPÍTULO III

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo principal de este Capítulo es profundizar en el rol de *AtHB5* en características vinculadas con la respuesta al estrés mecánico, para esto se propone:

1- Cuantificar los niveles de transcripto de *AtHB5* en respuesta al tratamiento mecánico mediante RT-qPCR y evaluar su patrón de expresión en condiciones normales utilizando líneas transgénicas transformadas con la región promotora de *AtHB5* que dirige la expresión del reportero *GUS*.

2- Evaluar la relación de este factor de transcripción con la movilización de fotosintatos de fuente a sumidero, evaluando niveles de transcripto de transportadores SUC y SWEET y de genes que codifican enzimas que participan en las vías de síntesis y degradación de sacarosa. También se evaluará el transporte simplástico a través del floema mediante uso de la sonda CFDA y cuantificaciones de fotoasimilados. Para esto se propone utilizar líneas mutantes *athb5* y líneas que sobreexpresan este factor de transcripción.

3-Analizar en las mismas líneas las características morfológicas asociadas al tallo, como diámetro, altura y cantidad de tejido vascular.

4-Evaluar si las líneas *athb5* y *35S:ATHB5* muestran diferencias en la producción de semillas, biomasa y acumulación de compuestos de reserva.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIALES

Las cepas bacterianas, especies vegetales, medios de cultivo y vectores empleados en este Capítulo se describen en la Sección 3.1 del Capítulo I.

##### 3.1.1 Plantas mutantes y transgénicas de *A. thaliana*

Las tres líneas mutantes en *AtHB5* (AT5G65310) fueron obtenidas de ABRC (*Arabidopsis Biological Resource Center*). Se nombraron como *athb5.1* (SALK\_015070c), *athb5.2* (SALK\_134509) y *athb5.3* (SALK\_078606)

Las tres líneas que sobreexpresan *AtHB5* (AT5.A, AT5.B y AT5.C) fueron generadas por Carlos Zapata. El cDNA de *AtHB5* se obtuvo mediante transcripción reversa RT-PCR a partir de ARN aislado de plántulas de *A. thaliana* (ecotipo Col-0) de 14 días de edad y se clonó en el plásmido pGEM®-T Easy (Promega). Luego, el DNA fue digerido con *BamHI/KpnI* e insertado directamente en el plásmido pBI121, previamente tratado con las mismas enzimas, reemplazando así el gen reportero *GUS*.

##### 3.1.2 Oligonucleótidos

En la Tabla 5 se muestra el nombre, la secuencia y uso dado a los oligonucleótidos utilizados.

**Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados**

Nombre	ID del locus	Secuencia 5' → 3'	Uso
prAtHB5-F	AT5G65310	CGCGGATCCCGATCTCAATTGTTCCGACCA	Clonado
prAtHB5-R	AT5G65310	CGCGGTACCGAGTAATGCATTTTCCGACCCA	Clonado
AtHB5-F	AT5G65310	CACGTGTGGCCGTAATCTTTT	RT-qPCR
AtHB5-R	AT5G65310	TCGTGCTCAGAATCTTTAACCCCT	RT-qPCR
Actinas-F	Normalizador	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	RT-qPCR
Actinas-R	Normalizador	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC	RT-qPCR

Los oligonucleótidos utilizados para la cuantificación de transcritos de genes SUC, SWEET y genes involucrados en las vías de síntesis y degradación de almidón se detallan en la Tabla 4.

### 3.1.3 Construcción genética *PrAtHB5:GUS*

*PrAtHB5:GUS*: se aisló un fragmento de 1531 pb correspondiente a la región promotora situada corriente arriba del sitio de inicio de transcripción a partir de ADN genómico de *A. thaliana*, utilizando oligonucleótidos específicos (Tabla 5). Este fragmento se clonó inicialmente en el plásmido pBluescript SK-. El ADN fue tratado con *HindIII* y *BamHI* e insertado finalmente en el vector pBI101.3. La clonación correcta fue verificada mediante secuenciación. La construcción final, que permitía la expresión del gen reportero *GUS* bajo el control del promotor de *AtHB5*, fue utilizada en los experimentos de transformación. Los constructos se emplearon para transformar células de *E. coli* DH5 $\alpha$ , a partir de las cuales se preparó el ADN plasmídico para su secuenciación (Macrogen, Corea). Una vez verificada la secuencia, se utilizó para transformar células de *A. tumefaciens* LBA4404.

## 3.2 MÉTODOS

Los métodos de clonado; transformación de bacterias; minipreparación de ADN plasmídico; transformación estable de plantas de *Arabidopsis* y selección de transformantes; condiciones de cultivo en cámara; extracción de ADN genómico de plantas y amplificación por PCR; análisis histoquímico de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa; cortes y tinciones histológicas; extracción y cuantificación de ARN total a partir de tejido vegetal; y análisis de expresión por RT-qPCR que se emplean en este Capítulo se describen en la Sección 3.2 del Capítulo I.

Los métodos de cuantificación de sustancias de reserva; cuantificación de glúcidos; ensayo de transporte por floema con la sonda CFDA; Cuantificaciones de área de los diferentes tejidos vasculares que se emplean en este Capítulo se describen en la Sección 3.2 del Capítulo II

### 3.2.1 Tinciones histológicas

Los tejidos de *Arabidopsis* indicados en cada figura se recolectaron a mitad del período de luz del fotoperiodo y se fijaron según el protocolo previamente descrito por Cabello y Chan (2019). Para la diferenciación entre xilema y floema se utilizó la tinción de Safranina-*FastGreen*. Tras eliminar la parafina con xileno al 100 % (v/v) durante 15 minutos a temperatura ambiente, las muestras se embebieron en una serie de soluciones de etanol (100 %, 96 % y 90 % (v/v)) y luego se transfirieron a safranina en etanol al 80 % (v/v) durante al menos 4 h. Se pasaron nuevamente por etanol (90 %, 96 % y 100 % (v/v)) y finalmente se tñieron con *FastGreen* en etanol al 100 % (v/v) durante 2 segundos. El exceso de colorante se eliminó lavando las secciones con etanol al 100 % (v/v) y las muestras se montaron en el portaobjetos con bálsamo de Canadá.

Para la tinción de lignina, la parafina se eliminó de las secciones con xileno al 100 % (v/v). Luego, las muestras se deshidrataron en etanol al 100 % (v/v) y se trataron con floroglucinol-HCl durante 30 minutos. Tras eliminar el exceso de reactivo, las secciones se montaron rápidamente en bálsamo de Canadá. La lignina se visualizó inmediatamente bajo un microscopio óptico.

Para la tinción GUS realizada sobre cortes histológicos la parafina se eliminó de las secciones mediante xileno al 100 % (v/v), se deshidrataron en etanol absoluto y se montaron en bálsamo de Canadá. En los casos en que la intensidad de la expresión era difícil de visualizar en secciones transversales de 10  $\mu\text{m}$ , se obtuvieron fotografías de las inclusiones de parafina completas.

### **3.2.2 Cuantificación del contenido de lignina**

La cuantificación de calosa se realizó según lo descrito por Yang y col., (2013).

El primer entrenado de plantas de 45 días de edad se trituró utilizando nitrógeno líquido. Se obtuvieron residuos de pared celular lavando secuencialmente 50 mg de los tallos molidos con 1 mL de etanol al 96 % (v/v) a 95 °C dos veces durante 30 min y agitando en vórtex con 1 ml de etanol al 70 % (v/v) dos veces durante 30 s. Los residuos resultantes se secaron durante toda la noche a 30 °C. Se utilizaron cinco miligramos para determinar el contenido de lignina mediante el método de bromuro de acetilo. Se incubó la muestra con 200  $\mu\text{l}$  de ácido acético glacial y bromuro de acetilo al 25 % (v/v) durante 2 h a 50°C. Luego se diluyeron a 1 ml con ácido acético glacial antes de centrifugarlos. En un tubo nuevo se mezclaron 100  $\mu\text{l}$  de la muestra con 500  $\mu\text{l}$  de ácido acético glacial y se añadieron 300  $\mu\text{l}$  de NaOH 0,3 M, seguido de 100  $\mu\text{l}$  de clorhidrato de hidroxilamina 0,5 M. Entre cada paso las muestras se agitaron vigorosamente. Se extrajo una alícuota de la muestra y se mezcló con 1 volumen de ácido acético glacial antes de medir la absorbancia a 280 nm. El coeficiente de absorción utilizado fue 15,69/l g/cm (Foster y col., 2010) y se ajustó a la longitud del paso óptico en función del volumen.

### **3.2.3 Observación de deposiciones de calosa en sistema vascular**

Para visualizar calosa se tomaron muestras de hojas. Se decoloraron con etanol 70 % (v/v) y se tiñeron con el colorante azul de anilina según el protocolo de Hauck y col., (2003). Las muestras se examinaron utilizando un microscopio de fluorescencia Leica DFC 7000 T.

### **3.2.4 Evaluación de parámetros fenotípicos**

Los parámetros de arquitectura de las plantas se registraron manualmente utilizando una regla o calibre. Para determinar el peso seco, el tejido fresco se mantuvo a 37 °C durante 4-6 días, hasta alcanzar un peso constante.

En el análisis de los parámetros de pecíolos y tallos se tomaron los pecíolos de la cuarta hoja de la roseta o las secciones del primer entrenudo, se cortaron y montaron en bloques de parafina siguiendo los procedimientos previamente descritos.

Para el análisis de parámetros de semillas, las plantas se cosecharon en estado de madurez, cuando las silicuas estaban completamente desarrolladas. Se pesaron 20 mg de semillas y luego se contaron manualmente ( $n = 10$ ). Para la determinación del área de las semillas ( $n = 20$ ), las semillas secas fueron fotografiadas y medidas utilizando el software *ImageJ* (*National Institutes of Health*, EE. UU.).

### **3.2.5 Cuantificación del largo de raíz principal y número de raíces secundarias**

Las semillas se sembraron en placas cuadradas de 12 cm conteniendo medio MS agar 0,5X suplementado o no con sacarosa al 4 % (p/v). Se sembraron sobre una única línea, espaciadas entre sí por 5 mm. Las placas se colocaron en posición vertical y las plantas fueron crecidas en las condiciones que indica cada figura. Posteriormente se tomaron fotografías utilizando una cámara *Coolpix 995* digital *Nikon* y se cuantificó el largo de las raíces utilizando el software *ImageJ* (*National Institutes of Health*, EEUU; <https://imagej.net/ij/index.html>). El mismo software se utilizó para contabilizar el número total de raíces laterales por planta.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 EL CAMBIO EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE *AtHB5* CONDUCE A ALTERACIONES EN CARACTERÍSTICAS ASOCIADAS AL ESTRÉS MECÁNICO

#### 4.1.1 Los HD-Zip I participan en la respuesta al estrés mecánico

El análisis fenotípico inicial de las líneas mutantes y sobreexpresantes de *AtHB5* reveló alteraciones en rasgos asociados a la respuesta característica al estrés mecánico, incluyendo el desarrollo vascular del tallo, la movilización de fotoasimilados y la producción de semillas. Estas observaciones sugirieron que este factor de transcripción podría intervenir en vías regulatorias vinculadas a la percepción y respuesta a estímulos mecánicos.

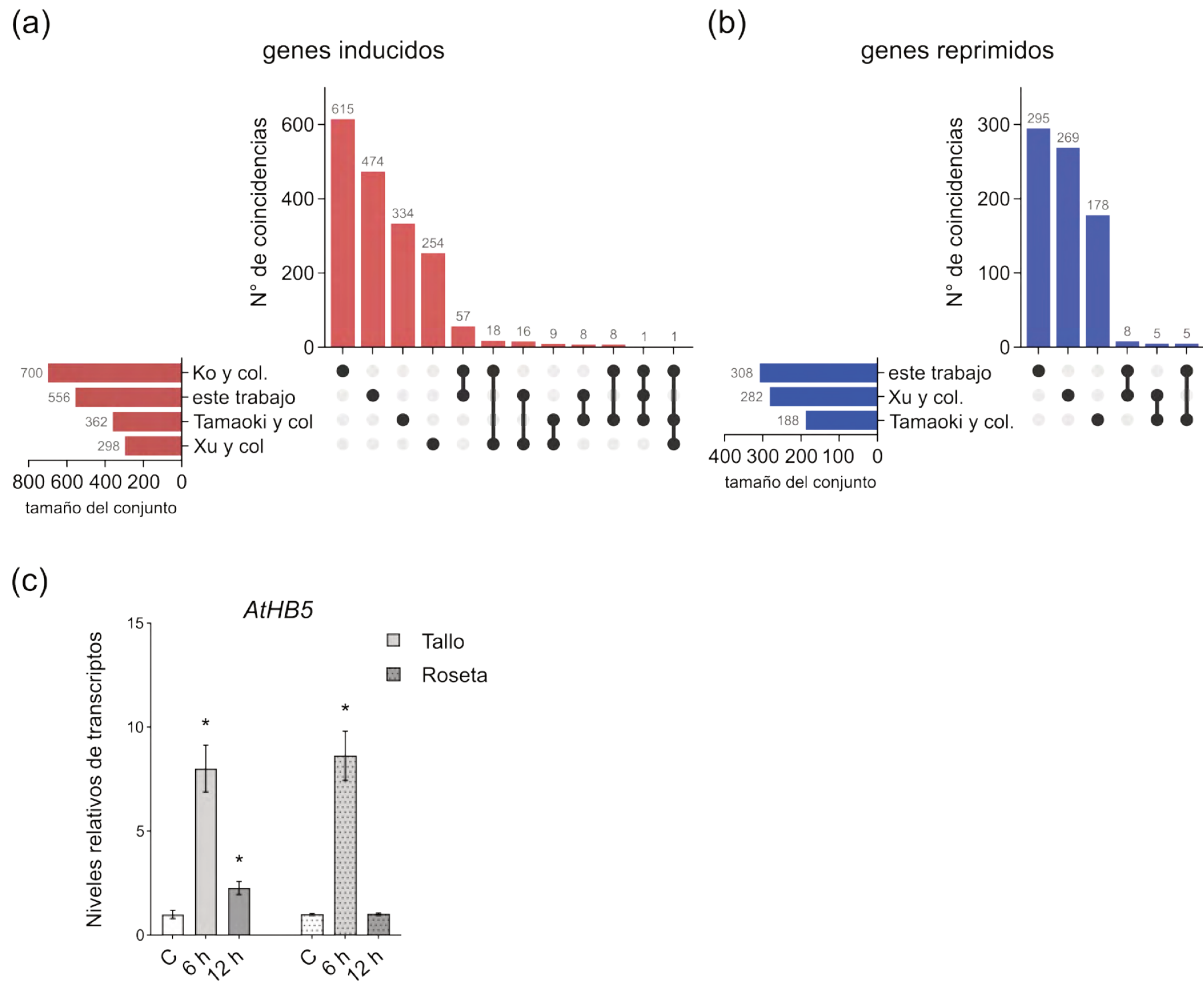
Estudios previos han indicado que cambios en los niveles de transcritos de distintos miembros de la familia HD-Zip I en respuesta a diferentes tipos de estímulos mecánicos, incluyendo la aplicación de peso sobre la vara floral (Ko y col., 2004), hipergravedad (Tamaoki y col., 2014) y estímulos por tacto (*touching*) (Xu y col., 2019). Estos antecedentes plantearon la pregunta de si distintos tipos de estrés mecánico activan redes genéticas comunes o si, por el contrario, inducen respuestas transcripcionales específicas.

Para abordar esta cuestión, se compararon los perfiles transcripcionales de plantas sometidas a estrés mecánico por peso (Ko y col., 2004; este trabajo), tacto (Xu y col., 2019) e hipergravedad (Tamaoki y col., 2014). Este análisis comparativo no reveló una superposición significativa entre los conjuntos de genes regulados al alza o a la baja en los distintos tratamientos, indicando que cada tipo de estímulo mecánico desencadena una respuesta molecular mayormente específica (Figura 34a, b).

No obstante, entre los pocos genes compartidos entre algunos de estos estudios se identificaron factores de transcripción, incluyendo miembros de la familia HD-Zip I. Por ejemplo, *AtHB12* aparece regulado tanto en condiciones de hipergravedad como de *touching* y de aplicación de peso en el estudio de Ko y col. (2004), mientras que *AtHB53* fue informado como diferencialmente expresado en los análisis de hipergravedad y peso. A pesar de ello, en el análisis de RNA-seq realizado en este trabajo sobre tallos de plantas sometidas a 6 h de estrés mecánico por peso, ningún miembro de la familia HD-Zip mostró cambios significativos en sus niveles de transcritos.

A pesar de ello, la cuantificación dirigida de los niveles de transcritos de *AtHB5* mediante RT-qPCR en tallos y rosetas de plantas tratadas con peso reveló diferencias significativas respecto de sus respectivos controles (Figura 34c). Esta variación en la expresión de *AtHB5* fue particularmente evidente a las 6 h de iniciado el tratamiento, lo que indica que este factor de transcripción responde tempranamente al estímulo mecánico. Estos resultados muestran que, si bien *AtHB5* no emerge como un gen diferencialmente expresado

en análisis transcriptómicos globales, presenta una regulación temprana en respuesta al estrés mecánico, consistente con un posible rol en las etapas iniciales de la respuesta.



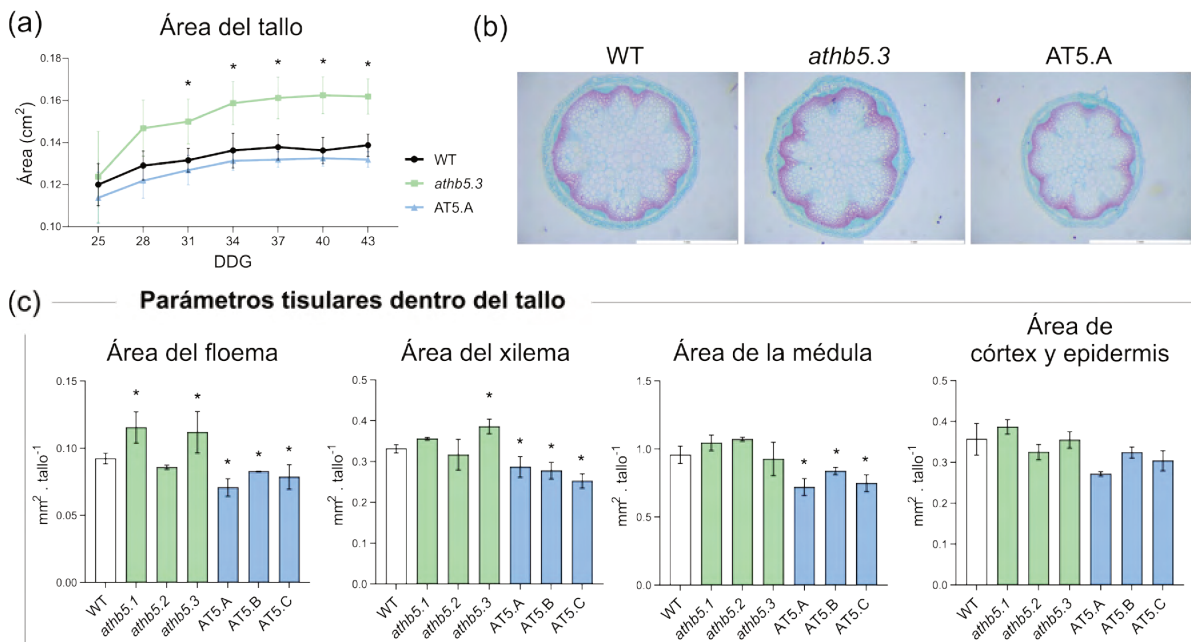
**Figura 34. Los niveles de expresión de *AtHB5* cambian luego de 6 h de estímulo mecánico**

(a) Gráfico de distorsión que muestra la superposición de genes significativamente regulados positivamente (a) y negativamente (b) en plantas tratadas con peso (Ko y col., 2004; este estudio), hipergravedad (Tamaoki y col., 2014) o contacto físico (Xu y col., 2019). (c) Niveles de transcritos de *AtHB5* analizados por RT-qPCR en muestras de tallos y rosetas de plantas WT sometidas o no a 6 y 12 h de estrés mecánico, utilizando los oligonucleótidos descritos en la Tabla 5. Las barras representan el SEM. No se observaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ; prueba *t* de Student).

#### 4.1.2 *ATHB5* actuaría como un regulador negativo del desarrollo vascular y del crecimiento radial del tallo

El rol de *AtHB5* en la regulación del crecimiento secundario del tallo, sugerido previamente por el análisis transcripcional realizado por Ko y col., (2004), fue examinado en profundidad utilizando tres líneas mutantes (*athb5.1*, *athb5.2* y *athb5.3*) y tres líneas de sobreexpresión (AT5.A, AT5.B y AT5.C).

El aumento del diámetro del tallo fue evaluado mediante la medición del área transversal total en cortes histológicos, analizados en plantas con edades comprendidas entre 25 y 43 días. Las líneas mutantes *athb5* mostraron un área de tallo significativamente mayor que las plantas WT, una diferencia que fue evidente a partir de los 31 días y se mantuvo hasta el final del ciclo de vida. El mismo análisis realizado sobre las líneas sobreexpresantes indicó que estas no presentaron diferencias significativas en el área total del tallo en comparación con la WT (Figura 35a). El análisis cuantitativo de los parámetros tisulares en secciones transversales de tallos teñidas con safranina-*FastGreen* (Figura 35b) proporcionó información más detallada sobre la composición de los haces vasculares. Las líneas AT5 mostraron una disminución significativa en las áreas de floema, xilema y médula. En contraste, las líneas mutantes *athb5* exhibieron el fenotipo opuesto, con un aumento en las áreas cuantificadas en al menos dos de las tres líneas independientes analizadas para los tejidos vasculares y la médula (Figura 35c). Es importante señalar que ninguna de las líneas estudiadas mostró alteraciones significativas en el área de la epidermis. Para facilitar la visualización de los datos principales, las Figuras 35a y 35b presentan imágenes representativas de una línea mutante y una línea sobreexpresante.



**Figura 35. La alteración en la expresión de *AtHB5* modifica el área del tallo y de los tejidos vasculares**

(a) Área del tallo principal en plantas mutantes *athb5.3*, sobreexpresante AT5.A y sus controles WT cuantificadas entre los 25 y 43 días después de la siembra. (b) Secciones transversales de tallo correspondientes al primer entrenudo de plantas con una altura de 10 cm, teñidas con safranina-*FastGreen* para visualizar los tejidos de xilema (rosa) y floema. Barras = 1 mm. (c) Cuantificación de las áreas correspondientes a xilema, floema, médula y epidermis dentro del tallo, realizada mediante el software *ImageJ*. Las barras representan el error estándar y los asteriscos indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ; prueba *t* de Student).

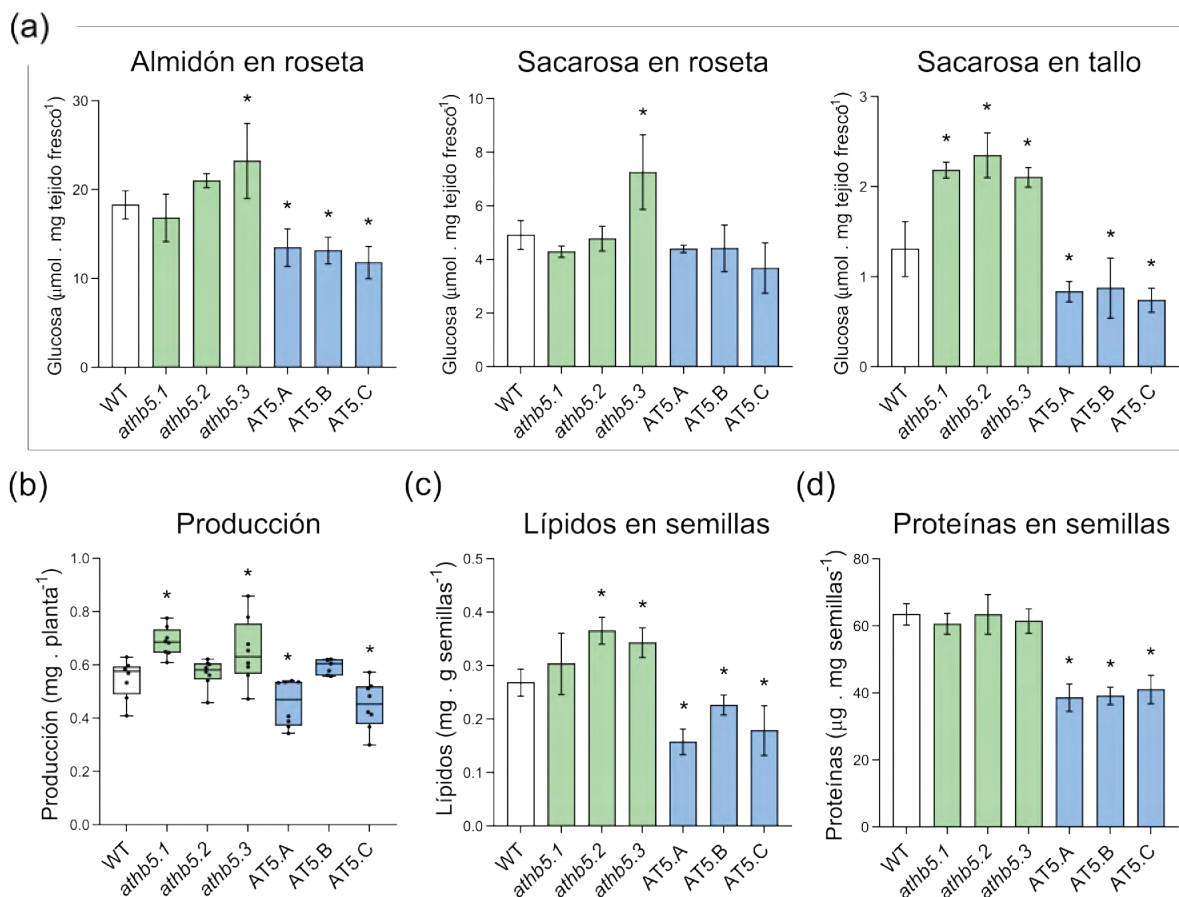
En conjunto, estos resultados demuestran que AtHB5 actúa como un modulador negativo del crecimiento del tallo y de la formación de tejido vascular, ya que la pérdida de función aumenta estas características, mientras que la sobreexpresión tiende a reducirlas.

#### **4.1.3 Las alteraciones en los niveles de *AtHB5* afectan el transporte de carbohidratos y la acumulación de compuestos de reserva en semillas**

El transporte de fotosintatos desde los tejidos fuente hacia los tejidos sumidero es una de las características asociadas al estrés mecánico, esencial tanto para el aumento de la producción de semillas como para el enriquecimiento en compuestos de reserva. Este proceso involucra múltiples etapas, que incluyen la regulación de los niveles de transcritos de transportadores de sacarosa de las familias SWEET y SUC, responsables de la carga y descarga activa de sacarosa hacia y desde el floema, respectivamente; el transporte pasivo a larga distancia a través del floema del tallo; y la modulación de la homeostasis del almidón transitorio en las hojas.

Con el objetivo de comprender el impacto de AtHB5 en esta partición de carbono, se cuantificaron las concentraciones de almidón y sacarosa en distintos órganos durante la etapa reproductiva. Las plantas crecieron bajo un fotoperíodo de día largo y las muestras de rosetas y tallos se recolectaron al mediodía. La concentración de almidón fue menor en las rosetas de las plantas AT5 en comparación con las plantas WT, mientras que en las mutantes *athb5* se observó la tendencia opuesta (Figura 36a). Por su parte, la concentración de sacarosa fue mayor en los tallos de las mutantes *athb5* respecto al de las plantas WT (Figura 36a). Estos resultados indican que AtHB5 actúa como un regulador negativo de la acumulación de almidón y de sacarosa en las hojas.

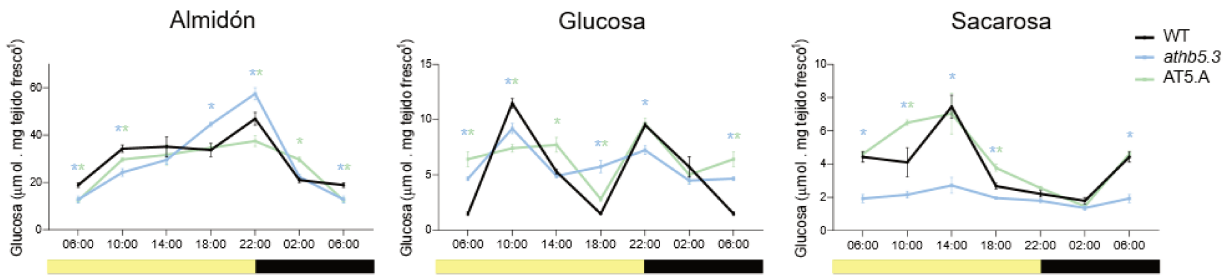
Como consecuencia de estas alteraciones en el transporte, y de manera análoga a lo observado bajo estrés mecánico, las plantas mutantes *athb5* presentaron un mayor rendimiento de semillas en comparación con las plantas WT, lo que indica que AtHB5 funciona como un modulador negativo de la producción de semillas (Figura 36b). Bajo la premisa de que el transporte de carbohidratos desde los tejidos fuente hacia los sumidero está reducido en las plantas AT5, afectando así la calidad de las semillas, se determinaron las concentraciones de lípidos y proteínas en semillas maduras. Los resultados mostraron que tanto los lípidos como las proteínas disminuyeron en las líneas sobreexpresantes, mientras que en las mutantes *athb5* los lípidos, pero no las proteínas, incrementaron significativamente su concentración (Figura 36c, d).



**Figura 36. AtHB5 regula negativamente el transporte de fotosintatos, impactando en la producción de semillas y acumulación de compuestos de reserva**

(a) Concentraciones de almidón y sacarosa en rosetas y tallos de plantas de 30 días cultivadas en condiciones normales de crecimiento. La toma de muestra se realizó a mitad del período de luz. (b) Producción de semillas. (c) Contenido de lípidos y (d) proteínas en semillas maduras. Las barras representan el error estándar. Las diferencias significativas se indican con asteriscos (\*  $P < 0,05$ ; prueba  $t$  de Student).

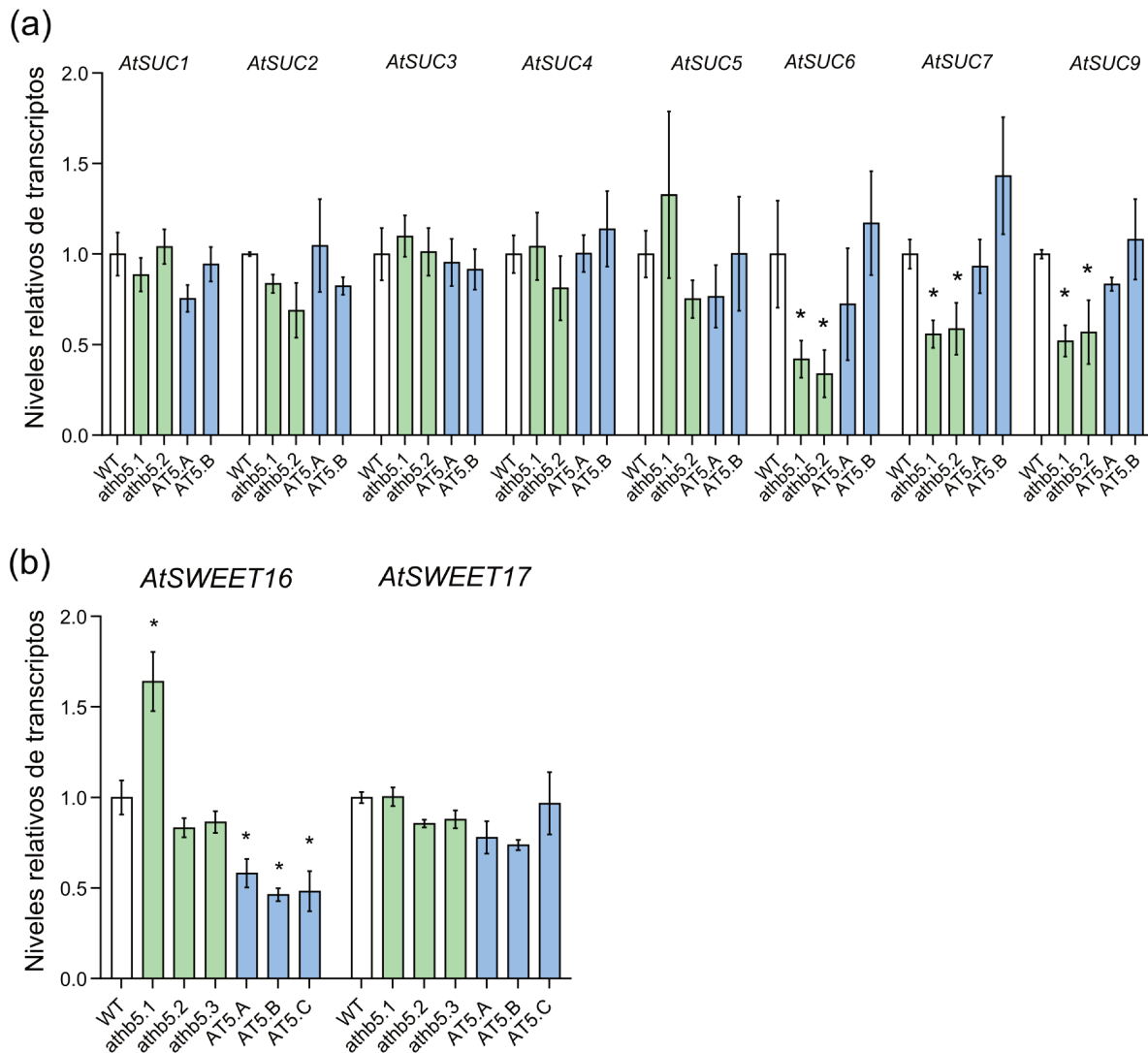
Para profundizar en la influencia de este factor de transcripción sobre la dinámica del transporte de fotosintatos y la regulación del almidón transitorio, se analizaron las concentraciones de glucosa, sacarosa y almidón en hojas de roseta a lo largo del fotoperíodo. Las mutantes *athb5* presentaron concentraciones mayores de glucosa al final de la noche (06:00 h) y concentraciones mayores de sacarosa a las 10:00 h, en comparación con las plantas WT (Figura 37). En contraste, las líneas AT5 mantuvieron concentraciones de sacarosa constantes y más bajas durante todo el día, mientras que el almidón se acumuló hacia el final del fotoperíodo (22:00 h; Figura 37). De manera opuesta, en las mutantes *athb5*, la concentración de glucosa aumentó al final del día, mientras que la concentración de almidón se mantuvo baja y constante (Figura 37). Estas observaciones sugieren que, en las plantas AT5, la acumulación de almidón al final de la noche no se acompaña de una liberación adecuada de sacarosa al inicio del día, evidenciando una alteración en la dinámica normal de la movilización del carbono.



**Figura 37. AtHB5 afecta la movilización de azúcares en todo el fotoperíodo**

Concentraciones de almidón, glucosa y sacarosa en hojas de roseta de plantas en estadio reproductivo de los genotipos mutante *athb5.3*, sobreexpresante AT5.A y WT, cultivadas en condiciones normales de crecimiento. Las muestras se recolectaron durante el día en los horarios indicados en el eje x; las barras grises oscuras indican el período nocturno y las barras amarillas el período diurno.

Finalmente, se analizaron los niveles de transcritos de los genes *AtSUC1–9* y *AtSWEET11–17*, involucrados en la carga y descarga de sacarosa al floema. Los niveles de expresión de *AtSUC6* y *AtSUC7* disminuyeron en hojas de las mutantes *athb5*, mientras que la expresión de *AtSWEET16* disminuyó en tallos de las plantas AT5. Los demás genes no mostraron cambios significativos entre los diferentes genotipos (Figura 38), lo que indica que AtHB5 no afecta de manera generalizada la transcripción de los transportadores de sacarosa SUC y SWEET.



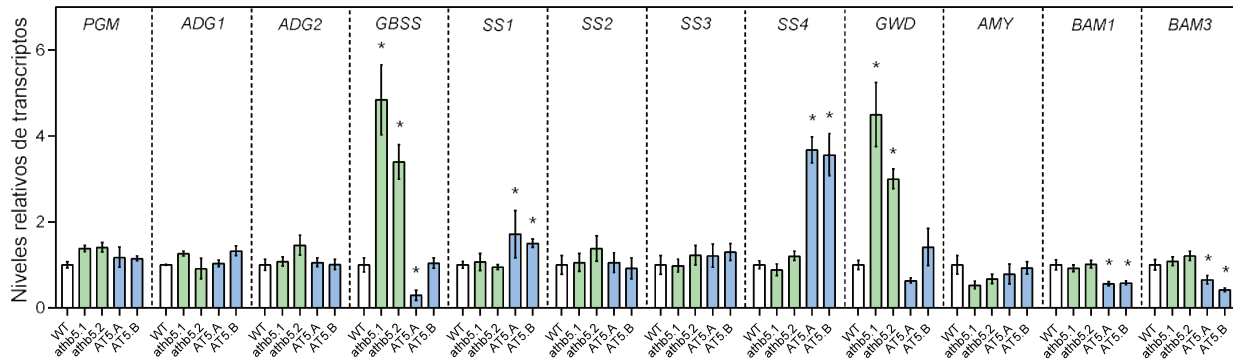
**Figura 38. Expresión de transportadores de sacarosa en líneas *athb5* y sobreexpresantes AT5**

(a) Los niveles de transcritos de *AtSUC1-9* y *AtSWEET11-15* se cuantificaron mediante RT-qPCR en hojas de roseta de plantas mutantes *athb5*, sobreexpresantes AT5 y WT. (b) Los niveles de transcritos de *AtSWEET16* y *AtSWEET17* se cuantificaron mediante RT-qPCR en tallos de los mismos genotipos. Los valores se normalizaron respecto al obtenido en WT. Las barras representan el error estándar de la media (SEM). Las diferencias se consideraron significativas y se indican con asteriscos (\*) cuando el valor de *p* fue < 0.05 (prueba *t* de Student).

#### 4.1.4 El metabolismo del almidón se encuentra alterado en plantas mutantes *athb5* y sobreexpresantes AT5

Para analizar la homeostasis del almidón transitorio, se cuantificaron los niveles de transcritos de genes que codifican enzimas claves en las vías de síntesis y degradación del almidón. Las determinaciones se realizaron en hojas de roseta de plantas en etapa reproductiva, recolectadas a mitad del período de luz. Los niveles de

transcriptos de *SS1* y *SS4* se encontraron aumentados en las líneas AT5, mientras que en las plantas mutantes *athb5* se mantuvieron sin cambios en comparación con el de las plantas WT (Figura 39), lo que sugiere que AtHB5 promueve la transcripción de los primeros pasos de la síntesis de almidón. Por el contrario, la expresión de *GBSS* aumentó en las mutantes *athb5* y disminuyó en una de las líneas AT5, indicando un rol negativo de AtHB5 en la síntesis de gránulos de almidón (Figura 39).



**Figura 39. Los niveles de transcritos de genes involucrados en la síntesis y degradación del almidón están modulados diferencialmente en plantas *athb5* y AT5**

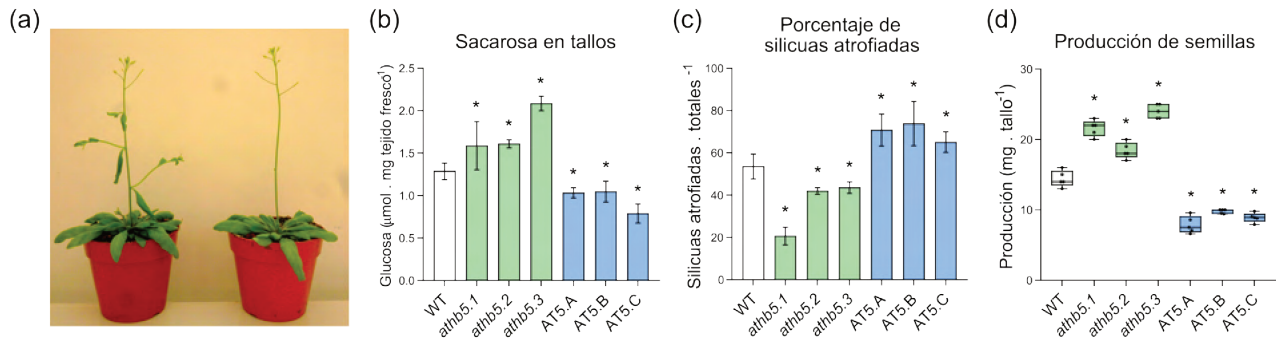
Los niveles de transcritos se cuantificaron por RT-qPCR en mutantes *athb5*, sobreexpresantes AT5 y plantas WT. Los valores se normalizaron al valor respectivo obtenido en las plantas WT. Las barras representan la SEM y las diferencias significativas se indican con asteriscos (\*),  $P < 0,05$  (prueba *t* de Student).

#### 4.1.5 El transporte a larga distancia a través del floema se ve afectado por la expresión de *AtHB5*

Otro componente esencial de la movilización de carbono es su transporte a larga distancia a través del floema del tallo, desde las hojas de roseta hacia los tejidos sumideros durante la fase reproductiva, principalmente las silicuas y las semillas. Para evaluar si este transporte se ve afectado por AtHB5, se eliminaron las ramas laterales de plantas en etapa reproductiva (cuando las silicuas estaban en desarrollo), dejando un solo tallo principal. Este procedimiento forzó el flujo de sacarosa desde las hojas de roseta hacia las flores a través del floema del tallo principal, evitando el aporte proveniente de hojas caulinares (Figura 40a).

La cuantificación de sacarosa en tallos 24 h después de la desramificación mostró que los tallos de las mutantes *athb5* contenían más sacarosa que los control, mientras que las líneas AT5 presentaban concentraciones menores (Figura 40b). Estos resultados sugieren que las mutantes transportan una mayor cantidad de sacarosa, lo cual podría explicar su mayor rendimiento de semillas por planta y refuerza la hipótesis de que AtHB5 actúa como un inhibidor del transporte de azúcares.

La desramificación afectó el desarrollo de las silicuas, que resultaron más cortas o mal formadas. Este efecto dependió del genotipo: las plantas mutantes fueron menos afectadas que las WT, mientras que las sobreexpresantes mostraron la mayor proporción de silicuas atrofiadas (13-33 % en mutantes, 67-74 % en AT5 y ~50 % en WT; Figura 40c). Asimismo, el rendimiento de semillas en plantas desramificadas reflejó una dependencia genotípica más marcada que en plantas intactas: *athb5* produjo más semillas, mientras que AT5 generó menos que las WT (Figura 40d).



**Figura 40. AtHB5 tiene una regulación negativa sobre el transporte de sacarosa a larga distancia**

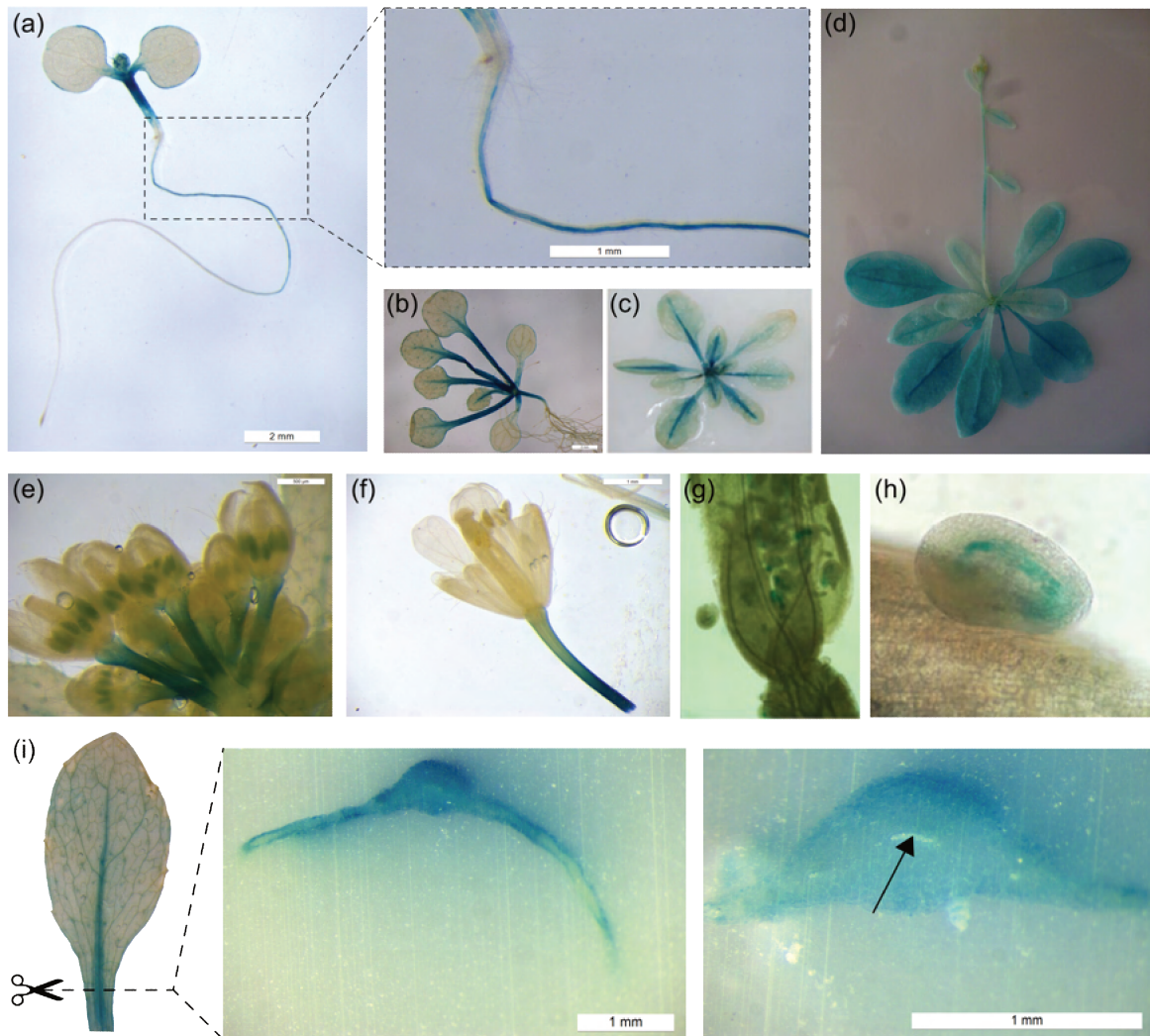
(a) Foto ilustrativa de plantas de *Arabidopsis* antes y después de cortar las ramas del tallo principal. (b) Concentración de sacarosa en el tallo en la mutante *athb5*, las sobreexpresantes AT5 y las WT desramificadas. (c) Relación de silicuas cortas respecto a silicuas totales en las mismas plantas. (d) Rendimiento de semillas en las mismas plantas. Las barras representan la SEM. Las diferencias significativas se indican con asteriscos (\*)  $P < 0,05$  (prueba *t* de Student).

## 4.2 AtHB5 SE EXPRESA EN TEJIDOS DE TRANSPORTE

Para comprender mejor el papel de *AtHB5* en el desarrollo del tallo, se clonó la región promotora de 1531 pb de este factor de transcripción, fusionada al gen reportero *GUS* (*PrAtHB5:GUS*) y se obtuvieron plantas transgénicas de *Arabidopsis*. El patrón de expresión se analizó mediante ensayos de histoquímica utilizando plantas homocigotas de diferentes edades durante todo el ciclo de vida. En plántulas de 8 días, la expresión fue evidente en hipocótilos, pecíolos y raíces (Figura 41a) y persistió hasta el día 14, momento en que también se detectó en el tejido vascular de las hojas en desarrollo (Figura 41b, c). En plantas de 21 días, la expresión permaneció activa en pecíolos y tejidos vasculares, extendiéndose a tallos y hojas caulinares en la etapa reproductiva temprana (Figura 41d).

Cuando se desarrollaron flores y silicuas, la señal de *GUS* se mantuvo en pedúnculos y anteras de flores inmaduras (Figura 41e), y luego en pedúnculos de flores y en el endospermo de semillas (Figura 41f-h). En cortes histológicos se observó además la expresión del factor de transcripción en pecíolos (Figura 41i), destacando que todas las regiones mostraron tinción, excepto la correspondiente al floema. Estos resultados

indican que *AtHB5* se expresa predominantemente en tejidos conductores a lo largo del ciclo de vida de la planta.



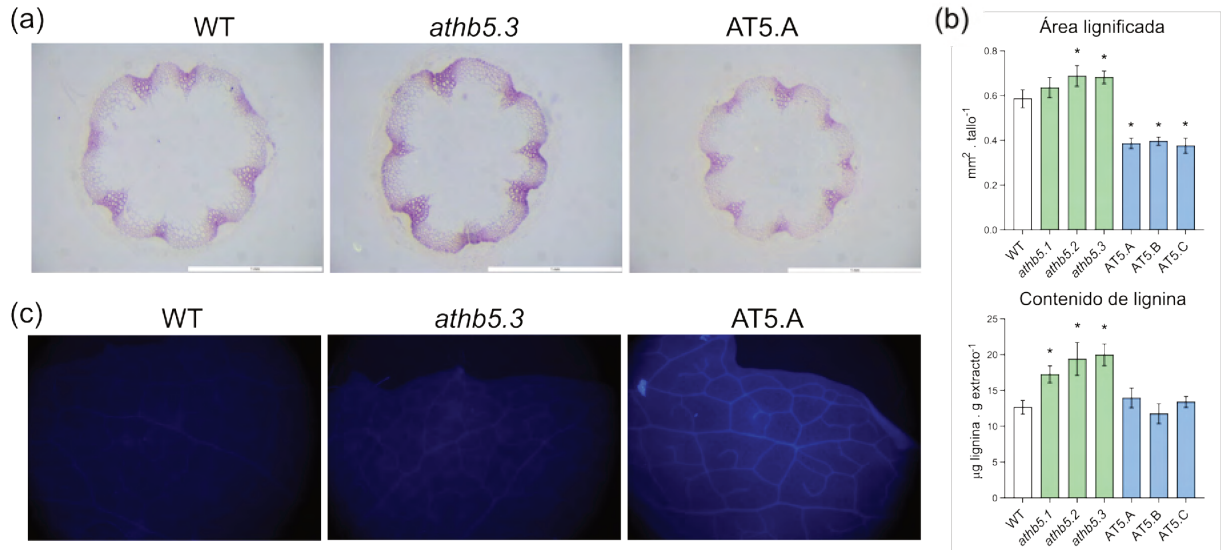
**Figura 41. *AtHB5* se expresa en tejidos conductores**

Detección histoquímica de la actividad enzimática de GUS en plantas *PrAtHB5:GUS* de 8 días (a) y 14 días (b) cultivadas en medio MS; rosetas de plantas de 25 días cultivadas en macetas (c); plantas de 32 días cultivadas en macetas (d); flores inmaduras (e), pedicelos de flores maduras (f), silicuas (g) y semillas (h). La misma detección se realizó sobre secciones histológicas de pecíolos de una hoja de roseta (i), en la que la flecha muestra la falta de actividad de GUS en el tejido del floema.

### 4.3 *ATHB5* REGULA NEGATIVAMENTE LA DEPOSICIÓN DE LIGNINA EN TALLOS Y CALOSA EN HOJAS

Para profundizar en los efectos regulatorios de *AtHB5*, se analizaron parámetros anatómicos y fenotípicos relacionados con la pared celular. Ko y col., (2004) demostraron que los niveles de transcripto de *AtHB5*

disminuyen durante el crecimiento secundario del tallo, proceso que implica un incremento del tejido del xilema y, por ende, de la deposición de lignina. Para evaluar si este parámetro se ve afectado por AtHB5, se realizaron cortes transversales de tallos y se tiñeron con floroglucinol-HCl (Figura 42a). Los tallos de las líneas AT5 mostraron áreas lignificadas más pequeñas, mientras que los de las mutantes *athb5* presentaron áreas más amplias que las WT (Figura 42b). La cuantificación de lignina mediante el método de bromuro de acetilo confirmó un aumento significativo de este polímero en las plantas mutantes, mientras que las sobreexpresantes no difirieron significativamente de los control (Figura 42b). Estos resultados indican que AtHB5 regula negativamente la deposición de lignina en tallos.



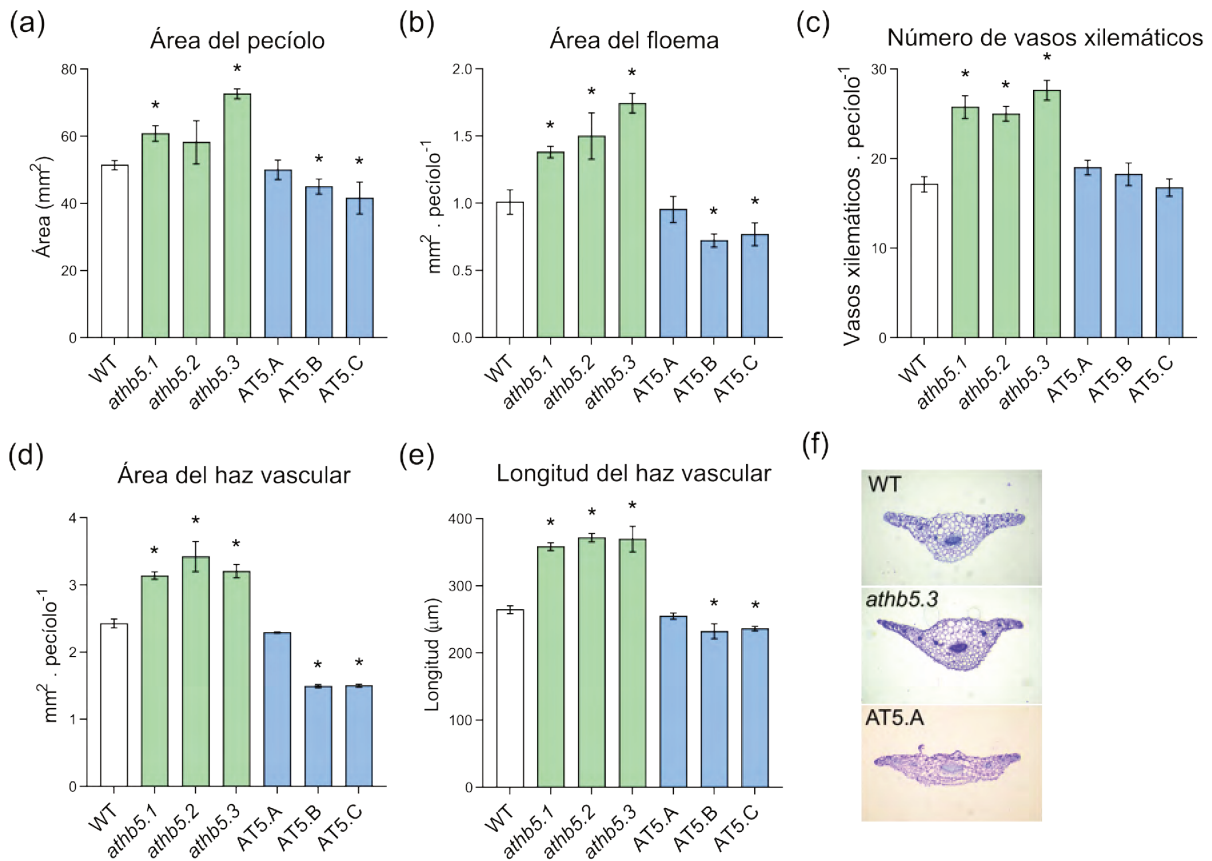
**Figura 42. AtHB5 regula negativamente la deposición de lignina en la pared del xilema y calosa en el floema**

(a) Secciones transversales del primer entrenudo del tallo, teñidos con floroglucinol-HCl para detectar la deposición de lignina (rosa). Barras = 1 mm. (b) Cuantificación de las áreas lignificadas de (a) utilizando el software *ImageJ* y cuantificación total de lignina utilizando el método de bromuro de acetilo. Las barras representan la SEM y los asteriscos indican diferencias significativas (\*  $p < 0,05$ ; prueba *t* de Student). (c) Observaciones microscópicas de fluorescencia de hojas en roseta WT, *athb5* y AT5 teñidas con azul de anilina para detectar calosa.

En cuanto al floema, una de las causas reportadas de acumulación de azúcares en hojas es la deposición de calosa en los elementos de los tubos cribosos, lo que puede obstaculizar el transporte desde los tejidos fuente hacia los sumideros (Julius y col., 2018). Las hojas de plantas mutantes, sobreexpresantes y WT se tiñeron con azul de anilina para detectar calosa. Notablemente, la tinción se observó sólo en las plantas AT5 (Figura 42c), lo que sugiere que la acumulación de calosa podría contribuir a la alteración del transporte de sacarosa y a la acumulación de almidón en estas plantas.

#### 4.4 LA EXPRESIÓN DE *AtHB5* AFECTA LA ANATOMÍA DEL PECÍOLO

Dado que el transporte de fotosintatos desde las hojas de roseta hacia el tallo depende de la estructura vascular del pecíolo, se analizó la anatomía de este órgano en las diferentes líneas. Las secciones transversales de los pecíolos de la cuarta hoja de roseta, de las plantas en estado reproductivo, mostraron diferencias significativas entre genotipos. Las plantas AT5 presentaron pecíolos más aplanados, con un área de floema reducida, haces vasculares más cortos y una menor extensión del xilema, mientras que las mutantes *athb5* exhibieron el fenotipo opuesto (Figura 43a-f). La cuantificación de parámetros anatómicos confirmó que *AtHB5* limita el desarrollo vascular y la expansión del pecíolo, mientras que su ausencia lo promueve.

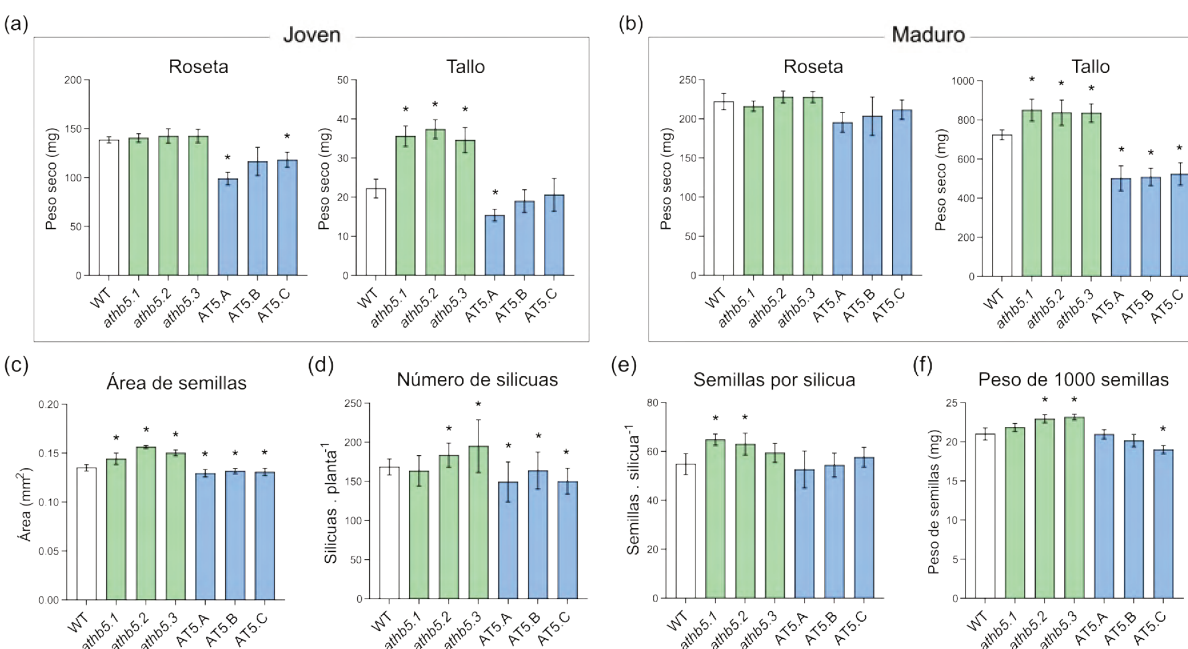


**Figura 43. La expresión de *AtHB5* afecta la morfología vascular del pecíolo**

(a) Cuantificación del área total del pecíolo, (b) área del floema, (c) número de vasos del xilema, (d) área del haz vascular y (e) longitud del haz vascular en secciones transversales del pecíolo cuantificadas mediante *ImageJ*. (f) Cortes histológicos de pecíolos de plantas WT, mutantes *athb5.3* y AT5.A. Las barras representan el error estándar. Las diferencias significativas se indican con asteriscos (\*  $p < 0,05$ ; prueba *t* de Student).

## 4.5 LAS PLANTAS MUTANTES *athb5* GENERAN MAYOR BIOMASA QUE SUS PARES CONTROL

Con el objetivo de evaluar si las alteraciones en el transporte de azúcares derivadas de la expresión de *AtHB5* afectaban la acumulación de biomasa, se cuantificaron parámetros fisiológicos en mutantes y sobreexpresantes a lo largo del ciclo de vida. En la etapa juvenil (tallos de 10 cm), se observó que en la línea A de las plantas AT5 el peso seco de las hojas fue menor que el de las plantas WT, mientras que, en las otras líneas, la diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 44a). En contraste, las plantas mutantes *athb5* presentaron un aumento significativo de la biomasa del tallo cuando se comparó con la de las plantas WT. En la etapa madura (tallos de 30 cm), las diferencias se acentuaron: las plantas mutantes mostraron mayor biomasa, mientras que las AT5 tuvieron menos, en comparación con lo observado en las plantas WT (Figura 44b).



**Figura 44. *AtHB5* afecta la generación de biomasa vegetal y parámetros asociados a la producción de semillas**

(a) Peso seco de la roseta y biomasa del tallo de 10 cm (juvenil) y (b) de 30 cm (maduro). (c) Área de semilla, (d) número de silicuas por planta, (e) número de semillas por silicua y (f) peso de 1000 semillas evaluado en plantas WT y mutantes y sobreexpresantes de *AtHB5*. Las barras representan el error estadístico. Las diferencias significativas se indican con asteriscos (\*  $p < 0,05$ ; prueba *t* de Student).

Durante la etapa reproductiva, en las plantas *athb5* se observó un área mayor de semillas (Figura 44c), más cantidad de silicuas por planta (Figura 44d) y más cantidad de semillas por silicua que en las plantas WT (Figura 44e), mientras que las líneas AT5 exhibieron los fenotipos opuestos. Además, se observó que las

semillas *athb5* muestran un peso mayor por cada mil semillas (Figura 44f), indicando que AtHB5 actúa como un regulador negativo de la producción y el tamaño de las semillas.

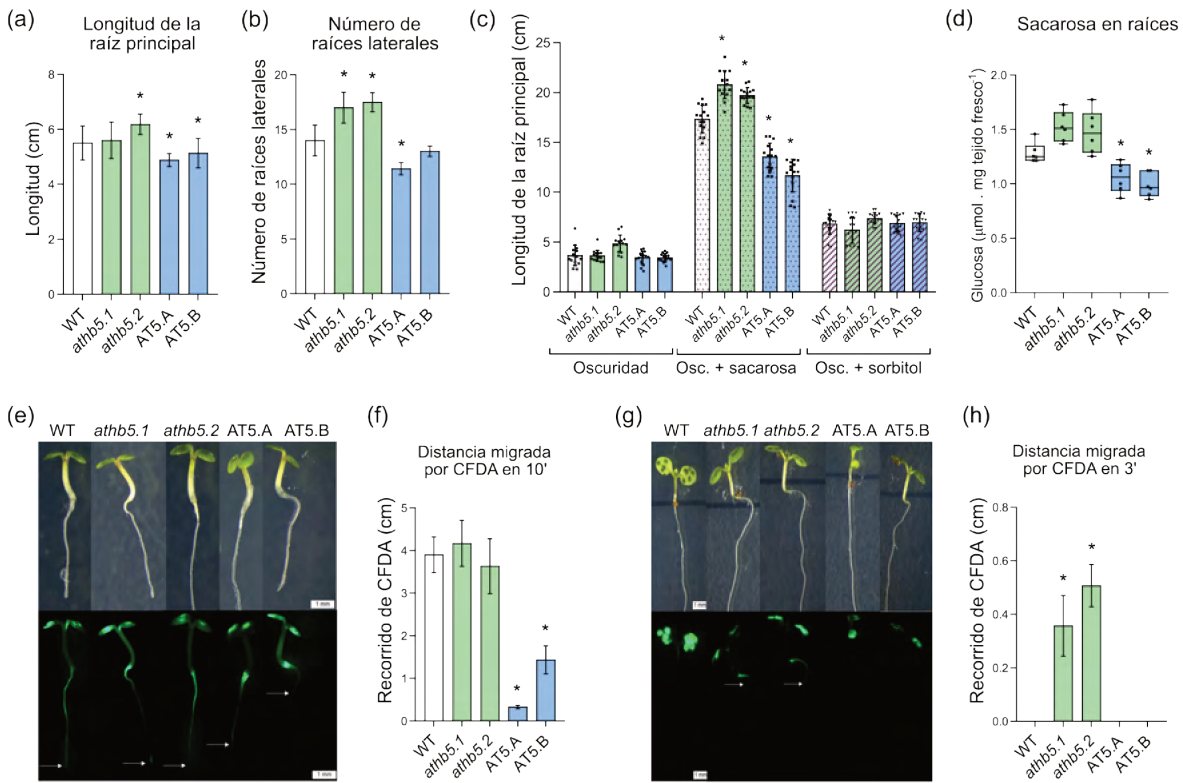
#### **4.6 AtHB5 REGULA NEGATIVAMENTE LA LLEGADA DE SACAROSA A LAS RAÍCES, AFECTANDO SU DESARROLLO**

Durante la etapa vegetativa, las raíces constituyen el principal órgano sumidero. Para evaluar la función de AtHB5 en el transporte de carbohidratos hacia las raíces, se cultivaron plantas *athb5*, AT5 y WT en medio MS bajo condiciones controladas. Las plantas AT5 presentaron raíces más cortas y con menor número de raíces laterales que la WT, mientras que las mutantes *athb5* mostraron el fenotipo opuesto (Figura 45a, b).

Bajo condiciones de oscuridad, y en presencia o ausencia de 3 % de sacarosa (o sorbitol como control osmótico), todas las plantas elongaron sus raíces, aunque las mutantes *athb5* lo hicieron con mayor eficiencia que los controles o las AT5 (Figura 45c). En medio con sorbitol, las diferencias desaparecieron, indicando que el estrés osmótico no fue responsable del fenotipo diferencial, sino el metabolismo de la sacarosa.

La cuantificación de sacarosa en raíces de plántulas de 10 días mostró que las líneas AT5 presentaban concentraciones menores que en raíces de plantas WT, mientras que las *athb5* no mostraron diferencias significativas (Figura 45d). Esto sugiere un defecto en el transporte de sacarosa a través del floema en las plantas sobreexpresantes respecto de sus pares WT.

Para confirmarlo, se empleó la sonda fluorescente CFDA, aplicada en cotiledones para rastrear el flujo a través del floema. Todas las plantas mostraron fluorescencia radicular, pero las líneas AT5 presentaron un recorrido más corto y una intensidad menor, mientras que las *athb5* transportaron la sonda más rápidamente y alcanzaron una distancia mayor en el mismo tiempo (Figura 45e-h). Estos resultados demuestran que AtHB5 regula negativamente el transporte de sacarosa hacia las raíces, afectando su desarrollo y elongación.



**Figura 45. AtHB5 modula la morfología de la raíz e inhibe el transporte de sacarosa a las raíces**

(a) Longitud de la raíz primaria y (b) número de raíces laterales de plántulas de 7 días de edad de mutantes *athb5*, sobreexpresantes AT5 y WT cultivadas en condiciones normales. (c) Longitud de la raíz primaria de plántulas cultivadas en oscuridad y suplementadas o no con sacarosa o sorbitol al 3 %. (d) Concentración de sacarosa en las raíces de los mismos genotipos, cultivadas en condiciones normales. (e) Panel superior, imágenes de campo claro de plántulas de 7 días de edad de *athb5*, AT5 y WT. Panel inferior: sonda CFDA transportada en las mismas plantas, visualizada con un microscopio de fluorescencia 10 min después de la aplicación en cotiledones. Barras = 1 mm. Las flechas blancas indican la distancia alcanzada por la sonda fluorescente. (f) Distancia recorrida por la sonda CFDA a través de las raíces durante 10 min, cuantificada por *ImageJ*. (g) Panel superior: imágenes de campo claro de plántulas *athb5*, AT5 y WT de 7 días de edad. Panel inferior: sonda CFDA, visualizada con un microscopio de fluorescencia 3 min después de su aplicación en cotiledones. Barras = 1 mm. Las flechas blancas indican la distancia alcanzada por la sonda fluorescente. (h) Distancia recorrida por la sonda CFDA a través de las raíces durante 3 min, cuantificada por *ImageJ*. Las barras representan el SEM. Las diferencias significativas se indican con asteriscos (\*  $p < 0,05$ ; prueba *t* de Student).

## 5. DISCUSIÓN

Los resultados presentados en este Capítulo revelan que *AtHB5*, perteneciente a la subfamilia I de los HD-Zip, actúa como un regulador negativo del crecimiento vascular y del transporte de carbono, afectando de manera directa la partición fuente-sumidero, la acumulación de biomasa y la producción de semillas en *Arabidopsis*. Estas observaciones complementan y amplían los hallazgos de los capítulos anteriores, en los que se demostró que el estrés mecánico induce una expansión del tejido vascular y un aumento en la movilización de fotosintatos hacia órganos sumideros, procesos asociados a una mayor producción de semillas. La caracterización funcional de *AtHB5* permite ahora situar este factor dentro de la red transcripcional que controla tales respuestas, revelando su papel como modulador negativo de los cambios anatómicos, fisiológicos y metabólicos que también se relacionan con el estímulo mecánico.

En este sentido, resulta interesante destacar que no es habitual encontrar mutantes de HD-Zip I que presenten características mejoradas o deseables. En contraste, existen varios trabajos en los que la sobreexpresión o expresión ectópica de estos genes confirió características potencialmente beneficiosas, como una mayor tolerancia a factores de estrés abiótico (Manavella y col., 2006; Cabello y col., 2012; Zhao y col., 2014, 2021; Cabello y col., 2016; Basso y col., 2021; Raineri y col., 2022). Incluso varias construcciones capaces de sobreexpresar miembros de HD-Zip I fueron protegidas mediante patentes (Arce y col., 2008; Guo y col., 2011; Sanz Molinero y col., 2016).

Estudios previos han mostrado que distintos estímulos mecánicos como la aplicación de peso, el tacto o la hipergravedad inducen cambios transcripcionales en miembros de la familia HD-Zip I (Ko y col., 2004; Tamaoki y col., 2014; Xu y col., 2019). Sin embargo, la comparación entre estos datos revela una superposición limitada entre los genes regulados, lo que sugiere que cada modalidad de estímulo mecánico activa programas moleculares mayormente específicos. En concordancia con esta idea, el análisis de RNA-seq realizado en este trabajo no mostró cambios significativos en la expresión de genes HD-Zip I luego de 6 h de tratamiento con peso, lo que indica que estos factores no forman parte del núcleo de la respuesta transcripcional temprana detectada a nivel global. No obstante, el análisis específico de los transcritos de *AtHB5* reveló una regulación diferencial significativa en tallos y rosetas de plantas tratadas, particularmente en etapas tempranas del estímulo mecánico. En este sentido, *AtHB5* no parecería actuar como un regulador general en la percepción de la señal mecánica, sino más bien como un nodo transcripcional que ajusta procesos asociados a la respuesta al estrés mecánico, como el crecimiento vascular y el transporte de carbono.

En este trabajo, observamos que las líneas mutantes *athb5* presentan tallos más anchos, con incremento en las áreas del xilema, del floema y de la médula, mientras que las líneas sobreexpresantes AT5 mostraron reducciones significativas en esos tejidos. Estos resultados confirman las observaciones de Ko y col., (2004), quienes informaron que *AtHB5* se expresa en el tallo en etapas tempranas del desarrollo y que su transcripción disminuye durante la transición al crecimiento secundario. Además, la reducción de lignina

observada en las líneas AT5 y su incremento en las plantas mutantes *athb5* refuerzan la noción de que AtHB5 regula negativamente la lignificación del xilema, un proceso clave para el refuerzo estructural del tallo que ocurre durante el crecimiento secundario (Schuetz y col., 2014; Taylor-Teeple y col., 2015). Tras la división y diferenciación celular, las células del xilema experimentan un programa de desarrollo que incluye la formación de la pared celular secundaria, la lignificación y la muerte celular programada, para producir fibras y vasos de xilema funcionales (Schuetz y col., 2012). En este contexto, AtHB5 también podría actuar como un represor de la vía de lignificación.

La localización del promotor *PrAtHB5:GUS* en tejidos vasculares de tallo, pecíolo y raíz, pero no en el floema propiamente dicho, sugiere que su acción reguladora ocurre en el contexto del parénquima asociado o de otras células del sistema conductor, mientras que las alteraciones fenotípicas y metabólicas observadas en las líneas mutantes y sobreexpresantes de *AtHB5* indican que este factor influye directamente en la partición de carbono entre tejidos fuente y sumidero, que ocurre a través del floema. Las plantas mutantes *athb5* presentaron mayor acumulación de sacarosa en tallos y glucosa en hojas, acompañadas de un incremento en el rendimiento y contenido lipídico de las semillas. En contraste, las líneas AT5 mostraron una represión generalizada del flujo de carbono, con menor acumulación de azúcares y lípidos y baja producción de semillas. Estos resultados sitúan a AtHB5 como un represor transcripcional de la movilización de fotosintatos, actuando de manera opuesta al patrón de respuesta inducido por el estrés mecánico descrito en el Capítulo II.

El aumento de la producción de semillas en las plantas mutantes *athb5*, debido principalmente a un mayor número de granos, es consecuencia de una mayor llegada de carbono, lo que también podría contribuir a los efectos observados en las concentraciones de compuestos de reserva. En semillas, las proteínas de almacenamiento y los triacilglicérols acumulados representan aproximadamente entre el 30 y el 40 % del peso seco (Baud y col., 2002) y ambos compuestos se vieron incrementados en plantas *athb5*. Además, la eliminación de ramas laterales acentuó el fenotipo diferencial sobre la producción final de semillas, lo que respalda la hipótesis de que el transporte a larga distancia se ve favorecido en las plantas mutantes *athb5* en comparación con las WT y AT5.

El análisis de la expresión de genes que codifican transportadores de sacarosa mostró que AtHB5 regula negativamente *AtSWEET16* en tallos, transportador asociado al intercambio vacuolar de azúcares (Klemens y col., 2013). La represión de *AtSWEET16* podría explicar la menor disponibilidad de sacarosa en los tallos de las plantas AT5, afectando la provisión de carbono hacia órganos sumideros. Este efecto recuerda al observado en la doble mutante *atsweet16/17*, que también presenta alteraciones en la lignificación y en la composición de la pared celular secundaria del xilema (Aubry y col., 2022). En conjunto, estos datos sugieren que AtHB5 coordina la homeostasis de carbono y la maduración de tejidos conductores, regulando no sólo la expansión del xilema sino también la expresión de transportadores de sacarosa.

La dinámica de azúcares evaluada durante el transcurso de todo el fotoperíodo reveló además un desbalance en la movilización del almidón transitorio. Las líneas AT5 acumularon almidón al final del día, pero liberaron menos sacarosa al inicio del período de luz, lo que indica una desconexión entre la degradación del almidón y la exportación de carbono. En las plantas mutantes *athb5*, en cambio, la degradación del almidón y la liberación de sacarosa ocurrieron de manera coordinada, permitiendo sostener el flujo de carbono durante el día y la noche. Estas observaciones se correlacionan con el aumento de los niveles de transcritos *SSI* y *SS4* en las líneas AT5 y de *GBSS* en las mutantes. *SSI* y *SS4* codifican para enzimas que participan en la síntesis de amilopectina. *SS1* genera glucanos de cadena corta (Hizukuri y col., 1986), mientras que *SS4* participa en la iniciación de los gránulos (Roldán y col., 2007). La inducción de estos transcritos en plantas AT5 sugiere que *AtHB5* regula positivamente la generación de glucanos de cadena corta de la amilopectina y la formación de gránulos de almidón. Por otro lado, la síntesis de amilosa depende estrictamente de *GBSS* y no requiere ninguna de las cuatro sintasas de almidón. La expresión de *GBSS* se induce en las plantas mutantes *athb5*, lo que indica que *AtHB5* podría regular negativamente la síntesis de amilosa.

En cuanto a los genes implicados en la degradación del almidón, *GWD* aumentó su expresión en las líneas mutantes *athb5*, mientras que *BAM1* y *BAM3* vieron reprimidos sus niveles de transcritos en las plantas AT5. *GWD1* y *PWD* actúan en los pasos iniciales de la degradación del almidón, fosforilando residuos de glucosa (Ritte y col., 2002; Baunsgaard y col., 2005; Kötting y col., 2005), mientras que *BAM1* y *BAM3* son dos  $\beta$ -amilasas cloroplastídicas que hidrolizan las cadenas externas del almidón, liberando maltosa (Fulton y col., 2008). Estos resultados sugieren que *AtHB5* podría estar promoviendo la síntesis de almidón y reprimiendo el primer paso de su degradación, lo que ralentizaría la liberación de maltosa. Estos resultados podrían explicar por qué las plantas AT5 acumulan más almidón al final de la noche, pero no liberan más sacarosa al comienzo del día, reflejando una función compleja de *AtHB5* sobre la regulación transcripcional de la vía del almidón.

Las plantas con síntesis o degradación de almidón alteradas presentan una biomasa reducida en condiciones de fotoperíodo normal (Caspar y col., 1985; Gibon y col., 2004, 2009), debido a que una menor reserva de almidón afecta negativamente el crecimiento de la planta durante la noche (Wiese y col., 2007). En ese sentido, la sobreexpresión de *AtHB5* redujo significativamente el peso seco del tallo, el número de silicuas y el contenido de lípidos en semillas, mientras que su pérdida de función tuvo los efectos opuestos.

Los efectos negativos de *AtHB5* sobre la movilización de carbono también impactan durante la etapa vegetativa de la planta, en la que las raíces representan uno de los principales tejidos sumidero. Las diferencias en longitud y número de raíces laterales entre genotipos indican que *AtHB5* también regula el transporte de sacarosa hacia tejidos subterráneos. La disminución de fluorescencia de la sonda CFDA en raíces de líneas AT5 confirma que el transporte de carbono está limitado, lo que se traduce en una raíz primaria más corta y con menor número de raíces laterales.

Estudios previos demostraron que el crecimiento radicular se ve influenciado por la iluminación y por la suplementación del medio de cultivo con glucosa o sacarosa (Silva-Navas y col., 2015; López-García y col., 2020; García-González y col., 2021a). Aquí demostramos que, en oscuridad, las plantas mutantes *athb5* presentan mayor elongación de la raíz primaria en plántulas suplementadas con sacarosa que las WT, mientras que las plantas AT5 exhiben raíces más cortas, lo que indica que las raíces de *athb5* son más eficientes en la absorción de sacarosa del medio. En las plántulas, la raíz es el principal órgano de sumidero y su crecimiento depende de la sacarosa transportada desde los cotiledones. Aquí mostramos que las plantas AT5 presentaron menor concentración de sacarosa en las raíces en condiciones normales de crecimiento, no sólo en plántulas sino también en plantas maduras, lo que refuerza aún más el rol negativo de AtHB5 en el transporte de sacarosa.

La calosa en los elementos cribosos es un marcador típico de obstrucción del flujo de floema y suele acumularse bajo condiciones de estrés (Julius y col., 2018). Este polímero permite a los poros ubicados en los extremos de los elementos cribosos variar su tamaño e influye en el flujo de la savia del floema a través de la planta (Barratt y col., 2011; Xie y col., 2011). Las plantas mutantes *cpd1* (*MAIZE CARBOHYDRATE PARTITIONING DEFECTIVE 1*) presentan acumulación de almidón y azúcares solubles en las hojas. Esta acumulación se debió a la inhibición de la exportación de sacarosa, lo cual podría explicarse por depósitos ectópicos de calosa en el floema de las hojas mutantes. En consecuencia, las plantas mutantes *cpd1* mostraron una menor altura y rendimiento (Julius y col., 2018), similar al fenotipo observado en las plantas AT5. En este caso, la presencia de calosa exclusiva en las líneas AT5 sugiere que la sobreexpresión de AtHB5 perturba la homeostasis del floema, reduciendo el transporte, lo que lo convierte en otro de los factores que contribuyen a la reducción del transporte de carbohidratos en estas plantas, y respalda aún más su papel negativo en el transporte de azúcares, ahora también desde las hojas. Además, AtHB5 también modula la arquitectura del pecíolo: los pecíolos de las líneas mutantes son más robustos y con haces vasculares más desarrollados, mientras que las AT5 muestran haces reducidos y menor extensión del floema. Estas diferencias impactan directamente en la capacidad de transporte fuente-sumidero desde la hoja, y explican los cambios observados en rendimiento y biomasa.

En conjunto, los resultados permiten proponer un modelo en el que AtHB5 actúa como un regulador transcripcional negativo del desarrollo vascular y del transporte de azúcares. En condiciones normales, AtHB5 mantiene un equilibrio entre crecimiento y transporte, restringiendo la proliferación cambial, la lignificación y la exportación de carbono. La pérdida de AtHB5 rompe este equilibrio, promoviendo un fenotipo de alto transporte y productividad, pero también de mayor demanda metabólica.

Si bien este factor de transcripción regula las mismas características morfológicas y fisiológicas que se alteran en respuesta al estrés mecánico, la relación entre ambas aún no se ha establecido y requiere de estudios futuros que analicen cambios en el patrón de expresión de *AtHB5* frente al estímulo mecánico o evalúen la respuesta de mutantes y sobreexpresantes del factor de transcripción frente al estrés.

Desde una perspectiva evolutiva y funcional, AtHB5 podría representar un punto de control transcripcional dentro de la familia HD-Zip I que coordina crecimiento, vascularización y metabolismo de azúcares. La comprensión de este nodo regulador abre perspectivas para la manipulación de la eficiencia de transporte y la productividad en cultivos, particularmente bajo condiciones que requieran equilibrar robustez estructural y economía de recursos.

## CONCLUSIONES GENERALES

---

## CONCLUSIONES

Los resultados presentados a lo largo de esta Tesis permiten comprender de manera integral cómo las plantas de *Arabidopsis* responden a señales mecánicas ajustando su desarrollo vascular, transporte de carbohidratos y, en última instancia, su producción de semillas. En conjunto, los tres capítulos delinean un modelo de respuesta al estrés mecánico en el cual la expansión estructural del sistema vascular se coordina con una reprogramación metabólica y transcripcional orientada a optimizar la asignación de carbono entre órganos fuente y sumidero.

En primer lugar, los resultados del Capítulo I demostraron que el estrés mecánico actúa como modulador del crecimiento radial del tallo, promoviendo tanto el engrosamiento del órgano como el incremento del número de haces vasculares. Estos cambios estructurales dependen de una compleja red de interacciones que involucra varios genes y fitohormonas. La señalización de BRs, mediada por *BES1* y *BZR1*, y la de SLs, a través de *BRC1*, convergen para inducir la expresión de *CLE44*, cuya activación en el cámbium desencadena la proliferación de tejido vascular mediante el módulo *CLE44-PXY-WOX4/14* (Figura 18). Este hallazgo aporta evidencia de que las respuestas al estímulo mecánico no se limitan a un refuerzo estructural pasivo, sino que resultan de una reorganización molecular altamente regulada, en la que las vías hormonales y peptídicas actúan de forma integrada. Además, el papel central de *CLE44* vincula la respuesta mecánica con la plasticidad vascular en plantas adultas, demostrando que los mecanismos de crecimiento adaptativo también repercuten en la productividad.

El Capítulo II profundizó en las implicancias funcionales de esta expansión vascular, revelando que el estímulo mecánico induce una respuesta sistémica que incluye tanto la proliferación y diferenciación de tejidos conductores como la activación de rutas de transporte y metabolismo de azúcares. El aumento del número y tamaño de los haces vasculares en plantas tratadas se tradujo en un mayor flujo de sacarosa hacia las semillas, acompañado por una acumulación coordinada de almidón en hojas y una mayor eficiencia de movilización de carbono, lo que resultó en un incremento del rendimiento bajo condiciones óptimas. Sin embargo, esta ventaja adaptativa mostró un costo en condiciones de déficit hídrico: las plantas previamente expuestas al peso presentaron una menor tolerancia a la sequía, evidenciando que la respuesta al estímulo mecánico prioriza la productividad sobre la eficiencia hídrica. En este contexto, el análisis transcriptómico por RNA-seq aportó una dimensión adicional al revelar que las plantas tratadas con peso presentan una activación anticipada de genes típicamente asociados a la respuesta a déficit hídrico, deshidratación y señalización por ABA, incluyendo factores de transcripción, quinasas y enzimas de la biosíntesis hormonal. Estos hallazgos resaltan el carácter dual de la plasticidad vegetal, capaz de generar beneficios o desventajas según el contexto ambiental. Asimismo, la inducción transcripcional de genes que codifican transportadores de sacarosa *SUC* y *SWEET*, junto con genes de síntesis y degradación de almidón, demostró que la respuesta al estrés mecánico implica una reconfiguración metabólica de amplio alcance, en la que el ajuste de la homeostasis de carbono y el aumento del sistema vascular ocurren de manera coordinada.

Finalmente, el Capítulo III permitió situar al factor de transcripción AtHB5 como un componente clave en la regulación negativa del crecimiento vascular y del transporte de carbohidratos, aportando un nivel adicional de control transcripcional sobre los procesos descritos en los capítulos anteriores, aunque no se ha comprobado aún el rol de AtHB5 dentro de la respuesta al estímulo mecánico en particular. En este marco, la regulación temprana de *AtHB5* observada en análisis específicos de RT-qPCR, aunque no detectada en el RNA-seq global, refuerza la idea de que este factor no integra el núcleo transcripcional de la respuesta al peso. Además, el análisis comparativo de datos transcriptómicos provenientes de distintos tipos de estímulos mecánicos (peso, tacto e hipergravedad) mostró una superposición limitada entre los genes diferencialmente expresados, indicando que cada tipo de estímulo mecánico activa redes moleculares específicas. No obstante, la presencia recurrente de factores de transcripción de la familia HD-Zip I, como AtHB12 o AtHB53, sugiere que estos reguladores sí podrían desempeñar roles importantes dentro de la respuesta al peso.

La pérdida de función de AtHB5 promovió un fenotipo de alto transporte de sacarosa y aumento del rendimiento, con incremento de la lignificación, la acumulación de azúcares y el contenido lipídico en semillas, mientras que su sobreexpresión produjo el efecto opuesto, asociado a una disminución de la translocación de carbono, reducción de biomasa y acumulación de calosa en el floema. Estos resultados demuestran que AtHB5 actúa como un modulador transcripcional que restringe la expansión vascular, la lignificación y la exportación de carbono, contribuyendo al equilibrio entre crecimiento y demanda metabólica. Además, la regulación negativa de transportadores como *AtSWEET16* sugiere que AtHB5 conecta el control anatómico del sistema conductor con la dinámica de movilización de azúcares. De esta forma, la acción de AtHB5 representa un mecanismo de ajuste fino que permite a la planta modular su capacidad de transporte de fotosintatos según los requerimientos de desarrollo.

En conjunto, los resultados de esta Tesis proponen un modelo integrador en el que la percepción del estímulo mecánico activa una red hormonal (BRs, SLs y péptidos CLE) que regula la proliferación cambial y el desarrollo vascular, acompañada por una reprogramación metabólica que optimiza la partición de carbono hacia los órganos sumideros. Sobre este marco, factores de transcripción del tipo HD-Zip I, como AtHB5, podrían actuar como moduladores, ajustando la magnitud de la respuesta y coordinando la asignación de recursos estructurales y energéticos.

Desde una perspectiva aplicada, los hallazgos de este trabajo aportan bases conceptuales relevantes para la manipulación del crecimiento y la productividad en cultivos. La identificación de nodos reguladores como *CLE44*, *BRC1* y *AtHB5* abre la posibilidad de diseñar estrategias genéticas orientadas a optimizar la arquitectura vascular y la eficiencia de transporte de carbono, equilibrando robustez estructural y rendimiento en contextos de estrés ambiental. En suma, esta Tesis contribuye a la comprensión del modo en que las plantas integran señales mecánicas con redes hormonales y transcripcionales para sostener un desarrollo eficiente y adaptativo, destacando la interdependencia entre estructura, metabolismo y productividad como un principio fundamental de la fisiología vegetal.

## CITAS BIBLIOGRÁFICAS

---

## BIBLIOGRAFÍA

- Aarts, M. G. & Fiers, M. W. (2003). What drives plant stress genes? *Trends in Plant Science*, 8(3), 99-102.
- Aguilar-Martínez, J. A., Poza-Carrión, C. & Cubas, P. (2007). Arabidopsis BRANCHED1 acts as an integrator of branching signals within axillary buds. *The Plant Cell*, 19(2), 458–472.
- Agustí, J. & Blázquez, M. A. (2020). Plant vascular development: mechanisms and environmental regulation. *Cell Molecular Life*, 77(19), 3711-3728.
- Agustí, J., Herold, S., Schwarz, M., Sanchez, P., Ljung, K., Dun, E. A., Brewer, P. B., Beveridge, C. A., Sieberer, T., Sehr, E. M. & Greb, T. (2011). Strigolactone signaling is required for auxin-dependent stimulation of secondary growth in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(50), 20242–20247.
- Ainsworth, E. A. & Bush, D. R. (2011). Carbohydrate export from the leaf: a highly regulated process and target to enhance photosynthesis and productivity. *Plant Physiology* 155(1), 64-69.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of The Cell* (4th ed.). Garland and Science. New York.
- Alexandersson, E., Fraysse, L., Sjövall-Larsen, S., Gustavsson, S., Fellert, M., Karlsson, M., Johanson, U. & Kjellbom, P. (2005). Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Molecular Biology*, 59(3), 469–484.
- Andrés, F. & Coupland, G. (2012). The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Reviews Genetics*, 13, 627–639.
- Ambawat, S., Sharma, P., Yadav, N. R. & Yadav, R. C. (2013). MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19(3), 307–321.
- Arce, A. L., Cabello, J. V. & Chan, R. L. (2008). Patents on plant transcription factors. *Recent Patents on Biotechnology* 2, 209–217.
- Arce, A. L., Raineri, J., Capella, M., Cabello, J. V. & Chan, R. L. (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, F. D., Manavella, P. A., Dezar, C. A. & Chan, R. L. (2007). The true story of the HD-Zip family. *Trends in Plant Science*, 12, 419–426.
- Aubry, E., Hoffmann, B., Vilaine, F., Gilard, F., Klemens, P. A. W., Guérard, F., Gakière, B., Neuhaus, H. E., Bellini, C., Dinant, S & Le Hir, R. (2022). A vacuolar hexose transport is required for xylem development in the inflorescence stem. *Plant Physiology*, 188(2), 1229-1247.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (1983). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York.
- Ayre, B. G. (2011). Membrane-Transport Systems for Sucrose in Relation to Whole-Plant Carbon Partitioning. *Molecular Plant*, 4(3), 377–394.
- Baud, S., Dubreucq, B., Miquel, M., Rochat, C. & Lepiniec, L. (2008). Storage Reserve Accumulation in Arabidopsis: Metabolic and Developmental Control of Seed Filling. *The Arabidopsis Book*, 6:e0113.

- Baud, S. & Lepiniec, L. (2010). Physiological and developmental regulation of seed oil production. *Progress in Lipid Research*, 49(3), 235–249.
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature*, 431, 356–363.
- Benikhlef, L., L'Haridon, F., Abou-Mansour, E., Serrano, M., Binda, M., Costa, A., Lehmann, S. & Métraux, J. P. (2013). Perception of soft mechanical stress in Arabidopsis leaves activates disease resistance. *BMC Plant Biology* 13, 133.
- Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jürgens, G. & Friml, J. (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, 115(5), 591–602.
- Bennett, T., Sieberer, T., Willett, B., Booker, J., Luschig, C. & Leyser, O. (2006). The Arabidopsis MAX pathway controls shoot branching by regulating auxin transport. *Current Biology*, 16(6), 553–563.
- Bent, E., Johnson, S. & Bancroft, I. (1998). BAC representation of two low-copy regions of the genome of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 13, 849–855.
- Barratt, D. H. P., Kölling, K., Graf, A., Pike, M., Calder, G., Findlay, K., Zeeman, S. C. & Smith, A. M. (2011). Callose synthase *GSL7* is necessary for normal phloem transport and inflorescence growth in Arabidopsis. *Plant Physiology* 155, 328–341.
- Barry, L., Baca Cabrera, J. C., Lucas, M., Lobet, G., Boursiac, Y., & Grondin, A. (2025). Role of xylem in root hydraulics: Functionality and implications for drought adaptation. *Quantitative Plant Biology*, 6, e42.
- Basso, M. F., Costa, J. A., Ribeiro, T. P., Arraes, F. B. M., Lourenço-Tessutti, I. T., Macedo, A. F., Neves, M. R. D., Nardeli, S. M., Arge, L. W., Perez, C. E. A., Silva, P. L. R., de Macedo, L. L. P., Lisei-de-Sa, M. E., Santos Amorim, R. M., Pinto, E. R. C., Silva, M. C. M., Morgante, C. V., Floh, E. I. S., Alves-Ferreira, M. & Grossi-de-Sa, M. F. (2021). Overexpression of the CaHB12 transcription factor in cotton (*Gossypium hirsutum*) improves drought tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry* 165, 80–93.
- Baud, S., Boutin, J. P., Miquel, M., Lepiniec, L. & Rochat, C. (2002). An integrated overview of seed development in Arabidopsis thaliana ecotype WS. *Plant Physiology and Biochemistry*, 406(1), 151–160.
- Baud, S., Wuillème, S., Lemoine, R., Kronenberger, J., Caboche, M., Lepiniec, L. & Rochat, C. (2005). The AtSUC5 sucrose transporter specifically expressed in the endosperm is involved in early seed development in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 43, 824–836.
- Baunsgaard, L., Lütken, H., Mikkelsen, R., Glaring, M. A., Pham, T. T. & Blennow, A. (2005). A novel isoform of glucan, water dikinase phosphorylates pre-phosphorylated  $\alpha$ -glucans and is involved in starch degradation in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 41, 595–605.
- Benikhlef, L., L'Haridon, F., Abou-Mansour, E., Serrano, M., Binda, M., Costa, A., Lehmann, S. & Métraux, J. P. (2013). Perception of soft mechanical stress in Arabidopsis leaves activates disease resistance. *BMC Plant Biology*, 13, 133.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523.

- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K. & Scheres, B. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature*, 433(7021), 39–44.
- Bollhoner, B., Prestele, J. & Tuominen, H. (2012). Xylem cell death: emerging understanding of regulation and function. *Journal of Experimental Botany*, 63(3), 1081–1094.
- Bonke, M., Thitamadee, S., Mähönen, A. P., Hauser, M. T. & Helariutta, Y. (2003). APL regulates vascular tissue identity in Arabidopsis. *Nature*, 426(6963), 181–186.
- Bornberg-Bauer, E., Beaussart, F., Kummerfeld, S. K., Teichmann, S. A. & Weiner, J. (2005). The evolution of domain arrangements in proteins and interaction networks. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(4), 435–445.
- Bradford, M. M. (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.
- Braam, J. (2005). In touch: plant responses to mechanical stimuli. *New Phytologist*, 165(2), 373–389.
- Brenya, E., Chen, Z. H., Tissue, D., Papanicolaou, A. & Cazzonelli, C. I. (2020). Prior exposure of Arabidopsis seedlings to mechanical stress heightens jasmonic acid-mediated defense against necrotrophic pathogens. *BMC Plant Biology*, 20(1), 548.
- Brenya, E., Pervin, M., Chen, Z. H., Tissue, D. T., Johnson, S., Braam, J. & Cazzonelli, C. I. (2022). Mechanical stress acclimation in plants: Linking hormones and somatic memory to thigmomorphogenesis. *Plant, Cell and Environment*, 45(4), 989–1010.
- Brewer, P. B., Dun, E. A., Ferguson, B. J., Rameau, C. & Beveridge, C. A. (2009). Strigolactone acts downstream of auxin to regulate bud outgrowth in pea and Arabidopsis. *Plant Physiology*, 150(1), 482–493.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W. & Jones, R. L. (2015). *Biochemistry and molecular biology of plants* (2nd ed.). American Society of Plant Biologists. John Wiley and Sons, Ltd.
- Cabello, J. V. & Chan, R. L. (2019). Arabidopsis and sunflower plants with increased xylem area show enhanced seed yield. *The Plant Journal*, 99, 717–732.
- Cabello, J. V., Arce, A. L. & Chan, R. L. (2012). The homologous HD-Zip I transcription factors HaHB1 and AtHB13 confer cold tolerance via the induction of pathogenesis-related and glucanase proteins. *The Plant Journal* 69, 141–153.
- Cabello, J. V., Giacomelli, J. I., Piattoni, C. V., Iglesias, A. A. & Chan, R. L. (2016). The sunflower transcription factor HaHB11 improves yield, biomass and tolerance to flooding in transgenic Arabidopsis plants. *Journal of Biotechnology*, 222, 73–83.
- Cabello, J. V., Giacomelli, J.I., Gómez, M.C. & Chan, R.L. (2017). The sunflower transcription factor HaHB11 confers tolerance to water deficit and salinity to transgenic Arabidopsis and alfalfa plants. *Journal of Biotechnology*, 257, 35–46.
- Caño-Delgado, A., Yin, Y., Yu, C., Vafeados, D., Mora-Garcia, S., Cheng, J. C., Nam, K. H., Li, J. & Chory, J. (2004). BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in Arabidopsis. *Development* 131, 5341–5351.
- Capella, M., Ribone, P. A., Arce, A. L. & Chan, R. L. (2015). Homeodomain-Leucine Zipper Transcription Factors: Structural Features of These Proteins, Unique to Plants. *Plant Transcription Factors: Evolutionary, Structural and Functional Aspects*. Elsevier Inc.

- Carrió-Seguí, Á., Brunot-Garau, P., Úrbez, C., Miskolczi, P., Vera-Sirera, F., Tuominen, H. & Agustí, J. (2024). Weight-induced radial growth in plant stems depends on PIN3. *Current Biology*, *34*(18), 4285–4293.
- Caspar, T., Huber, S. C. & Somerville, C. (1985). Alterations in growth, photosynthesis, and respiration in a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) deficient in chloroplast phosphoglucomutase activity. *Plant Physiology* *79*, 11-17.
- Caspar, T., Lin, T. P., Kakefuda, G., Benbow, L., Preiss, J. & Somerville, C. (1991). Mutants of *Arabidopsis* with altered regulation of starch degradation. *Plant Physiology*, *95*(4), 1181-1188.
- Castro-Estrada, J., Salazar, S. M., Mariotti-Martínez, J. A., Cabello, J. V., Chan, R. L. & Welchen, E. (2025). Mechanical stress induces anatomical changes, tomato early flowering, and increased yield involving ethylene and auxins. *Journal of Experimental Botany*, e252.
- Chan, R. L., Gago, G. M., Palena, C. M. & Gonzalez, D. H. (1998). Homeoboxes in plant development. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, *1442*, 1–19.
- Chang, W., Chen, H., Jiao, G., Dou, Y., Liu, L., Qu, C., Li, J. & Lu, K. (2022). Biomolecular Strategies for Vascular Bundle Development to Improve Crop Yield. *Biomolecules*, *12*(12), 1772.
- Chardon, F., Bedu, M., Calenge, F., Klemens, P. A., Spinner, L., Clement, G., Chietera, G., Lérán, S., Ferrand, M., Lacombe, B., Loudet, O., Dinant, S., Bellini, C., Neuhaus, H. E., Daniel-Vedele, F. & Krapp, A. (2013). Leaf fructose content is controlled by the vacuolar transporter SWEET17 in *Arabidopsis*. *Current Biology*, *23*(8), 697–702.
- Charrier, B., Champion, A., Henry, 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.
- Chehab, E. W., Eich, E. & Braam, J. (2009). Thigmomorphogenesis: a complex plant response to mechanostimulation. *Journal of Experimental Botany*, *60*(1), 43–56.
- Chehab, E. W., Yao, C., Henderson, Z., Kim, S. & Braam, J. (2012). *Arabidopsis* touch-induced morphogenesis is jasmonate mediated and protects against pests. *Current Biology: CB*, *22*(8), 701–706.
- Chen, L. Q., Lin, I. W., Qu, X. Q., Sosso, D., McFarlane, H. E., Londoño, A., Samuels, A. L. & Frommer, W. B. (2015). A cascade of sequentially expressed sucrose transporters in the seed coat and endosperm provides nutrition for the *Arabidopsis* embryo. *The Plant Cell*, 607-619.
- Chen, L. Q., Qu, X. Q., Hou, B. H., Sosso, D., Osorio, S., Fernie, A. R. & Frommer, W. B. (2012). Sucrose Efflux Mediated by SWEET Proteins as a Key Step for Phloem Transport. *Science*, *335*(6065), 207–211.
- Chen, X. Y. & Kim, J. Y. (2009). Callose synthesis in higher plants. *Plant Signaling and Behavior*, *4*(6), 489-492.
- Cheng, M. C., Hsieh, E. J., Chen, J. H., Chen, H. Y. & Lin, T. P. (2012). *Arabidopsis* RGLG2, functioning as a RING E3 ligase, interacts with AtERF53 and negatively regulates the plant drought stress response. *Plant Physiology*, *158*(1), 363–375.
- Choe, S., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Tissier, C. P., Gregory, B. D., Ross, A. S., Tanaka, A., Yoshida, S., Tax, F. E. & Feldmann, K. A. (1999). The *Arabidopsis* *dwf7/ste1* mutant is defective in

- the delta7 sterol C-5 desaturation step leading to brassinosteroid biosynthesis. *The Plant Cell* 11, 207-221.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156–159.
- Clough, S. J. & Bent, A. F. (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16(6), 735–743.
- Curtis, H., Barnes, N. S., Schnek, A. & Flores, G. (2008). *Biología, séptima edición*. Editorial Médica Panamericana.
- De Bauw, P., Vandamme, E., Lupembe, A., Mwakasege, L., Senthilkumar, K., Dramé, K. N. & Merckx, R. (2019). Anatomical root responses of rice to combined phosphorus and water stress – relations to tolerance and breeding opportunities. *Functional Plant Biology*, 46, 1009.
- De Smet, I. & Jürgens, G. (2007). Patterning the axis in plants – auxin in control. *Current Opinion in Genetics and Development*, 17(4), 337–343
- De Smet, I., Lau, S., Ehrismann, J. S., Axiotis, I., Kolb, M., Kientz, M., Weijers, D. & Jürgens, G. (2013). Transcriptional repression of BODENLOS by HD-ZIP transcription factor HB5 in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 64(10), 3009–3019.
- Denis, E., Kbir, N., Mary, V., Claisse, G., Conde, E., Silva, N., Kreis, M. & Deveaux Y. (2017). WOX14 promotes bioactive gibberellin synthesis and vascular cell differentiation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 90(3), 560–572.
- Dodsworth, S. (2009). A diverse and intricate signaling network regulates stem cell fate in the shoot apical meristem. *Developmental Biology*, 336, 1–9.
- Dong, X., Hong, Z., Chatterjee, J., Kim, S. & Verma, D. P. S. (2008). Expression of callose synthase genes and its connection with Npr1 signaling pathway during pathogen infection. *Planta*, 229(1), 87–98.
- Durand, M., Mainson, D., Porcheron, B., Maurousset, L., Lemoine, R. & Pourtau, N. (2018). Carbon source–sink relationship in *Arabidopsis thaliana*: the role of sucrose transporters. *Planta*, 247(3), 587–611.
- 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(3), 1460-1479.
- Esaú, K. (1977). *Anatomy of Seed Plants* (2nd ed.). John Wiley and Sons, Nueva York.
- Etchells, J. P., Provost, C. M., Mishra, L. & Turner, S. R. (2013). WOX4 and WOX14 act downstream of the PXY receptor kinase to regulate plant vascular proliferation independently of any role in vascular organisation. *Development*, 140(10), 2224–2234.
- Etchells, J. P. & Turner, S. R. (2010). The PXY-CLE41 receptor ligand pair defines a multifunctional pathway that controls the rate and orientation of vascular cell division. *Development*, 137(5), 767–774.
- Evert, R. F., Eschrich, W. & Heyser, W. (1978). Leaf structure in relation to solute transport and phloem loading in *Zea mays* L. *Plant*, 138(3), 279–294.
- Fàbregas, N., Formosa-Jordan, P., Confraria, A., Siligato, R., Alonso, J. M., Swarup, R., Bennett, M. J., Mähönen, A. P., Caño-Delgado, A. I. & Ibañes, M. (2015). Auxin influx carriers control vascular patterning and xylem differentiation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*, 11, e1005183.

- Fait, A., Angelovici, R., Less, H., Ohad, I., Urbanczyk-Wochniak, E., Fernie, A. R. & Galili, G. (2006). Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiology*, *142*(3), 839-854.
- Fei, H., Yang, Z., Lu, Q., Wen, X., Zhang, Y., Zhang, A. & Lu, C. (2021). OsSWEET14 cooperates with OsSWEET11 to contribute to grain filling in rice. *Plant Science*, *306*, 110851.
- Fisher, K. & Turner, S. (2007). PXY, a receptor-like kinase essential for maintaining polarity during plant vascular-tissue development. *Current Biology*, *17*(12), 1061–1066.
- Fletcher, J. C. (2020). Recent Advances in Arabidopsis CLE Peptide Signaling. *Trends in Plant Science*, *25*(10), 1005–1016.
- Fondy, B. R. & Geiger, D. R. (1982). Diurnal pattern of translocation and carbohydrate metabolism in source leaves of *Beta vulgaris* L. *Plant Physiology*, *70*(3), 671–676.
- Foster, C. E., Martin, T. M. & Pauly, M. (2010). Comprehensive compositional analysis of plant cell walls (Lignocellulosic biomass). Part I: Lignin. *Journal of visualized experiments*, *37*, 1–4.
- Frey, A., Effroy, D., Lefebvre, V., Seo, M., Perreau, F., Berger, A., Sechet, J., To, A., North, H. M. & Marion-Poll, A. (2012). Epoxycarotenoid cleavage by NCED5 fine-tunes ABA accumulation and affects seed dormancy and drought tolerance with other NCED family members. *The Plant Journal*, *70*(3), 501–512.
- Fulton, D. C., Stettler, M., Mettler, T., Vaughan, C. K., Li, J., Francisco, P., Gil, M., Reinhold, H., Eicke, S., Messerli, G., Dorken, G., Halliday, K., Smith, A. M., Smith, S. M. & Zeeman, S. C. (2008).  $\beta$ -AMYLASE4, a noncatalytic protein required for starch breakdown, acts upstream of three active  $\beta$ -amylases in Arabidopsis chloroplasts. *The Plant Cell* *20*, 1040–1058.
- Gaillochet, C. & Lohmann, J. U. (2015). The never-ending story: from meristems to organs in Arabidopsis thaliana. *Development*, *142*, 437–447.
- Garber, R. L., Kuroiwa, A. & Gehring, W. J. (1983). Genomic and cDNA clones of the homeotic locus Antennapedia in Drosophila. *The EMBO Journal*, *2*(11), 2027–2036.
- García-González, J., Lacey, J. & Retzer, K. (2021a). Dissecting hierarchies between light, sugar and auxin action underpinning root and root hair growth. *Plants* *10*, 111.
- Gaxiola, R.A., Palmgren, M. G. & Schumacher, K. (2007). Plant proton pumps. *FEBS Letters*, *581*, 2204–2214.
- Gebauer, P., Korn, M., Engelsdorf, T., Sonnewald, U., Koch, C. & Voll, L. M. (2017). Sugar Accumulation in Leaves of Arabidopsis sweet11/sweet12 Double Mutants Enhances Priming of the Salicylic Acid-Mediated Defense Response. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1378.
- Geiger, D., Giaquinta, R., Sovonick, S. & Fellows, R. (1973). Solute distribution in sugar beet leaves in relation to phloem loading and translocation. *Plant Physiology*, *52*(6), 585–589.
- Gibon, Y., Bläsing, O. E., Palacios-Rojas, N., Pankovic, D., Hendriks, J. H. M., Fisahn, J., Höhne, M., Günter, M. & Stitt, M. (2004). Adjustment of diurnal starch turnover to short days: depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilisation, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the following light period. *The Plant Journal* *39*, 847–862.

- Gibon, Y., Pyl, E. T., Sulpice, R., Lunn, J. E., Höhne, M., Günther, M. & Stitt, M. (2009). Adjustment of growth, starch turnover, protein content and central metabolism to a decrease of the carbon supply when *Arabidopsis* is grown in very short photoperiods. *Plant, Cell and Environment* 32, 859–874.
- Gomez-Roldan, V., Feras, S., Brewer, P. B., Puech-Pagès, V., Dun, E. A., Pillot, J. P., Letisse, F., Matusova, R., Danoun, S., Portais, J. C., Bouwmeester, H., Bécard, G., Beveridge, C. A., Rameau, C. & Rochange, S. F. (2008). Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*, 455(7210), 189–194.
- González-Grandío, E., Pajoro, A., Franco-Zorrilla, J. M., Tarancón, C., Immink, R. G. & Cubas, P. (2017). Abscisic acid signaling is controlled by a BRANCHED1/HD-ZIP I cascade in *Arabidopsis* axillary buds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114, E245–E254.
- González-Grandío, E., Poza-Carrión, C., Sorzano, C. O. & Cubas, P. (2013). BRANCHED1 promotes axillary bud dormancy in response to shade in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 25, 834–850.
- Gottwald, J. R., Krysan, P. J., Young, J. C., Evert, R. F. & Sussman, M. R. (2000). Genetic evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13979–13984.
- Guan, Q., Yue, X., Zeng, H. & Zhu, J. (2014). The protein phosphatase RCF2 and its interacting partner NAC019 are critical for heat stress-responsive gene regulation and thermotolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 26(1), 438–453.
- Guo, M., Niu, X., Rupe, M. & Schussler, J. R. (2011). Down-regulation of a Homeodomain-Leucine Zipper I-Class Homeobox gene for improved plant performance. *U.S. Patent US20180044694*.
- Guo, W. J., Nagy, R., Chen, H. Y., Pfrunder, S., Yu, Y. C., Santelia, D., Frommer, W. B. & Martinoia, E. (2014). SWEET17, a facilitative transporter, mediates fructose transport across the tonoplast of *Arabidopsis* roots and leaves. *Plant Physiology*, 164(2), 777–789.
- Hansen, A., Gladala-Kostarz, A., Hindhaugh, R., Doonan, J. H. & Bosch, M. (2025). Mechanical stimulation in plants: molecular insights, morphological adaptations, and agricultural applications in monocots. *BMC Biology*, 23(1), 58.
- Hauck, P., Thilmony, R. & He, S. Y. (2003). A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 8577–8582.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166, 557–580.
- Haritatos, E., Ayre, B. G. & Turgeon, R. (2000). Identification of phloem involved in assimilate loading in leaves by the activity of the galactinol synthase promoter. *Plant Physiology*, 123(3), 929–938.
- Henriksson, E., Olsson, A. S. B., Johannesson, H., Johansson, H., Hanson, J., Engström, P. & Söderman, E. (2005). Homeodomain leucine zipper class I genes in *Arabidopsis*. Expression patterns and phylogenetic relationships. *Plant Physiology*, 139(1), 509–518.
- Hickman, R., Hill, C., Penfold, C. A., Breeze, E., Bowden, L., Moore, J. D., Zhang, P., Jackson, A., Cooke, E., Bewicke-Copley, F., Mead, A., Beynon, J., Wild, D. L., Denby, K. J., Ott, S. & Buchanan-Wollaston, V. (2013). A local regulatory network around three NAC transcription factors in stress responses and senescence in *Arabidopsis* leaves. *The Plant Journal*, 75(1), 26–39.

- Hirakawa, Y., Kondo, Y. & Fukuda, H. (2010). Regulation of vascular development by CLE peptide-receptor systems. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1), 8–16.
- Hirakawa, Y., Shinohara, H., Kondo, Y., Inoue, A., Nakanomyo, I., Ogawa, M., Sawa, S., Ohashi-Ito, K., Matsubayashi, Y. & Fukuda, H. (2008). Non-cell-autonomous control of vascular stem cell fate by a CLE peptide/receptor system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 15208–15213.
- Hizukuri, S. (1986). Polymodal distribution of the chain-lengths of amylopectins, and its significance. *Carbohydrate Research* 147, 342–347.
- Honma, T. & Goto, K. (2001). Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature*, 409(6819), 525–529.
- Hsieh, E. J., Cheng, M. C. & Lin, T. P. (2013). Functional characterization of an abiotic stress-inducible transcription factor AtERF53 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 82(3), 223–237.
- Hu, J., Hu, X., Yang, Y., He, C., Hu, J. & Wang, X. (2022). Strigolactone signaling regulates cambial activity through repression of WOX4 by transcription factor BES1. *Plant Physiology*, 188(1), 255–267.
- Hu, J., Ji, Y., Hu, X., Sun, S. & Wang, X. (2019). BES1 Functions as the Co-regulator of D53-like SMXLs to Inhibit BRC1 Expression in Strigolactone-Regulated Shoot Branching in *Arabidopsis*. *Plant Commun*, 1(3), 100014.
- Ibañes, M., Fàbregas, N., Chory, J. & Caño-Delgado, A. L. (2009). Brassinosteroid signaling and auxin transport are required to establish the periodic pattern of *Arabidopsis* shoot vascular bundles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 13630–13635.
- Jacques, E., Verbelen, J. P. & Vissenberg, K. (2013). Mechanical stress in *Arabidopsis* leaves orients microtubules in a 'continuous' supracellular pattern. *BMC Plant Biology*, 13, 163.
- Jaffe, M. J. & Biro, R. (1979). Thigmomorphogenesis: The effect of mechanical perturbation on the growth of plants, with special reference to anatomical changes, the role of ethylene and interaction with other environmental stresses. *Stress Physiology of Crop Plants*; pp. 25–59.
- Jakoby M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T. & Parcy, F. (2002). bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, 7(3), 106–111.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. & Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6 (13), 3901–3907.
- Jiang, M., Deng, Z., White, R. G., Jin, T. & Liang, D. (2019). Shootward movement of CFDA tracer loaded in the bottom sink tissues of *Arabidopsis*. *Journal of Visualized Experiments*, 147, e59606.
- Johannesson, H., Wang, Y. & Engström, P. (2001). DNA-binding and dimerization preferences of *Arabidopsis* homeodomain-leucine zipper transcription factors in vitro. *Plant Molecular Biology*, 45, 63–73.
- Johannesson, H., Wang, Y., Hanson, J. & Engström, P. (2003). The *Arabidopsis thaliana* homeobox gene AtHB5 is a potential regulator of abscisic acid responsiveness in developing seedlings. *Plant Molecular Biology*, 51, 719–729.

- Julius, B. T., Slewinski, T. L., Baker, R. F., Tzin, V., Zhou, S., Bihmidine, S., Jander, G. & Braun, D. M. (2018). Maize Carbohydrate partitioning defective1 impacts carbohydrate distribution, callose accumulation, and phloem function. *Journal of Experimental Botany* 69, 3917–3931.
- Kanno, Y., Oikawa, T., Chiba, Y., Ishimaru, Y., Shimizu, T., Sano, N., Koshiba, T., Kamiya, Y., Ueda, M. & Seo, M. (2016). AtSWEET13 and AtSWEET14 regulate gibberellin-mediated physiological processes. *Nature Communications*, 7, 13245.
- Keller, E. & Steffen, K. L. (1995). Increased chilling tolerance and altered carbon metabolism in tomato leaves following application of mechanical stress. *Physiologia Plantarum*, 93, 519–525.
- Keller, M. (2010). *Partitioning of assimilates*, In: *The Science of Grapevines: Anatomy and Physiology* (2nd ed.). Elsevier Inc., San Diego, 125–167.
- Klemens, P. A., Patzke, K., Deitmer, J., Spinner, L., Le, R., Bellini, C., Bedu, M., Chardon, F., Krapp, A. & Neuhaus, H. E. (2013). Overexpression of the vacuolar sugar carrier AtSWEET16 modifies germination, growth, and stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 163(3), 1338-1352.
- Ko, J. H., Han, K. H., Park, S. & Yang, J. (2004). Plant Body Weight-Induced Secondary Growth in Arabidopsis and Its Transcription Phenotype Revealed by Whole-Transcriptome Profiling. *Plant Physiology*, 135(2), 1069–1083.
- Kondo, Y., Ito, T., Nakagami, H., Hirakawa, Y., Saito, M., Tamaki, T., Shirasu, K. & Fukuda, H. (2014). Plant GSK3 proteins regulate xylem cell differentiation downstream of TDIF–TDR signalling. *Nature Communications* 5, 3504.
- Kötting, O., Pusch, K., Tiessen, A., Geigenberger, P., Steup, M. & Ritte, G. (2005). Identification of a novel enzyme required for starch metabolism in Arabidopsis leaves: the phosphoglucan, water dikinase (PWD). *Plant Physiology* 137, 242–252.
- Kubo, M., Udagawa, M., Nishikubo, N., Horiguchi, G., Yamaguchi, M., Ito, J., Mimura, T., Fukuda, H. & Demura, T. (2005). Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes and Development*, 19, 1855–1860.
- Kühn, C. & Grof, C. P. (2010). Sucrose transporters of higher plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(3), 288–298.
- Lambers, H., Chapin, F. S. & Pons T. L. (2008). *Plant physiological ecology* (2nd ed.). Springer.
- Lau, S., Jürgens, G. & De Smet, I. (2008). The evolving complexity of the auxin pathway. *The Plant Cell*, 20(7), 1738–1746.
- Lei, Z., Zhang, X., Wang, M., Mao, J., Hu, X., Lin, Y., Xiong, X. & Qin, Y. (2025). Silencing of miR169a improves drought stress by enhancing vascular architecture, ROS scavenging, and photosynthesis of Solanum tuberosum L. *Frontiers in Plant Science*, 16, 1553135.
- Lemoine, R., La Camera, S., Atanassova, R., Dédaldéchamp, F., Allario, T., Pourtau, N., Bonnemain, J.L., Laloi, M., Coutos-Thévenot, P., Maurouset, L., Faucher, M., Girousse, C., Lemonnier, P., Parrilla, J. & Durand, M. (2013). Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Science*, 4, 272.
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E. & Mroginski, L. (Eds.). (2010). *Biotecnología y mejoramiento vegetal II*. Argentina. Ediciones INTA.
- Li, S. (2015). The Arabidopsis thaliana TCP Transcription Factors: A Broadening Horizon Beyond Development. *Plant Signaling and Behavior*, 10(7), e1044192.

- Li, Z. G. & Gong, M. (2011). Mechanical Stimulation-Induced Cross-Adaptation in Plants: An Overview. *Journal of Plant Biology*, 54(6), 358-364.
- Lin, T. P., Caspar, T., Somerville, C. & Preiss, J. (1988). Isolation and characterization of a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh lacking ADPglucose pyrophosphorylase activity. *Plant Physiology*, 86, 1131-1135.
- Liu, L., White, M. J. & Macrae, T. H. (1999). Functional domains, evolution and regulation. *European Journal of Biochemistry*, 257, 247-257.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the  $2^{\Delta\Delta Ct}$  Method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Lombardo, F., Gramazio, P. & Ezura, H. (2021). Increase in Phloem Area in the Tomato hawaiian skirt Mutant Is Associated with Enhanced Sugar Transport. *Genes*, 12(6), 932.
- López-García, C. M., Ruíz-Herrera, L. F., López-Bucio, J. S., Huerta Venegas, P. I., Peña-Urbe, C. A., Reyes de la Cruz, H. & López-Bucio, J. (2020). ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 promotes growth and biomass accumulation influencing guard cell aperture and photosynthetic efficiency in *Arabidopsis*. *Protoplasma* 257, 573-582.
- Louveaux, M., Rochette, S., Beauzamy, L., Boudaoud, A. & Hamant, O. (2016). The impact of mechanical compression on cortical microtubules in *Arabidopsis*: a quantitative pipeline. *The Plant Journal*, 88(2), 328-342.
- Lucas, W. J., Groover, A., Lichtenberger, R., Furuta, K., Yadav, S. R., Helariutta, Y., He, X. Q., Fukuda, H., Kang, J., Brady, S. M., Patrick, J. W., Sperry, J., Yoshida, A., López-Millán, A. F., Grusak, M. A. & Kachroo, P. (2013). The plant vascular system: evolution, development and functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 55(4), 294-388.
- Ludewig, F. & Flügge, U. I. (2013). Role of metabolite transporters in source-sink carbon allocation. *Frontiers in Plant Science*, 4, 231.
- Li, J. & Chory, J. (1997). A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* 90, 929-938.
- Ma, L., Zhang, D., Miao, Q., Yang, J., Xuan, Y. & Hu, Y. (2017). Essential role of sugar transporter OsSWEET11 during the early stage of rice grain filling. *Plant and Cell Physiology*, 58, 863-873.
- Ma, Y., MacMillan, C. P., de Vries, L., Mansfield, S. D., Hao, P., Ratcliffe, J., Bacic, A. & Johnson, K. L. (2022). FLA11 and FLA12 glycoproteins fine-tune stem secondary wall properties in response to mechanical stresses. *New Phytologist*, 233(4), 1750-1767.
- Manavella, P. A., Arce, A. L., Dezar, C. A., Bitton, F., Renou, J. P., Crespi, M. & Chan, R. L. (2006). Cross-talk between ethylene and drought signaling pathways is mediated by the sunflower HaHB-4 transcription factor. *The Plant Journal* 48, 125-137.
- Marra, M., Kucaba, T., Sekhon, M., Hillier, L., Martienssen, R., Chinwalla, A. & Wilson, R. (1999). A map for sequence analysis of the *Arabidopsis thaliana* genome. *Nature Genetics*, 22, 265-270.
- Matsumoto, S., Kumasaki, S., Soga, K., Wakabayashi, K., Hashimoto, T. & Hoson, T. (2010). Gravity-induced modifications to development in hypocotyls of *Arabidopsis* tubulin mutants. *Plant Physiology*, 152(2), 918-926.
- Matsubayashi, Y. (2010). Post-translational modifications in secreted peptide hormones in plants. *Plant and Cell Physiology*, 52(1), 5-13.

- Meinke, D., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D. & Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science*, 282(5389), 662-682.
- Meyerowitz, E. M. (1997). Genetic control of cell division patterns in developing plants. *Cell*, 88, 299–308.
- Mitsuda, N. & Ohme-Takagi, M. (2009). Functional analysis of transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 50(7), 1232-1248.
- Mittler, R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Science*, 11(1), 15-9.
- Miyashima, S., Sebastian, J., Lee, J. Y. & Helariutta, Y. (2013). Stem cell function during plant vascular development. *EMBO Journal*, 32(2), 178-193.
- Monroe, J. D. (2020). Involvement of five catalytically active *Arabidopsis*  $\beta$ -amylases in leaf starch metabolism and plant growth. *Plant Direct*, 4(2), e00199.
- Monroe, J. D., Storm, A. R., Badley, E. M., Lehman, M. D., Platt, S. M., Saunders, L. K., Schmitz, J. M. & Torres, C. E. (2014)  $\beta$ -Amylase1 and  $\beta$ -amylase3 are plastidic starch hydrolases in *Arabidopsis* That Seem to Be Adapted for Different Thermal, pH, and stress conditions. *Plant Physiology*, 166(4), 1748-1763.
- Mora, C. C., Perotti, M. F., González-Grandío, E., Ribone, P. A., Cubas, P. & Chan, R. L. (2022). AtHB40 modulates primary root length and gravitropism involving CYCLINB and auxin transporters. *Plant Science*, 324, 111421.
- Moustafa, K., AbuQamar, S., Jarrar, M., Al-Rajab, A. J. & Trémouillaux-Guiller, J. (2014). MAPK cascades and major abiotic stresses. *Plant Cell Reports*, 33(8), 1217–1225.
- Mozo, T., Dewar, K., Dunn, P., Ecker, J. R., Fischer, S., Kloska, S., Lehrach, H., Marra, M., Martienssen, R., Meier-Ewert, S. & Altmann, T. (1999). A complete BAC-based physical map of the *Arabidopsis thaliana* genome. *Nature Genetics*, 22, 271–275.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kaneko, T., Kotani, H., Miyajima, N. & Tabata, S. (1998). Structural Analysis of *Arabidopsis thaliana* Chromosome 5. *DNA Research*, 5, 297-308.
- Nguyen, N. H., Kim, J. H., Kwon, J., Jeong, C. Y., Lee, W., Lee, D., Hong, S. W. & Lee, H. (2016). Characterization of *Arabidopsis thaliana* FLAVONOL SYNTHASE 1 (FLS1)-overexpression plants in response to abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 103, 133–142.
- Nolan, T. M., Vukašinović, N., Liu, D., Russinova, E. & Yin, Y. (2020). Brassinosteroids: Multidimensional Regulators of Plant Growth, Development, and Stress Responses. *The Plant Cell*, 32(2), 295-318.
- Oda, Y. & Fukuda, H. (2012). Secondary cell wall patterning during xylem differentiation. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(1), 38–44.
- Ohashi-Ito, K., Oda, Y. & Fukuda, H. (2010). *Arabidopsis* VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 directly regulates the genes that govern programmed cell death and secondary wall formation during xylem differentiation. *The Plant Cell*, 10, 3461-3473.
- Olsson, A. S. B., 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, 663–677.

- Ooms, G., Hooykaas, P. J., Van Veen, R. J., Van Beelen, P., Regensburg-Tuink, T. J. & Schilperoort, R. A. (1982). Octopine Ti-plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-region. *Plasmid*, 7, 15-29
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K. & Tran, L. S. P. (2014). Response of plants to water stress. *Frontiers in Plant Science*, 5, 86.
- Péret, B., Swarup, K., Ferguson, A., Seth, M., Yang, Y., Dhondt, S., James, N., Casimiro, I., Perry, P., Syed, A., Yang, H., Reemmer, J., Venison, E., Howells, C., Perez-Amador, M. A., Yun, J., Alonso, J., Beemster, G. T., Laplaze, L., Murphy, A., Bennett, M. J., Nielsen, E. & Swarup, R. (2012). AUX/LAX genes encode a family of auxin influx transporters that perform distinct functions during *Arabidopsis* development. *The Plant Cell*, 24(7), 2874–2885.
- Palena, C. M., Tron, A. E., Bertocini, C. W., Gonzalez, D. H. & Chan, R. L. (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, 39–47.
- Perotti, M. F., Ribone, P. A., Cabello, J. V., Ariel, F. D. & Chan, R.L. (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, M. F., Ribone, P. A. & Chan, R. L. (2017). Plant transcription factors from the homeodomain-leucine zipper family I. Role in development and stress responses. *IUBMB Life*, 69(5), 280-289.
- Peng, P., Yan, Z., Zhu, Y. & Li, J. (2008). Regulation of the *Arabidopsis* GSK3-like kinase BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2 through proteasome-mediated protein degradation. *Molecular Plant* 1, 338-346.
- Petrásek, J., Mravec, J., Bouchard, R., Blakeslee, J. J., Abas, M., Seifertová, D., Wisniewska, J., Tadele, Z., Kubes, M., Covanová, M., Dhonukshe, P., Skupa, P., Benková, E., Perry, L., Krecek, P., Lee, O. R., Fink, G. R., Geisler, M., Murphy, A. S., Luschnig, C., Zazimalová, E. & Friml, J. (2006). PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science*, 312(5775), 914–918.
- Planas-Riverola, A., Gupta, A., Betegón-Putze, I., Bosch, N., Ibañes, M. & Caño-Delgado, A. I. (2019). Brassinosteroid signaling in plant development and adaptation to stress. *Development*, 146, dev151894.
- Pommerrenig, B., Popko, J., Heilmann, M., Schulmeister, S., Dietel, K., Schmitt, B., Stadler, R., Feussner, I. & Sauer, N. (2013). SUCROSE TRANSPORTER 5 supplies *Arabidopsis* embryos with biotin and affects triacylglycerol accumulation. *Plant Journal*, 73, 392–404.
- Puranik, S., Sahu, P. P., Srivastava, P. S. & Prasad, M. (2012). NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 17(6), 369–381.
- Raineri, J., Caraballo, L., Rigalli, N., Portapila, M., Otegui, M. E. & Chan, R. L. (2022). Expressing the sunflower transcription factor HaHB11 in maize improves waterlogging and defoliation tolerance. *Plant Physiology* 189, 230–247.
- Raven, P. H., Evert, R. F. & Eichhorn, S. E. (1999). *Biology of Plants* (6th ed.). W.H. Freeman and Company, New York.
- Reinhold, H., Soyk, S., Simková, K., Hostettler, C., Marafino, J., Mainiero, S., Vaughan, C. K., Monroe, J. D. & Zeeman, S. C. (2011).  $\beta$ -amylase-like proteins function as transcription factors in *Arabidopsis*, controlling shoot growth and development. *The Plant Cell*, 23(4), 1391-403.

- Ribone, P. A., Capella, M., Arce, A. L. & Chan, R. L. (2016). *What Do We Know about Homeodomain–Leucine Zipper I Transcription Factors? Functional and Biotechnological Considerations. Plant Transcription Factors: Evolutionary, Structural and Functional Aspects*, (1st ed., Ed: D.H. Gonzalez), Elsevier, Amsterdam, pp.: 343–356.
- Ribone, P. A., Capella, M. & Chan, R. L. (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, J. L. (2006). *Transcription Factors of Arabidopsis and Rice: A Genomic Perspective*. Annual Plant Reviews, chapter 2 (Willey Eds.) 29, 28–53.
- Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R. R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J. Z., Ghandehari, D., Sherman, B. K. & Yu, G. (2000). Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290(5499), 2105–2110.
- Ritte, G., Lloyd, J. R., Eckermann, N., Rottmann, A., Kossmann, J. & Steup, M. (2002). The starch-related R1 protein is an  $\alpha$ -glucan, water dikinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 7166–7171.
- Roldán, I., Wattebled, F., Mercedes Lucas, M., Delvallé, D., Planchot, V., Jiménez, S., Pérez, R., Ball, S., D'Hulst, C. & Mérida, A. (2007). The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of Arabidopsis thaliana suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation. *The Plant Journal*, 49(3), 492–504.
- Rottmann, T. M., Fritz, C., Lauter, A., Schneider, S., Fischer, C., Danzberger, N., Dietrich, P., Sauer, N. & Stadler, R. (2018). Protoplast-Esculin Assay as a New Method to Assay Plant Sucrose Transporters: Characterization of AtSUC6 and AtSUC7 Sucrose Uptake Activity in Arabidopsis Col-0 Ecotype. *Frontiers in Plant Science*, 9, 430.
- Ruan, Y. L. (2014). Sucrose Metabolism: Gateway to Diverse Carbon Use and Sugar Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 65(1), 33–67.
- Ruonala, R., Ko, D. & Helariutta, Y. (2017). Genetic Networks in Plant Vascular Development. *Annual Review of Genetics*, 51, 335–359.
- Rushton, P. J., Somssich, I. E., Ringler, P. & Shen, Q. J. (2010). WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science*, 15(5), 247–258.
- Russinova, E., Borst, J. W., Kwaaitaal, M., Caño-Delgado, A., Yin, Y., Chory, J. & de Vries, S. C. (2004). Heterodimerization and endocytosis of Arabidopsis brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1). *The Plant Cell* 16, 3216–3229
- Sablowski, R. (2016). Coordination of plant growth and development by cell polarity and tissue patterning. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 32, 337–363.
- Sachs, T. (1981). The control of the patterned differentiation of vascular tissues. *Advances in Botanical Research*, 9, 151–262.
- Saito, M., Kondo, Y. & Fukuda, H. (2018). BES1 and BZR1 redundantly promote phloem and xylem differentiation. *Plant and Cell Physiology*, 59, 590–600.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

- Sambrook, J. & Russell, D. (2000). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.
- Sanz Molinero, A.I., Reuzeau, C., Frankard, V. & Mironov, V. (2016). Plants having improved characteristics and method for making the same. *U.S. Patent US 2016/0369293*.
- Sauer, N., Ludwig, A., Knoblauch, A., Rothe, P., Gahrtz, M. & Klebl, F. (2004). AtSUC8 and AtSUC9 encode functional sucrose transporters, but the closely related AtSUC6 and AtSUC7 genes encode aberrant proteins in different Arabidopsis ecotypes. *The Plant Journal*, 40(1), 120–130.
- Scarpella, E., Marcos, D., Friml, J. & Berleth, T. (2006). Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport. *Genes and Development*, 20(8), 1015–1027.
- Schena, M. & Davis, R. W. (1992). HD-Zip proteins: members of an Arabidopsis homeodomain protein superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(9), 3894–3898.
- Schuetz, M., Benske, A., Smith, R. A., Watanabe, Y., Tobimatsu, Y., Ralph, J., Demura, T., Ellis, B. & Samuels, A. L. (2014). Laccases direct lignification in the discrete secondary cell wall domains of protoxylem. *Plant Physiology*, 166(2), 798-807.
- Schuetz, M., Smith, R. & Ellis, B. (2012). Xylem tissue specification, patterning, and differentiation mechanisms. *Journal of Experimental Botany*, 64, 11–31.
- Siloto, R. M., Findlay, K., Lopez-Villalobos, A., Yeung, E. C., Nykiforuk, C. L. & Moloney, M. M. (2006). The accumulation of oleosins determines the size of seed oilbodies in Arabidopsis. *The Plant Cell* 18, 1961–1974.
- Silva-Navas, J., Moreno-Risueno, M. A., Manzano, C., Pallero-Baena, M., Navarro-Neila, S., Téllez-Robledo, B., Garcia-Mina, J. M., Baigorri, R., Gallego, F. J. & Del Pozo, J. C. (2015). D-root: a system for cultivating plants with the roots in darkness or under different light conditions. *The Plant Journal* 84, 244–255.
- Söderman, E., Mattsson, J. & Engström, P. (1996). The Arabidopsis homeobox gene AtHB-7 is induced by water deficit and by abscisic acid. *The Plant Journal*, 10(2), 375–381.
- Sonnewald, U. & Fernie, A. R. (2018) Next-generation strategies for understanding and influencing source-sink relations in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 43, 63-70.
- Srivastava, A. C., Dasgupta, K., Ajieren, E., Costilla, G., McGarry, R. C. & Ayre, B. G. (2009). Arabidopsis plants harbouring a mutation in AtSUC2, encoding the predominant sucrose/proton symporter necessary for efficient phloem transport, are able to complete their life cycle and produce viable seed. *Annals of Botany*, 104(6), 1121-1128.
- Srivastava, A. C., Ganesan, S., Ismail, I. O. & Ayre, B. G. (2008). Functional characterization of the Arabidopsis thaliana AtSUC2 Suc/H<sup>+</sup> symporter by tissue-specific complementation reveals an essential role in phloem loading but not in long-distance transport. *Plant Physiology*, 147, 200–211.
- Stadler, R. & Sauer, N. (1996). The Arabidopsis thaliana AtSUC2 Gene is Specifically Expressed in Companion Cells. *Botanica Acta*, 109(4), 299–306.
- Stitt, M., Lunn, J. & Usadel, B. (2010). Arabidopsis and primary photosynthetic metabolism - more than the icing on the cake. *The Plant Journal*, 61(6), 1067–1091.
- Stitt, M. & Zeeman, S. C. (2012). Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(3), 282–292.

- Sosso, D., Luo, D., Li, Q. B., Sasse, J., Yang, J., Gendrot, G., Suzuki, M., Koch, K. E., McCarty, D. R., Chourey, P. S., Rogowsky, P. M., Ross-Ibarra, J., Yang, B. & Frommer, W. B. (2015) Seed filling in domesticated maize and rice depends on SWEET-mediated hexose transport. *Nature Genetics* 47, 1489–1493.
- Spies, F. P., Raineri, J., Miguel, V. N., Cho, Y., Hong, J. C. & Chan, R. L. (2022). The Arabidopsis transcription factors AtPHL1 and AtHB23 act together promoting carbohydrate transport from pedicel-silique nodes to seeds. *Plant Science*, 315, 111133.
- Suzuki, N., Rivero, R. M., Shulaev, V., Blumwald, E. & Mittler, R. (2014). Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist*, 203, 32–43.
- Strand, A., Hurry, V., Henkes, S., Huner, N., Gustafsson, P., Gardeström, P. & Stitt, M. (1999). Acclimation of Arabidopsis leaves developing at low temperatures. Increasing cytoplasmic volume accompanies increased activities of enzymes in the Calvin cycle and in the sucrose-biosynthesis pathway. *Plant Physiology*, 119(4), 1387-98.
- Swarup, R. & Bhosale, R. (2019). Developmental roles of AUX1/LAX auxin influx carriers in plants. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1306.
- Szekeres, M., Németh, K., Koncz-Kálmán, Z., Mathur, J., Kauschmann, A., Altmann, T., Rédei, G. P., Nagy, F., Schell, J. & Koncz, C. (1996). Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in Arabidopsis. *Cell* 85, 171-182.
- Tamaoki, D., Karahara, I., Nishiuchi, T., Wakasugi, T., Yamada, K. & Kamisaka, S. (2014). Effects of hypergravity stimulus on global gene expression during reproductive growth in Arabidopsis. *Plant Biology*, 16(1), 179–186.
- Tan, B. C., Joseph, L. M., Deng, W. T., Liu, L., Li, Q. B., Cline, K. & McCarty, D. R. (2003). Molecular characterization of the Arabidopsis 9-cis epoxycarotenoid dioxygenase gene family. *The Plant Journal*, 35(1), 44–56.
- Tan, Q. K. G. & Irish, V. F. (2006). The Arabidopsis Zinc Finger-Homeodomain Genes Encode Proteins with Unique Biochemical Properties That Are Coordinately Expressed during Floral Development. *Plant Physiology*, 140(3), 1095–1108.
- Taylor-Teeples, M., Lin, L., de Lucas, M., Turco, G., Toal, T. W., Gaudinier, A., Young, N. F., Trabucco, Veling, M. T., Lamothe, R., Handakumbura, P. P., Xiong, G., Wang, C., Corwin, J., Tsoukalas, A., Zhang, L., Ware, D., Pauly, M., Kliebenstein, D. J., Dehesh, K., Tagkopoulos, I., Breton, G., Pruneda-Paz, J. L., Ahnert, S. E., Kay, S. A., Hazen, S. P. & Brady, S. M. (2015). An Arabidopsis gene regulatory network for secondary cell wall synthesis. *Nature*, 517(7536), 571-575.
- Telewski, F. W. (2006). A unified hypothesis of mechanoperception in plants. *American Journal of Botany*, 93(10), 1466–1476.
- Thonglim, A., Delzon, S., Larter, M., Karami, O., Rahimi, A., Offringa, R., Keurentjes, J. J. B., Balazadeh, S., Smets, E. & Lens, F. (2021). Intervessel pit membrane thickness best explains variation in embolism resistance amongst stems of Arabidopsis thaliana accessions. *Annals of Botany*, 128, 171–182.
- Tian, T., Liu, Y., Yan, H., You, Q., Yi, X., Du, Z., Xu, W. & Su, Z. (2017). agriGO v2.0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W122–W129.

- Tiessen, A., Gómez-Mereino, F. C., Trejo-Téllez, L. I., López-Fabres, A., Padilla Chacón, D., Vargas-Ortiz, E. & Palacios-Rojas, N. (2009). *Fundamentos y metodologías innovadoras para el mejoramiento genético de maíz*. Editorial Fundación Ciencia Activa.
- Tran, L. S., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S. D., Fujita, Y., Maruyama, K., Fujita, M., Seki, M., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki K. (2004). Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *The Plant Cell* 16, 2481–2498.
- Tron, A. E., Welchen, E. & Gonzalez, D. H. (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.
- Turner, S., Gallois, P. & Brown, D. (2007). Tracheary element differentiation. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 407–433.
- Uauy, C., Nelissen, H., Chan, R. L., Napier, J. A., Seung, D., Liu, L. & McKim, S. M. (2025). Challenges of translate Arabidopsis insights into crop, *The Plant Cell*, 37, 761–772.
- Valifard, M., Le Hir, R., Müller, J., Scheuring, D., Neuhaus, H. E. & Pommerrenig, B. (2021). Vacuolar fructose transporter SWEET17 is critical for root development and drought tolerance. *Plant Physiology*, 187(4), 2716-2730.
- Van Bel, A. J. E. & Knoblauch, M. (2000). Sieve element and companion cell: the story of the comatose patient and the hyperactive nurse. *Functional Plant Biology*, 27(6), 477–487.
- van Es, S. W., Muñoz-Gasca, A., Romero-Campero, F. J., González-Grandío, E., de Los Reyes, P., Tarancón, C., van Dijk, A. D. J., van Esse, W., Pascual-García, A., Angenent, G. C., Immink, R. G. H. & Cubas, P. (2024). A gene regulatory network critical for axillary bud dormancy directly controlled by Arabidopsis BRANCHED1. *New Phytologist*, 241(3), 1193–1209.
- Vanneste, S. & Friml, J. (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell*, 136(6), 1006–1016.
- Vaseva, I. I., Balzhyk, H., Trailova, M., Nikolova, T., Katerova, Z., Galabova, S., Todorova, D., Sergiev, I. & Vassileva, V. (2025). Ethylene Signaling Modulates Dehydrin Expression in Arabidopsis thaliana Under Prolonged Dehydration. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(9), 4148.
- Verma, V., Ravindran, P. & Kumar, P. P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biology*, 16, 86.
- Vollbrecht, E., Veit, B., Sinha, N. & Hake, S. (1991). The developmental gene Knotted-1 is a member of a maize homeobox gene family. *Nature*, 350(6315), 241–243.
- Vriet, C., Welham, T., Brachmann, A., Pike, M., Pike, J., Perry, J., Parniske, M., Sato, S., Tabata, S., Smith, A. M. & Wang, T.L. (2010). A suite of Lotus japonicus starch mutants reveals both conserved and novel features of starch metabolism. *Plant Physiology*, 154, 643-655.
- Vu, D. P., Martins Rodrigues, C., Jung, B., Meissner, G., Klemens, P. A. W., Holtgräwe, D., Fürtauer, L., Nägele, T., Nieberl, P., Pommerrenig, B. & Neuhaus, H. E. (2020). Vacuolar sucrose homeostasis is critical for plant development, seed properties, and night-time survival in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 71(16), 4930–4943.
- Wang, L., Lu, Q., Wen, X. & Lu, C. (2015). Enhanced Sucrose Loading Improves Rice Yield by Increasing Grain Size. *Plant Physiology*, 169(4), 2848–2862.

- Wang, L., Wang, B., Yu, H., Guo, H., Lin, T., Kou, L., Wang, A., Shao, N., Ma, H., Xiong, G., Li, X., Yang, J., Chu, J. & Li, J. (2020). Transcriptional regulation of strigolactone signalling in Arabidopsis. *Nature*, 583, 277–281.
- Wang, S., Liu, S., Wang, J., Yokosho, K., Zhou, B., Yu, Y. C., Liu, Z., Frommer, W. B., Ma, J. F., Chen, L. Q., Guan, Y., Shou, H. & Tian, Z. (2020). Simultaneous changes in seed size, oil content and protein content driven by selection of SWEET homologues during soybean domestication. *National Science Review*, 7, 1776–1786.
- Wang, Y., Sun, S., Zhu, W., Jia, K., Yang, H. & Wang, X. (2013). Strigolactone/MAX2-induced degradation of brassinosteroid transcriptional effector BES1 regulates shoot branching. *Developmental Cell*, 27, 681–688.
- Wang, Y., Zhang, Y., Huang, G., Wang, J., Lv, L., Zhao, S., Lu, X., Zhang, M., Guo, M., Zhang, C., Men, Q., Guo, X. & Zhao, C. (2025). Association analysis of maize stem vascular bundle micro-characteristics with yield components based on micro-CT and identification of related genes. *Scientific Reports*, 15(1), 13009.
- Wang, Z. Y., Nakano, T., Gendron, J., He, J., Chen, M., Vafeados, D., Yang, Y., Fujioka, S., Yoshida, S., Asami, T. & Chory, J. (2002). Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Developmental Cell* 2, 505-513.
- Wang, Z. Y., Seto, H., Fujioka, S., Yoshida, S. & Chory J. (2001). BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature* 410, 380-383.
- Wardlaw, I. F. (1990). Tansley Review No. 27. The control of carbon partitioning in plants. *New Phytologist*, 116(3), 341–381.
- Wiese, A., Christ, M. M., Virnich, O., Schurr, U. & Walter, A. (2007). Spatio-temporal leaf growth patterns of Arabidopsis thaliana and evidence for sugar control of the diel leaf growth cycle. *New Phytologist* 174, 752–761.
- Wu, G., Tian, N., She, F., Cao, A., Wu, W., Zheng, S. & Yang, N. (2023). Characteristics analysis of Early Responsive to Dehydration genes in Arabidopsis thaliana (AtERD). *Plant Signaling and Behavior*, 18(1), 2105021.
- Xie, B., Wang, X., Zhu, M., Zhang, Z. & Hong, Z. (2011). CalS7 encodes a callose synthase responsible for callose deposition in the phloem. *The Plant Journal* 65, 1–14.
- Xu, Y., Berkowitz, O., Narsai, R., De Clercq, I., Hooi, M., Bulone, V., Van Breusegem, F., Whelan, J. & Wang, Y. (2019). Mitochondrial function modulates touch signalling in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 97(4), 623–645.
- Yang, F., Mitra, P., Zhang, L., Prak, L., Verhertbruggen, Y., Kim, J. S., Sun, L., Zheng, K., Tang, K., Auer, M., Scheller, H. V. & Loqué, D. (2013). Engineering secondary cell wall deposition in plants. *Plant Biotechnology Journal* 11, 325–335.
- Yang, J., Luo, D., Yang, B., Frommer, W. B. & Eom, J. S. (2018). SWEET11 and 15 as key players in seed filling in rice. *New Phytologist*, 218, 604–615.
- Yang, X., Makaroff, C. & Ma, H. (2003). The Arabidopsis MALE MEIOCYTE DEATH1 Gene Encodes a PHD-Finger Protein That Is Required for Male Meiosis. *The Plant Cell*, 15(6), 1281–1295.
- Yaschenko, A. E., Alonso, J. M. & Stepanova, A. N. (2025). Arabidopsis as a model for translational research. *The Plant Cell*, 37, 761–772.

- Yin, Y., Wang, Z. Y., Mora-Garcia, S., Li, J., Yoshida, S., Asami, T. & Chory, J. (2002). BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell* 109, 181-191.
- Zandalinas, S. I. & Mittler, R. (2022). Plant responses to multifactorial stress combination. *New Phytologist*, 234(4), 1161-1167.
- Zhai, L., Yan, A., Shao, K., Wang, S., Wang, Y., Chen, Z. H. & Xu, J. (2023). Large Vascular Bundle Phloem Area 4 enhances grain yield and quality in rice via source-sink-flow. *Plant Physiology*, 191(1), 317-334.
- Zhai, Z., Liu, H. & Shanklin, J. (2021). Ectopic Expression of OLEOSIN 1 and Inactivation of GBSS1 Have a Synergistic Effect on Oil Accumulation in Plant Leaves. *Plants (Basel, Switzerland)*, 10(3), 513.
- Zhai, Z., Liu, H., Xu, C. & Shanklin, J. (2017). Sugar Potentiation of Fatty Acid and Triacylglycerol Accumulation. *Plant Physiology*, 175(2):696-707.
- Zhao, S., Wang, H., Jia, X., Gao, H., Mao, K., & Ma, F. (2021). The HD-Zip I transcription factor MdHB7-like confers tolerance to salinity in transgenic apple (*Malus domestica*). *Physiologia Plantarum* 172, 1452–1464.
- Zhao, Y., Ma, Q., Jin, X., Peng, X., Liu, J., Deng, L., Yan, H., Sheng, L., Jiang, H. & Cheng, B. (2014). A novel maize homeodomain-leucine zipper (HD-Zip) I gene, *Zmhdz10*, positively regulates drought and salt tolerance in both rice and *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 55, 1142–1156.
- Zhdanov, O., Blatt, M. R., Zare-Behtash, H. & Busse, A. (2022). Unidirectional versus bidirectional brushing: Simulating wind influence on *Arabidopsis thaliana*. *Quant Plant Biology*, 3:e7.
- Zhou, F., Lin, Q., Zhu, L., Ren, Y., Zhou, K., Shabek, N., Wu, F., Mao, H., Dong, W., Gan, L., Ma, W., Gao, H., Chen, J., Yang, C., Wang, D., Tan, J., Zhang, X., Guo, X., Wang, J., Jiang, L., Liu, X., Chen, W., Chu, J., Yan, C., Ueno, K., Ito, S., Asami, T., Cheng, Z., Wang, J., Lei, C., Zhai, H., Wu, C., Wang, H., Zheng, N. & Wan, J. (2013). D14-SCF 10 (D3)-dependent degradation of D53 regulates strigolactone signalling. *Nature*, 504(7480), 406–410.
- Zhu, J. K. (2016). Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 167, 313–324.
- Zhu, Q., Zhang, J., Gao, X., Tong, J., Xiao, L., Li, W. & Zhang, H. (2010). The *Arabidopsis* AP2/ERF transcription factor RAP2.6 participates in ABA, salt and osmotic stress responses. *Gene*, 457(1-2), 1–12.
- Zhu, Y., Huang, P., Guo, P., Chong, L., Yu, G., Sun, X., Hu, T., Li, Y., Hsu, C. C., Tang, K., Zhou, Y., Zhao, C., Gao, W., Tao, W. A., Mengiste, T., & Zhu, J. K. (2020). CDK8 is associated with RAP2.6 and SnRK2.6 and positively modulates abscisic acid signaling and drought response in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 228(5), 1573–1590.