

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del grado académico de Doctora en Ciencias Biológicas

Influencia de los patrones de expresión, la conservación y la divergencia de secuencias de los factores de transcripción HD-Zip I de *Arabidopsis thaliana* sobre su función biológica

Lic. Pamela Ribone

Directora: Dra. Raquel Chan
Instituto de Agrobiotecnología del Litoral

- 2016 -

*A mi familia, los que están y los que ya no, por
convertirme en la persona que soy hoy.*

A Fer, por estar siempre...

Agradecimientos

*“En el fondo, los científicos somos gente con suerte:
podemos jugar a lo que queremos durante toda la vida.”*

Lee Smolin

Quiero agradecer primero a las Instituciones que hicieron posible el desarrollo de esta Tesis Doctoral:

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral por permitirme realizar mi carrera de posgrado.

Al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (CONICET/UNL), por darme un espacio donde poder formarme y brindarme sus instalaciones para realizar este trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) por otorgarme la beca de posgrado que me permitió dedicarme a esta tarea.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por los subsidios otorgados a los proyectos que incluyen el presente trabajo de Tesis.

A Argentina y todos sus habitantes, por permitirme recibir una educación pública de calidad desde mis primeros años de vida y hasta hoy.

A todos los que hicieron posible esta Tesis Doctoral...

A mi Directora, Dra. Raquel L. Chan, por toda la confianza que depositó en mí cuando me recibió en su laboratorio y me dió la posibilidad de realizar esta Tesis. Por su energía y vocación y por todas las enseñanzas que me brindó a lo largo de este tiempo.

Al Dr. Pablo Manavella y al Dr. Federico Ariel, por su optimismo, sus comentarios constructivos, sus consejos y su ayuda incondicional.

A Mati, por todas las enseñanzas y discusiones científicas que tuvimos y seguimos teniendo. Por todas y cada una de las veces que lo molesté con mis preguntas y por la paciencia con la que respondió cada una de ellas...

A Toto, por responder las preguntas, por estar ahí siempre para solucionar hasta el menor problema, por su buen humor constante, las charlas y los consejos...

A Jesi, por su alegría constante, su sencillez, por brindarme su amistad desde el primer día, por enseñarme y escucharme en cada etapa de estos cinco años...

A Juli, Cele, Delfi y Vero, por la cálida bienvenida que supieron darme cuando apenas llegaba, por todas las veces que alegraron los días de trabajo con sus charlas y discusiones, por estar siempre que lo necesité...

A Agus y Kari, por las charlas y discusiones tan interesantes, por su predisposición constante, por su visión analítica que tanto me ayudó en estos años...

A Flor y Virgi, por traerle frescura al laboratorio estos últimos años, por su alegría, por el entusiasmo con el que trabajan cada día. Por brindarme su amistad...

A Mabel y Maxi, por su predisposición a ayudarme y enseñarme en todo momento, por las todas las charlas formales e informales compartidas...

A Javi y a Facu, por sus consejos y sus críticas constructivas...

A Guille, por todas las charlas alocadas, ocurrencias, risas y la amistad compartida en su paso por el lab...

A Cati, Lucas y Gabi, los más nuevitos en el laboratorio, por el entusiasmo que muestran cada día y la buena onda que le imprimen a todo lo que hacen...

A Emi, Manuel, Moni, Pablo y Seba por su buena onda y asistencia constante...

A los miembros del IAL, por su buena onda y predisposición a responder dudas y solucionar problemas; por todos los comentarios constructivos recibidos este tiempo...

A los compañeros de la Facultad y de otros ámbitos académicos...

A Eli y Nori, por brindarme su amistad desde el día en que llegué al instituto, por los consejos, las charlas y las risas compartidas...

A Graciela, Rosa, Marta y Caro por compartir sus conocimientos de manera tan generosa y acompañarme en la tarea docente con tanto entusiasmo...

A Vivi, Malena, Flor, Nico, Damián y Mari que supieron guiarme cuando estaba dando mis primeros pasos en la ciencia...

A mi familia y amigos...

A mi papá, Jorge, que sin él esto no hubiera sido posible. Por apoyarme en todo lo que emprendo, por estar presente en cada momento que lo necesité, aún en la distancia. Por enseñarme a ser lo que soy...

A mi mamá, Adriana, que aunque ya no está supo transmitirme su amor por la biología y por la enseñanza. Sé que le habría encantado transitar esta etapa conmigo, que hubiera estado fascinada con cada imagen de confocal o técnica que le hubiera contado. Por enseñarme a ser lo que soy...

A mis hermanos, César y Andrés, porque cada uno con sus particularidades me acompañaron también en esta etapa y representaron una gran compañía...

A mi tío Juan, por todo el entusiasmo que mostraste cada vez que te contaba algo del trabajo, por el interés con el que preguntabas, escuchabas, y me mandabas artículos. Por todos los viajes y la compañía...

A mi tía Susana y mi prima Caro, por oficiar de madres, tías, amigas, hermanas... Por el apoyo constante y el cariño que me dan...


A los más pequeños, Santi, Vicky y Fran, por alegrarme el día cada vez que puedo compartir un tiempo con ustedes...

A mis amigas Flor y Meli, que bancaron todas y cada una de mis locuras, y que con su amor y paciencia me permitieron superar varias "crisis". Por todas las risas y lindos momentos que compartimos, por seguir conmigo a pesar de la distancia...

A Dani, Lu y Juan, que sin ustedes todavía estaría tratando de rendir las materias de la facu! Por la amistad que logramos incluso a través del tiempo y la distancia...

A Yani, por ser mi compañera de aprendizaje durante todo el año de practicanato y por la amistad que aún hoy perdura...

A Fer, compañero en todo... Por soportar mis frustraciones, llantos y enojos, por guiarme y aconsejarme en este proceso, por ser mi cable a tierra cada vez que lo necesito... Por tu paciencia, tolerancia, por pensar siempre en mí y por apoyarme en cada locura que emprendo... Por darme todo tu amor...



**Contenido,
antecedentes y
abreviaturas**

Contenido

Contenido, antecedentes y abreviaturas	1
Contenido.....	2
Antecedentes.....	6
Abreviaturas.....	8
Resumen y Abstract	10
Resumen.....	11
Abstract.....	14
Introducción general.....	16
El desarrollo vegetal.....	17
<i>Arabidopsis thaliana</i> : una planta modelo.....	18
Regulación de la expresión génica	19
Regulación transcripcional de la expresión génica	21
Los factores de transcripción.....	22
Los factores de transcripción con homeodominios	22
Homeodominios en plantas	23
La familia HD-Zip.....	24
La subfamilia HD-Zip I.....	25
La subfamilia HD-Zip I y las condiciones ambientales	27
La subfamilia HD-Zip I y el desarrollo vegetal	28
Regulación post-transcripcional de la expresión proteica.....	29
Hipótesis y objetivos	31
Hipótesis	32
Objetivos generales.....	32
Objetivos específicos	33
Materiales y métodos	35
Material utilizado	36
Cepas bacterianas	36
Medios de cultivo	36
Vectores utilizados	37
Material vegetal utilizado	39
Mutantes de <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
Oligonucleótidos	40
Construcciones genéticas realizadas.....	46
Construcciones genéticas para plantas	46

Métodos utilizados para el trabajo con ácidos nucleicos y proteínas	48
Transformación de bacterias	48
Obtención y cuantificación de ácidos nucleicos.....	48
Reacciones enzimáticas	51
Análisis de ácidos nucleicos.....	53
Obtención y cuantificación de proteínas	56
Métodos utilizados para el trabajo con material vegetal.....	56
Obtención de material vegetal y condiciones de cultivo.....	56
Análisis de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	60
Soluciones utilizadas.....	64
Capítulo 1: El factor de transcripción AtHB13 cumple un papel importante en el desarrollo de la planta durante el estadio reproductivo	66
Introducción	67
Los factores de transcripción HD-Zip I AtHB13 y AtHB23.....	67
La vara floral de <i>Arabidopsis thaliana</i>	68
Polinización en <i>Arabidopsis</i>	69
Resultados.....	71
La vara floral de plantas mutantes <i>athb13</i> crece más rápido que en plantas salvajes.....	71
La mayor elongación de la vara floral en las mutantes <i>athb13</i> se debe a una mayor tasa de división celular.....	75
AtHB23 también regula negativamente la elongación de la vara floral.....	77
Las plantas mutantes <i>athb13-1</i> presentan silicuas más cortas, menos semillas y mayor cantidad de óvulos no fertilizados que sus controles	79
La presencia de óvulos no fertilizados en las plantas <i>athb13-1</i> se debe a una deficiencia en la germinación de polen	80
El déficit en el crecimiento del polen se debe a una interacción anormal entre el grano de polen y el estigma que impide la correcta hidratación del grano	82
AtHB13 se expresa en el tapetum de las anteras durante ciertos estadios florales.....	85
AtHB13 es capaz de revertir el fenotipo de los granos de polen en plantas mutantes <i>athb13-1</i>	86
AtHB23 es capaz de reemplazar a AtHB13 en su función en la hidratación de polen	87
El análisis del transcriptoma de las mutantes <i>athb13-1</i> indica que AtHB13 regula genes involucrados en la diferenciación celular y el transporte.....	90
Dos triptófanos dentro del motivo AHA de AtHB13 son esenciales para su función	93

AtHB13 también cumple un rol en el desarrollo y crecimiento de la raíz principal de <i>Arabidopsis thaliana</i>	94
Discusión	96
Capítulo 2: AtHB13 regula la expresión de <i>JUB1</i>, un factor de transcripción de la familia NAC	100
Introducción	101
Resultados	104
AtHB13 es capaz de unir el promotor de <i>JUB1</i>	104
La sobreexpresión de <i>JUB1</i> confiere tolerancia al estrés hídrico en <i>Arabidopsis thaliana</i>	106
La tolerancia a estrés hídrico de las plantas <i>AT13</i> está mediada en parte por <i>JUB1</i>	110
La tolerancia a sequía conferida por la sobreexpresión de <i>JUB1</i> no está mediada por <i>PR2</i> ni por <i>PR4</i>	111
Discusión	113
Capítulo 3: Un marco de lectura abierto presente en la región 5' no codificante de <i>AtHB1</i> regula negativamente la traducción del marco de lectura principal	116
Introducción	117
La función de AtHB1 en plantas	117
Marcos abiertos de lectura y péptidos conservados en las regiones no codificantes de los genes de plantas	118
Los mecanismos de acción de los uORFs	119
Resultados	121
El gen <i>AtHB1</i> presenta un péptido conservado en su región 5'UTR denominado CPuORF33	121
La expresión de <i>AtHB1</i> está regulada por el CPuORF33	124
El CPuORF33 reprime la traducción del ORF principal corriente abajo	129
El CPuORF33 reprime la traducción del ORF principal mediante un mecanismo de trabado del ribosoma	132
El CPuORF33 tiene un accionar tejido-específico en <i>Arabidopsis thaliana</i>	138
La sobreexpresión de <i>AtHB1</i> es perjudicial para la reproducción de la planta	140
Discusión	143
Conclusiones generales	144
Bibliografía	144
Anexos	144

Anexo 1: Genes expresados diferencialmente en inflorescencias <i>athb13-1</i> respecto inflorescencias WT	171
Anexo 2: Genes expresados diferencialmente en inflorescencias <i>athb13-1</i> y descritos como involucrados en la hidratación y germinación de polen.....	179
Anexo 3: Secuencias de los diferentes homólogos de <i>AtHB1</i> utilizados en el análisis bioinformático	180
Anexo 4: Propiedades de los uORFs encontrados en genes homólogos a <i>AtHB1</i>	182

Antecedentes

El trabajo de investigación que se describe con este manuscrito de Tesis para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas fue desarrollado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (UNL-CONICET) y en la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.

Los resultados obtenidos durante este trabajo de Tesis fueron dados a conocer parcialmente en los siguientes artículos, capítulos y presentaciones en congresos:

Artículos publicados en revistas científicas

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

Silva AT, **Ribone PA**, Chan RL, Ligterink W, Hilhorst HW. (2016) *A Predictive Coexpression Network Identifies Novel Genes Controlling the Seed-to-Seedling Phase Transition in Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology 170: 2218-2231.

Ribone PA, Capella M, Chan RL. *The expression of the homeodomain-leucine zipper transcription factor AtHB1 is finely post transcriptionally regulated by an uORF located in the 5'UTR to avoid an aberrant developmental phenotype*. (En preparación)

Capítulos de libro

Ribone PA, Capella M, Arce AL, Chan RL. (2015) *What do we know about homeodomain-leucine zipper I transcription factors? Functional and biotechnological considerations*. En: *Plant Transcription Factors. Evolutionary, structural and functional aspects*. (González, DH) Elsevier, Amsterdam, Países Bajos, p. 343-356.

Capella M, **Ribone PA**, Arce AL, Chan RL. (2015) *Homeodomain-Leucine zipper transcription factors: Structural features of these proteins, unique to plants*. En: *Plant Transcription Factors. Evolutionary, structural and functional aspects*. (González, DH) Elsevier. Amsterdam, Países Bajos, p. 113-126.

Publicaciones relacionadas con el trabajo de tesis

Capella M, **Ribone PA**, Arce AL, Chan RL. (2015) *Arabidopsis thaliana HomeoBox 1 (AtHB1), a Homeodomain-Leucine Zipper I (HD-Zip I) transcription factor, is regulated by PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 1 to promote hypocotyl elongation*. New Phytologist 207:669-682.

Romani F, **Ribone PA**, Chan RL. (2016) *A matter of quantity: Common features in the drought response of transgenic plants overexpressing HD-Zip I transcription factor*. Plant Science 251: 139-154.

Presentaciones en congresos y disertaciones

Ribone PA, Chan RL. “*Functional characterization of the HD-Zip transcription factor AtHB13*”. Argentine Society for Biochemistry and Molecular Biology scientific meeting SAIB 2013, Buenos Aires. Noviembre de 2013. Póster.

Capella M, Ré DA, Ribone P, Arce AL, Cabello JV, Giacomelli JI, Mora C, Moreno JE, Chan RL. “*Secrets of the plant family of transcription factors homeodomain-leucine zipper I*” Argentine Society for Biochemistry and Molecular Biology scientific meeting SAIB 2013, Buenos Aires. Noviembre de 2013. Conferencia.

Ribone, PA, Chan RL. “*El factor de transcripción de Arabidopsis AtHB13 juega un papel fundamental para la correcta hidratación del polen*” XV congreso Latinoamericano y XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Mar del Plata. Septiembre de 2014. Póster.

Capella, M; Ribone, PA; Chan, RL. “*AtHB1, an Arabidopsis HD-Zip I Transcription Factor, is involved in hypocotyl elongation*”. XLX Reunión Anual SAIB, Rosario, Argentina, Noviembre de 2014. Comunicación oral.


Ribone, PA, Capella M, Chan RL. “*The paralog HD-Zip I transcription factors AtHB13 and AtHB23 regulate inflorescence stem elongation*”. 11th International Congress of Plant Molecular Biology. Foz do Iguazu. Octubre de 2015. Póster.

Romani, FA, Capella, M, Ribone PA, Chan RL. “*The Arabidopsis transcription factor AtHB1 plays a role in iron homeostasis*”. 11th International Congress of Plant Molecular Biology. Foz do Iguazu. Octubre de 2015. Póster.

Abreviaturas

3AT	3-Amino-1,2,4-triazol
35S	promotor del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor
5'UTR	región 5' no codificante, (del inglés 5' <i>untranslated region</i>)
ABA	ácido abscísico
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
AtHB	Arabidopsis thaliana <u>H</u> omeo <u>B</u> ox
BR	brasinoesteroides
CAP	Caperuza 5'
col.	colaboradores
CPuORF	del inglés, <i>Conserved Peptide upstream Open Reading Frame</i>
CTR	región carboxilo terminal
DO	densidad óptica
EDTA	ácido etilen-diamino-tetra-acético
FTs	factores de transcripción
GA	ácido giberelico (giberelinas)
GFP	proteína fluorescente verde (del inglés, <i>Green Fluorescence Protein</i>)
GUS	β -glucuronidasa
HD	Homeodominio
HD-Zip	Homeodominio asociado a un motivo cierre de leucinas
His	histidina
kV	kilovoltio
LB	medio Luria Bertami
LZ	cierre de leucinas, del inglés <i>Leucine Zipper</i>
M	Molar
min	minutos
MS	medio Murashige y Skoog
mORF	del inglés, <i>main Open Reading Frame</i>

NMD	decaimiento mediado por ARNm sin sentido (del inglés, <i>Nonsense-Mediated Decay</i>)
pb	pares de bases
p/v	peso en volumen
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
RNA-Seq	Secuenciación de ARN (del inglés, <i>RNA Sequencing</i>)
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio
SPT	streptomicina
TAE	solución Tris-acético-EDTA
TE	solución Tris-EDTA
Tris	N-Tris-(hidroximetil) aminoetano
T-DNA	ADN transferido, del inglés <i><u>Transfer-DNA</u></i>
uORF	del inglés, <i>upstream Open Reading Frame</i>
UV	luz ultravioleta
V	voltios
v/v	volumen en volumen
x g	fuerza centrífuga relativa



**Resumen y
Abstract**

Resumen

El control de la regulación de la expresión génica es fundamental para la supervivencia de todos los organismos vivos, ya que para desarrollarse correctamente necesitan una fina regulación de las proteínas y moléculas efectoras. En plantas, la necesidad de control sobre la expresión génica se hace más evidente ya que son organismos sésiles que no pueden utilizar el movimiento para adaptarse o contrarrestar las condiciones medioambientales y deben valerse únicamente de la modificación de su proteoma y metaboloma para responder a los distintos cambios que se presenten.

En todos los seres vivos, el control de la regulación génica se da en tres niveles diferentes: transcripcional (qué genes serán transcritos a ARN), post-transcripcional (qué ARNs serán traducidos) y post-traducciona (qué proteínas serán activas). En plantas la regulación transcripcional es la más importante e involucra un tipo de proteínas especial denominadas factores de transcripción (FTs) que reconocen secuencias específicas de ADN y regulan la expresión génica de sus blancos. La familia de FTs HD-Zip es exclusiva de plantas, por lo que resulta particularmente interesante su estudio en el contexto del desarrollo vegetal y de las respuestas moleculares a las condiciones externas. Estos FTs se caracterizan por la combinación singular de un homeodominio (HD) que permite el reconocimiento del ADN asociado a un cierre de leucinas (LZ), que actúa como un dominio de dimerización. Esta dimerización es un requisito previo esencial para la unión al ADN por parte del HD. Esta familia se divide a su vez en cuatro subfamilias. Los miembros de la subfamilia I han sido relacionados principalmente con procesos moleculares vinculados al estrés.

En este trabajo de Tesis nos planteamos caracterizar funcionalmente dos FTs de la subfamilia HD-Zip I de *Arabidopsis thaliana*: AtHB13 y AtHB23. Los genes que los codifican son parálogos entre sí y ya se había informado que compartían un patrón de expresión similar. Nuestro interés era conocer las funciones naturales de estos genes, saber si las mismas se han diversificado durante la evolución y elucidar los mecanismos moleculares puestos en juego para cumplir dichas funciones. Además, nos inquietaba saber si en este par de parálogos existe una regulación cruzada similar a la observada para otros pares de parálogos de la subfamilia HD-Zip I de *Arabidopsis*.

Con este objetivo caracterizamos plantas silenciadas en ambos genes (*athb13-1*, *athb13-2* y *miARN23*) al igual que plantas doblemente silenciadas (*miARN13/23*) y pudimos observar dos fenotipos diferenciales en estas plantas: una elongación acelerada

de la vara floral y silicuas más cortas comparadas con las de plantas salvajes. Estas herramientas nos permitieron descubrir que tanto AtHB13 como AtHB23 son necesarios para la correcta elongación de la vara floral, pero que sólo el primero es necesario para la germinación del grano de polen, aunque AtHB23 pueda suplir su función cuando AtHB13 falta. Un análisis de secuenciación masiva de ARN, hecho en plantas *athb13-1* y salvajes, nos ayudó a dilucidar parte del mecanismo molecular involucrado en estas observaciones. En el caso de AtHB13 se pudo probar que tiene como gen blanco directo a *JUB1*, un FT de la familia NAC, y que, si bien esta regulación no está involucrada en los procesos del desarrollo mediados por AtHB13, la misma es importante para generar la tolerancia a sequía descrita en trabajos previos en los que se sobreexpresó *AtHB13*.

En segundo término nos preguntamos cuál era la función del marco de lectura abierto presente en la región 5' no codificante de *AtHB1*, otro miembro de la subfamilia HD-Zip I. La presencia de este marco de lectura corriente arriba (uORF, del inglés *upstream Open Reading Frame*) ya había sido descrita, pero se desconocía tanto su función como su mecanismo de acción. En esta Tesis mostramos que la secuencia aminoacídica, y no tanto la nucleotídica, de este uORF está altamente conservada entre especies. Probamos además que el uORF es capaz de reprimir la traducción de cualquier secuencia codificante que se encuentre corriente abajo, mediante un mecanismo de acción en *cis* que involucra probablemente el trabado de ribosomas. La acción de esta pequeña secuencia es tejido-específica y sólo se observa en la parte aérea de las plantas, lo que sugiere que existe un mecanismo capaz de regular su accionar. Cuando se transformaron plantas de *Arabidopsis* con construcciones que poseen el promotor de *AtHB1* mutado en el uORF y dirigiendo la expresión de *AtHB1* se obtuvieron plantas con severas aberraciones, lo que da un contexto funcional a la represión de la traducción ejercida por el uORF.

En base a lo expuesto, pudimos concluir que tanto AtHB13 como AtHB23 cumplen funciones similares en el desarrollo normal de las plantas, algunas divergentes y otras redundantes, y que existe una fina regulación entre ellos que evita la formación de granos de polen deficientes cuando AtHB13 no es funcional. Por otro lado se demostró que *JUB1* es uno de los FTs involucrados en la cascada génica responsable de la tolerancia a sequía cuando *AtHB13* es sobreexpresado. Finalmente, los estudios mostrados en esta Tesis permitieron describir un mecanismo novedoso de regulación de

la expresión de los FTs HD-Zip I; en este caso, la represión de la traducción de *AtHBI* mediada por el uORF presente en su región 5'UTR.

Abstract

Survival and reproduction of living organisms depends on the control of gene expression since, in order to achieve a proper development, they need to finely control the effector proteins and molecules that they produce. In plants, the need of such regulation is even more important because plants are sessile organisms that cannot move to avoid adverse environmental conditions; hence, they depend on the modification of their proteome and metabolome to adapt themselves to external changes

The regulation of gene expression occurs at three different levels: Transcriptional (determining which genes will be transcribed), post-transcriptional (determining which RNAs will be translated) and post-translational (determining which proteins will be active). In plants, among regulation levels, the transcriptional one is the most important. It involves a kind of special proteins named transcription factors (TFs) that recognize specific DNA sequences in their targets regulation regions and are able to inhibit or activate entire signal transduction pathways. The HD-Zip family of TFs is unique to plants, making it very interesting in the study and comprehension of plant development and responses. Its members exhibit a singular combination of a homeodomain (HD), which allows DNA recognition, associated to a leucine zipper (LZ), acting as a dimerization domain. Dimerization is for these TFs a pre-requisite for DNA binding. HD-Zip proteins have been classified into four subfamilies according to structural features. Members of subfamily I have been mainly associated to abiotic stress responses.


In this work we planned to functionally characterize two HD-Zip I TFs from *Arabidopsis thaliana*: AtHB13 and AtHB23. Genes coding for these TFs are paralogous and they exhibit similar, but not equal, expression patterns. Our aim was to investigate the natural functions of these genes, to know whether such functions diversified during evolution and to elucidate the molecular mechanisms occurring to exert such functions. Besides, it was our interest to know if a cross regulation takes place between these paralogues as it has been observed in another pair of HD-Zip I members.

For this purpose, we obtained and characterized silenced plants in both genes (*athb13-1*, *athb13-2* and *amiRNA23*) as well as double silenced plants (*amiRNA13/23*). Two differential phenotypes were observed comparing these plants with controls: a faster elongation of the inflorescence stem and shorter siliques. These tools allowed us to discover that both AtHB13 and AtHB23 are necessary for a proper stem elongation,

but only AtHB13 is essential for pollen germination, although AtHB23 can replace *AtHB13* in this function when it is missing. A transcriptome analysis performed by RNAseq with *athb13-1* and wild type (WT) plants revealed part of the molecular mechanism through which AtHB13 and AtHB23 generated the described differential phenotypes. Moreover, we demonstrated that *JUB1*, a NAC TF, is a target of AtHB13. This interaction is not involved in the developmental events regulated by AtHB13, but plays a role in the previously described drought tolerance conferred by *AtHB13* when it is overexpressed.

Aiming at understanding how the HD-Zip I encoding genes are regulated, a deep study on the function of the upstream Open Reading frame (uORF) present in the 5' untranslated region of *AtHB1* (CPuORF33) was conducted. The existence of this uORF has already been described; however, its function and mode of action remained completely unknown. We were able to show that the aminoacidic sequence of the uORF is highly conserved among angiosperms. Experimental assays conducted with mutant and transgenic plants indicated that the uORF is able to repress translation of any main ORF (mORF) located downstream this uORF by a *cis*-acting mechanism, probably involving ribosome stalling. CPuORF33 repression action is tissue-specific and it is only observed in the aerial part of the plant, suggesting that another unknown mechanism is controlling CPuORF33 action in roots. When Arabidopsis plants were transformed with a uORF-mutated version of *AtHB1* promoter directing the expression of *AtHB1*, aberrant sterile plants were obtained. This observation could explain why *AtHB1* expression is so tightly regulated.

Finally, and considering the whole results presented here, we could conclude that both AtHB13 and AtHB23 have similar functions in plant development. Some of these functions are divergent whereas others are redundant. Moreover, there is a fine cross but not direct regulation between these genes conducting to avoid a defective pollen grain formation when *AtHB13* is not present. On the other hand, we proved that the TF *JUB1* is a target of AtHB13 in the genetic cascade responsible of the drought tolerance conferred by the overexpression of *AtHB13*. Lastly, the studies showed here revealed that *AtHB1* translation is repressed by a mechanism involving the uORF present in its 5'UTR region.



Introducción general

El desarrollo vegetal

A la mayoría de las personas nos resulta familiar la gran diversidad existente en cuanto tamaño y formas en el reino vegetal. Las plantas tienen tamaños que abarcan desde menos de un centímetro, hasta más de 100 metros y lo mismo ocurre en cuanto a su forma, lo que hace pensar a primera vista que poco hay en común entre una lentejuela de agua y una secuía, o un cactus.

Esta gran biodiversidad dentro del reino vegetal puede explicarse teniendo en cuenta que las plantas habitan la tierra desde sus comienzos y han ido desarrollándose y adaptándose al ambiente continuamente para poder sobrevivir. Algunas especies lograron adaptarse haciendo cambios en su morfología en respuesta a las modificaciones del ambiente, llegando incluso, en algunos casos, a considerarse como especies diferentes de las originales. Otras han desaparecido por completo al no poder enfrentar esos cambios del ambiente (Taiz y Zeiger, 2010).

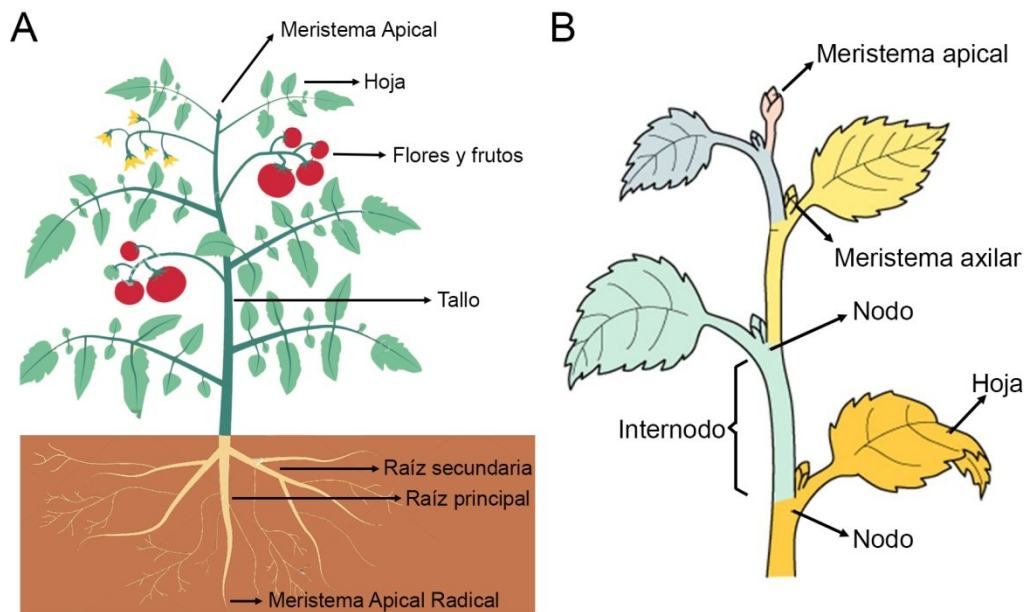
A pesar de la aparente diversidad existente, todas las espermatofitas (plantas con semillas) comparten la misma arquitectura general (**Imagen 1.A**). Durante el estadio vegetativo (antes de la floración) la planta se compone de tres órganos: raíz, tallo y hoja, cuyas funciones principales son el anclaje y absorción de agua, el soporte y la realización de la fotosíntesis, respectivamente.

Una planta vascular se forma a partir de una única célula denominada cigoto, que comienza a dividirse para formar un embrión en un proceso denominado embriogénesis. Estas divisiones no son azarosas, y las células resultantes quedan organizadas de tal manera que las de un extremo darán lugar a la primera raíz y las del extremo opuesto formarán los cotiledones (primeras hojas) de la planta. Los órganos principales se generan luego de que el embrión germina, a partir de la proliferación de los meristemas localizados en los extremos de la raíz (raíz) y del brote (tallo y hojas). Las nuevas células luego se elongarán y diferenciarán para dar forma a los distintos órganos de la planta. Si recordamos que las células vegetales se encuentran atrapadas dentro de una pared celular rígida podemos notar rápidamente la necesidad de coordinación entre los procesos de división, elongación y diferenciación celular, ya que las células permanecerán en el lugar en donde fueron originadas. Los tres procesos deben ser extremadamente ordenados y también orientados para poder producir los órganos de la planta tal como los vemos (Alberts y col., 2002).

Finalmente, una planta madura se compone de muchas copias de pequeños módulos estándar (**Imagen 1.B**) generados mediante los procesos celulares descritos arriba. La posición y los tiempos en los que esos módulos se generen es lo que se encuentra

fuertemente influenciado por el ambiente, depende de las señales externas recibidas, la acción de hormonas que llevan la señal a lo largo de la planta y la expresión diferencial de genes específicos que modularán, en última instancia, el crecimiento para permitir la supervivencia (Halle, 1986).

Imagen 1: Todas las plantas vasculares tienen los mismos tipos de órganos, dispuestos en estructuras modulares.



A. Esquema representativo de una planta con flores mostrando los diferentes órganos que la componen. Con variaciones en su forma, estos órganos se encuentran en todas las angiospermas. **B.** Esquema mostrando los diferentes módulos que conforman la parte aérea de una planta. Cada módulo (separado con distintos tonos de color) está formado por una porción de tallo, una hoja y un meristema axilar. Los meristemas se encuentran en el punto en el que la hoja se inserta en el tallo (nodo). Cada módulo surge secuencialmente a partir del meristema apical. (Adaptado de Alberts y col., 2002)

Arabidopsis thaliana: una planta modelo

A pesar de la gran diversidad existente, el estudio de la fisiología vegetal se realiza utilizando organismos modelo, plantas que poseen un ciclo de vida corto, genomas pequeños y, muchas veces, un tamaño reducido para poder crecerlas en cámaras con ambientes controlados. Estos modelos son útiles ya que todas las plantas llevan a cabo procesos similares y su arquitectura se basa en los mismos elementos (Taiz y Zeiger, 2010). *Arabidopsis thaliana* se considera una planta modelo dicotiledónea muy utilizada en investigaciones genéticas y moleculares, dado que su ciclo de vida corto permite realizar experimentos en poco tiempo y con la posibilidad de repetirlos en varias ocasiones y analizar la descendencia. Esta planta angiosperma forma parte de la familia *Brassicaceae* de la que forman parte plantas de interés comercial como la col (*Brassica oleracea*), el nabo

(*Brassica napus*) el rábano (*Raphanus sativus*) y la mostaza (*Brassica campestris*), entre otras (Meinke y col., 1998). El apelativo thaliana hace referencia a Johannes Thal, el primer botánico en describirla allá por el siglo XVI. Recién en 1943 se reconocieron sus potenciales como organismo modelo para los estudios genéticos debido a su sencillez, pequeño tamaño y facilidad de manipulación. *Arabidopsis thaliana* es una planta pequeña, de aproximadamente 30 cm de alto, con un ciclo de vida corto que dura menos de un año en condiciones salvajes y que se reduce a 2-3 meses en condiciones controladas de laboratorio. Esta planta genera una amplia progenie, ya que cada planta puede producir hasta un total de 5000 semillas, cuyo tamaño reducido facilita el almacenamiento. Además, *Arabidopsis* se reproduce mediante autopolinización, lo que da la ventaja de mantener líneas y realizar cruces controladas (Meinke y col., 1998).

En 1998, Steven Clough y Andrew Bent describieron un protocolo sumamente sencillo para generar plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. Este método, conocido como “floral dip” utiliza la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* para transformar flores inmaduras de *Arabidopsis* sumergiendo las mismas en una suspensión bacteriana. El método de transformación por inmersión floral (*floral dip*) permite obtener un gran número de semillas transformantes y generar líneas transgénicas estables, útiles para la investigación (Clough y Bent, 1998).

Además, *Arabidopsis thaliana* posee un genoma con aproximadamente 25000 genes organizados en sólo 5 cromosomas que gracias al proyecto *Arabidopsis Genome Initiative* fue totalmente secuenciado en el año 2000, convirtiéndose en el primer genoma vegetal secuenciado en su totalidad (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

Regulación de la expresión génica

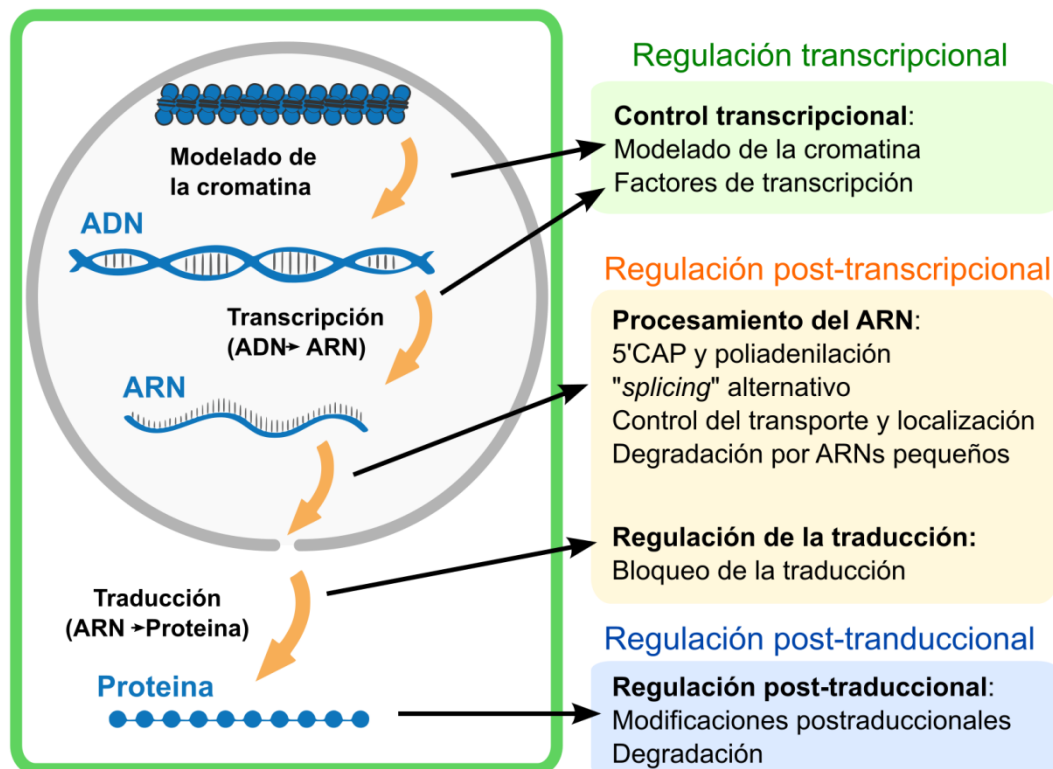
Las plantas se encuentran continuamente expuestas a diferentes condiciones medioambientales y éstas no siempre son favorables. Dado que los vegetales son organismos sésiles, no pueden utilizar el movimiento para evadir el estrés generado por factores externos. Es por eso que han desarrollado numerosos mecanismos de respuesta para afrontar mejor las distintas situaciones adversas que se presenten. Estas respuestas en general implican cambios fenotípicos para la planta, ya sea a nivel micro o macroscópico (Cheong y col., 2002; Aarts y Fiers, 2003).

El fenotipo de una planta es el resultado de tres factores importantes: su genotipo (todos los genes o alelos que posea), el patrón de modificaciones epigenéticas en su ADN y el ambiente en el que vive. En última instancia, el fenotipo de una planta en un determinado

momento estará dado por las proteínas que se hayan expresado dentro de las células, ya que prácticamente todos los procesos biológicos dependen de la presencia o actividad de este tipo de moléculas.

El dogma central de la biología molecular, postulado por Francis Crick en 1956, proponía que la información contenida en los genes de una célula se transcribe como ARN mensajero y luego este se traduce a una proteína, elemento que finalmente realiza la acción celular. Si bien esta propuesta se modificó con el paso del tiempo y el descubrimiento de elementos como la transcriptasa reversa y las ribozimas, entre otros, sus fundamentos centrales siguen siendo considerados como ciertos (Crick, 1956; Crick, 1970). Esto hace que hasta la producción de una proteína funcional existan tres puntos principales de control que regulan la expresión de la misma: uno a nivel transcripcional (a partir de qué genes se producirán ARNs mensajeros), otro a nivel post-transcripcional (cuales de los ARNs mensajeros serán efectivamente traducidos) y uno a nivel post-traducciona (qué proteínas serán activas. **Imagen 2**).

Imagen 2: Regulación de la expresión proteica en eucariotas

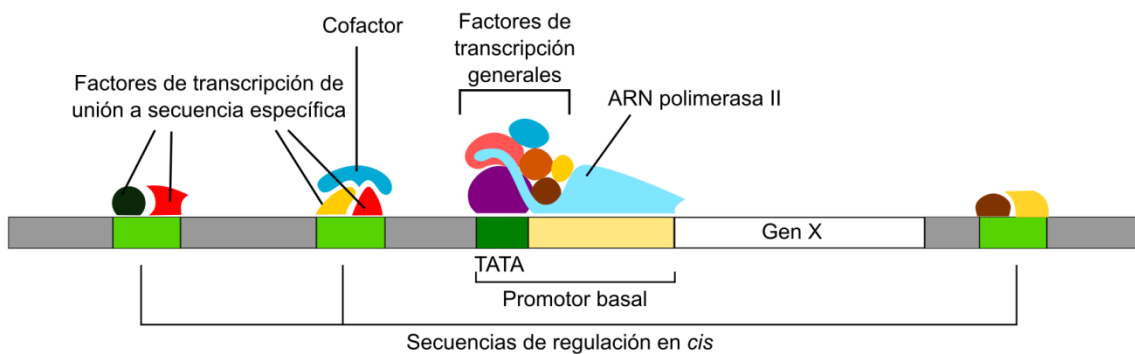


Representación esquemática de las etapas que ocurren en una célula que permiten la producción de una proteína a partir de la información codificada en el ADN. Se detallan también las etapas de regulación más importantes que sufre el proceso.

Regulación transcripcional de la expresión génica

A diferencia de otros reinos eucariotas, en vegetales es muy importante el control a nivel transcripcional. Cabe aclarar que para que ocurra la regulación a nivel transcripcional, se requiere la acción conjunta de los elementos en *cis*, secuencias cortas presentes en las regiones regulatorias de los genes, y de proteínas con actividad en *trans* que como regla general reconocen y se unen específicamente a los elementos en *cis* y median la activación o represión de la expresión de un determinado gen (Riechmann, 2002; Taiz y Zeiger, 2010). Estas proteínas pueden ser clasificadas en cuatro grupos: Factores de transcripción generales asociados a la maquinaria basal de transcripción, cofactores y coactivadores, proteínas modificadoras de la cromatina y factores de transcripción de unión a secuencias específicas de ADN (**Imagen 3**). El primer grupo de proteínas se encuentra sumamente conservado, a diferencia de lo que ocurre con los otros tres grupos, cuyos miembros son muy divergentes entre los distintos reinos eucariotas, generando en parte las diferencias entre ellos (Riechmann, 2002).

Imagen 3: Regulación transcripcional en un gen eucariota típico



Esquema representativo de un gen X mostrando los distintos elementos que intervienen en la regulación transcripcional del mismo. Adaptado de Alberts y col., 2002.

Por su parte, los factores de transcripción de unión a secuencias específicas de ADN (FTs) constituyen aproximadamente el 6 % del número total de genes de *Arabidopsis* y arroz, un porcentaje mucho mayor del encontrado en otros reinos eucariotas, lo que marca la importancia de estas proteínas en el control de la expresión proteica (Riechmann, 2002; Xiong y col., 2005; Mitsuda y Ohme-Takagi, 2009). Más aún, muchos de los cambios morfológicos que ocurrieron durante la domesticación y mejoramiento de cultivos se asocian con mutaciones en FTs o alteraciones en sus niveles de expresión (Riechmann, 2002).

Los factores de transcripción

En adelante, cuando se mencionen factores de transcripción (FTs) nos estaremos refiriendo a FTs de unión a secuencias específicas de ADN. Estos FTs son responsables de la selectividad en la regulación génica, ya que son capaces de activar o reprimir la transcripción del gen que estén uniendo y de esta forma, pueden modificar el transcriptoma de la planta, dirigiendo eventos fisiológicos complejos tales como el crecimiento o la diferenciación de órganos.

Son proteínas modulares que poseen un dominio de unión a ADN conservado (mediante el cual se clasifican en familias) y un dominio de transactivación que les permite establecer interacciones de tipo proteína-proteína, ya sea con elementos de la maquinaria basal de transcripción, cofactores o incluso proteínas modificadoras de la cromatina (Bornberg-Bauer y col., 2005). A su vez, varios tipos de FTs son capaces de formar homo o heterolígomeros y algunos presentan diversos motivos de fosforilación, sumoilación o ubiquitinación (Singh y col., 2002; Miura y Hasegawa, 2010), lo que diversifica aún más la especificidad de sus blancos y sus capacidades de activación/represión (Liu y col., 1999).

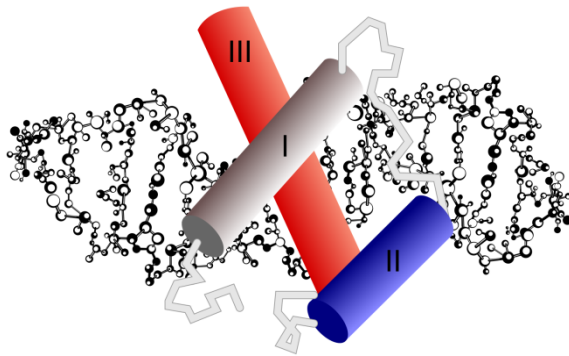
Los factores de transcripción con homeodominios

Tal como se mencionó en la sección anterior, los FTs pueden clasificarse de acuerdo al dominio de reconocimiento a ADN que posean (Riechmann, 2002). Una familia muy importante de FTs es la conformada por aquellos que poseen un homeodominio (HD) como dominio de unión al ADN.

El homeodominio, codificado por la caja homeótica (en inglés, *homeobox* o HB), consiste en un motivo conservado de 60 aminoácidos que posee una estructura terciaria formada por 3 hélices α , llamadas I, II y III, que están conectadas entre sí por dos vueltas y un rulo. Las hélices I y II se alinean en forma paralela entre sí mientras que la III se acomoda en forma perpendicular a las dos primeras; dentro de los 60 aminoácidos, los segmentos comprendidos entre los residuos 10 a 22, 28 a 38, y 42 a 59 son los que forman parte de estas tres hélices, respectivamente (Branden y Tooze, 1999). El HD es capaz de unir al ADN como monómero con elevada afinidad a través de las interacciones establecidas por la hélice III (denominada hélice de reconocimiento) con el surco mayor del ADN blanco, mientras que el brazo desordenado amino terminal, localizado corriente arriba de la primera hélice, y la vuelta

que una de las hélices I y II interactúan con el surco menor (Gehring y col., 1994. - **Imagen 4**).

Imagen 4: El homeodominio interactúa específicamente con el ADN mediante las tres α -hélices que lo componen.



Representación gráfica de la interacción entre las tres α -hélices que componen el homeodominio y el ADN que es reconocido por el mismo. Las α -hélices I (gris) y II (azul) se encuentran perpendiculares al esqueleto de azúcar-fosfato del ADN, mientras que la hélice III (rojo) establece interacciones directas con el surco mayor del ADN.

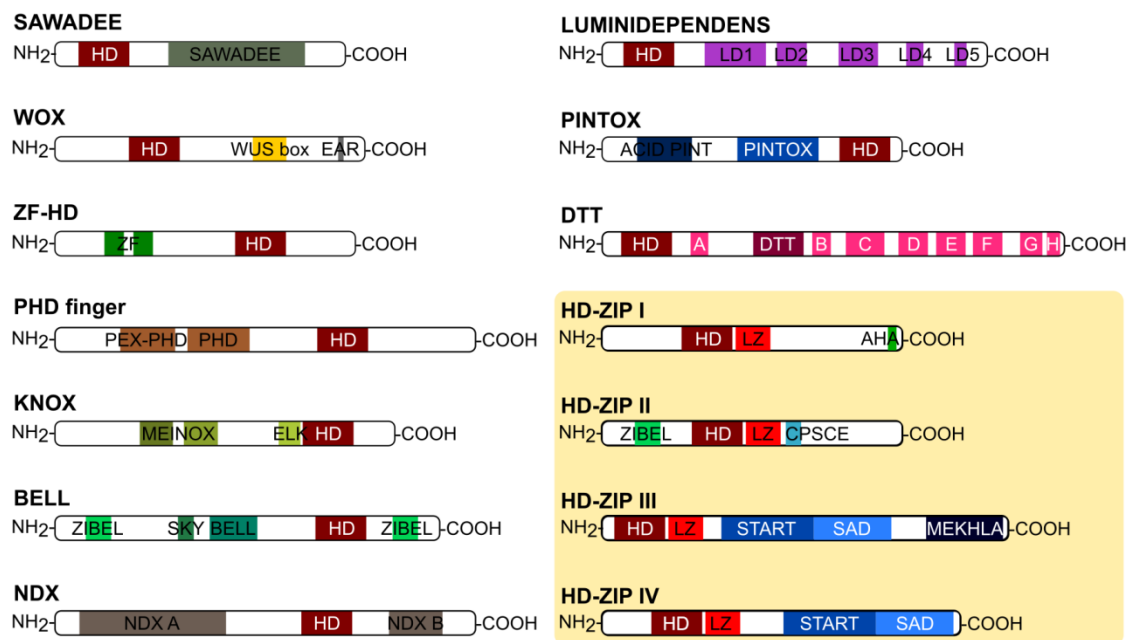
Este tipo de dominio presenta una elevada conservación en proteínas de diferentes reinos eucariotas, indicando que la estructura descrita es crucial para mantener su funcionalidad y que el papel que juegan los HD es esencial (Moens y Selleri, 2006). De hecho, estos FTs fueron identificados por primera vez en proteínas codificadas por genes involucrados en el desarrollo de *Drosophila melanogaster* (Gehring, 1987) y se les dio ese nombre ya que su expresión ectópica o mutaciones puntuales en ellos generaban importantes efectos homeóticos (cambios de un segmento corporal por otro, Bender y col., 1983; Garber y col., 1983).

Homeodominios en plantas

Desde su descubrimiento en *Drosophila*, la búsqueda de FTs con homeodominios se extendió a otros reinos. En el caso de plantas varios genes que contienen HB han sido identificados y aislados a partir de una amplia variedad de especies vegetales, que incluyen tanto mono- como dicotiledóneas. El gen *KNOTTED1* fue el primer gen con caja homeótica identificado a partir de una mutante de maíz (*kn*) que exhibía hojas anudadas (Vollbrecht y col., 1991) y actualmente se conoce un enorme número de este tipo de FTs. Pero, a diferencia de lo que ocurre en animales, ninguno de los genes con HB de plantas genera un efecto homeótico canónico cuando es mutado o expresado ectópicamente; por lo tanto, el legado del nombre de la familia (*homeobox*) no es del todo apropiado en este caso (Ariel y col., 2007).

Los miembros de la superfamilia HD de plantas caracterizados hasta el momento participan en una amplia variedad de procesos de desarrollo, tales como identificación y mantenimiento de las células meristemáticas, embriogénesis, maduración del polen, regulación del desarrollo floral y respuesta a condiciones ambientales. Este grupo de proteínas se divide a su vez en once familias (PHD-finger, BELL, ZF-HD, WOX, KNOX, DTT, NDX, LD, PINTOX, SAWADEE y HD-Zip, Mukherjee y col., 2009) según la conservación de secuencias dentro y fuera del homeodominio, la asociación con otros dominios, el tamaño proteico y la estructura génica **Imagen 5**.

Imagen 5: Clasificación de las familias de FTs con homeodominio en plantas



Representación esquemática de los distintos motivos que presenta cada miembro de los genes que contienen un homeodominio. Abreviaturas: AHA, residuos aromáticos e hidrofóbicos inmersos en un contexto ácido; EAR, motivo de represión anfifílico; ELK, motivo llamado de esta manera a partir de los tres aminoácidos conservados que presenta, Glu, Leu y Lis; HD, homeodominio; LD, dominio *LUMINODEPENDENS*; MEINOX, derivado de la asociación de los dominios MEIS y KNOX; MEKHLA, dominio llamado por la elevada conservación de los aminoácidos Met, Glu, Lis, His, Leu y Ala; LZ, cierre de leucinas; PEX-PHD, motivo rico en residuos cargados; PHD, homeodominio de plantas; SAD, dominio adyacente a START; START, dominio de transferencia de lípidos relacionado a las proteínas reguladoras de la esteroidogénesis aguda; ZF, dedos de zinc. Adaptado de (Capella y col., 2015a).

La familia HD-Zip

Los miembros de la familia HD-Zip se caracterizan por la presencia de un dominio de cierre de leucinas (LZ, del inglés *leucine zipper*), denominado el HALZ (por *Homeodomain Associated Leucine Zipper*), inmediatamente corriente abajo del HD

(**Imagen 5**). Los dominios HDs y LZs pueden ser encontrados en FTs de otros reinos eucariotas, pero su combinación en una sola proteína es única de plantas (Ruberti y col., 1991; Schena y Davis, 1992). El dominio HD-Zip se encuentra altamente conservado en proteínas de *Physcomitrella patens*, mono- y dicotiledóneas. En estos FTs, el HD es el responsable del reconocimiento y la unión específica al ADN, mientras que el LZ actúa como un motivo de dimerización. El LZ se pliega en una hélice α que tiene un residuo de lisina en cada séptima posición sobre el mismo lado de la hélice. Esta estructura tridimensional permite la formación de homo- o heterodímeros mediante interacciones hidrofóbicas entre ambos péptidos (Landschulz y col., 1988; Sessa y col., 1993). Esta dimerización es un evento indispensable para el reconocimiento y unión del ADN por parte del HD (Tron y col., 2004).

De acuerdo a su estructura génica, tamaño y presencia de diversos motivos, los HD-Zip han sido clasificados en cuatro subfamilias, I, II, III y IV (Ariel y col., 2007; **Imagen 5**) y se ha demostrado *in vitro* e *in vivo* que las proteínas de las subfamilias I y II son capaces de reconocer la secuencia pseudopalindrómica CAAT(N)ATTG (Palena y col., 1999; Tron y col., 2001; Ariel y col., 2010).

Respecto a la función de los FTs con dominios HD-Zip, numerosos estudios muestran que estas proteínas están involucradas en regulaciones del desarrollo y de respuesta a factores externos (Ariel y col., 2007). En términos muy generales, los miembros de la subfamilia IV han sido asociados a la regulación del desarrollo de raíces y tricomas (Nakamura y col., 2006); los miembros de la subfamilia III cumplen funciones en la regulación de la embriogénesis, del desarrollo de meristemas y sistemas vasculares, entre otras (Ariel y col., 2007) y las proteínas de la subfamilia II regulan principalmente las respuestas a distintas condiciones de iluminación. Por otra parte, numerosos estudios indicaron que los FTs HD-Zip de la subfamilia I regulan el desarrollo en condiciones de estrés abiótico (Ariel y col., 2007) y en unos pocos casos se mostró que son capaces de regular el desarrollo de la planta en condiciones normales (Komatsuda y col., 2007; Hofer y col., 2009).

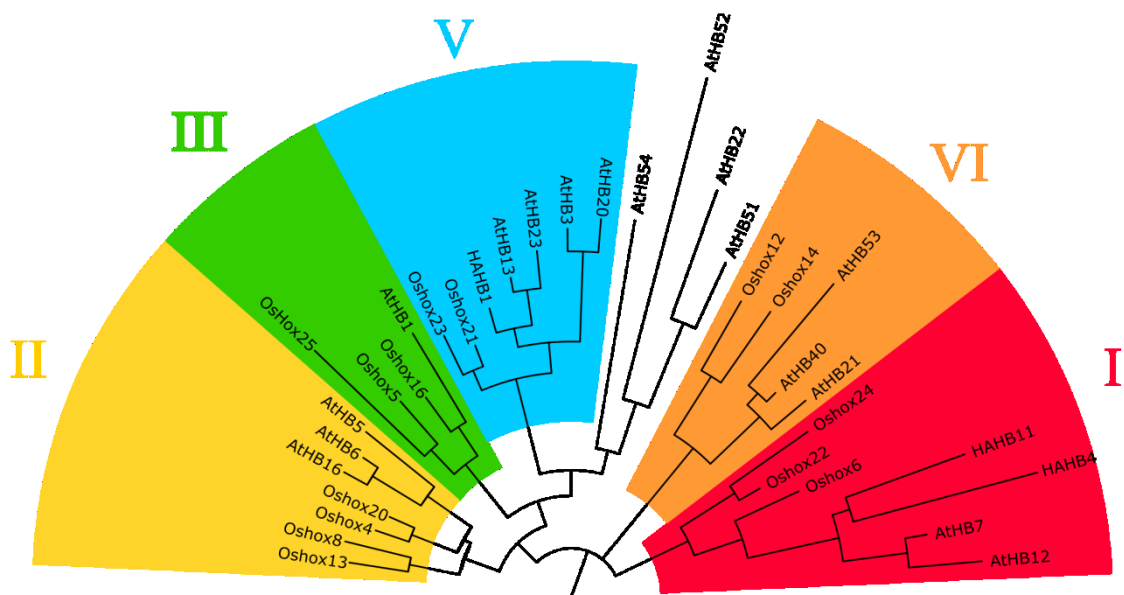
La subfamilia HD-Zip I

En *Arabidopsis thaliana*, la subfamilia I de proteínas HD-Zip está compuesta por 17 miembros (AtHB1/HAT5, AtHB3/HAT7, AtHB5-7, AtHB12-13, AtHB16, AtHB20-23, AtHB40, AtHB51-54, Ribone y col., 2015a). Las proteínas codificadas poseen un

tamaño de aproximadamente 35 kDa y están involucradas principalmente en procesos del desarrollo asociados al estrés abiótico; exhiben una elevada conservación de secuencia en el HD y un LZ menos conservado (Chan y col., 1998; Ariel y col., 2007; Ribichich y col., 2013).

En el año 2005, Henriksson y colaboradores clasificaron los 17 miembros de *Arabidopsis* en seis grupos (α a ϕ) de acuerdo a su relación filogenética y a la estructura de los genes codificantes, tomando en cuenta particularmente el número y la posición de los intrones (Henriksson y col., 2005). Más recientemente, en nuestro laboratorio se realizó una nueva reconstrucción filogenética, teniendo en cuenta proteínas HD-Zip I de diferentes especies, que resolvió a estos FTs en seis grupos distintos de los definidos por Henriksson y colaboradores (denominados I a VI - **Imagen 6**) según la presencia y la distribución de motivos conservados no caracterizados presentes en la región carboxilo terminal (CTR, del inglés *Carboxy-Terminal Region*; Arce y col., 2011).

Imagen 6: Árbol filogenético de los FTs HD-Zip I de *Arabidopsis thaliana*, *Oriza sativa* y *Heliantus annuus*.



El árbol se construyó utilizando la secuencia aminoacídica completa de cada una de las proteínas mostradas. Se señalan los distintos grupos determinados por Arce y col., 2011.

Distintos grupos de investigación demostraron por ensayos *in vitro* que los miembros HD-Zip I son capaces de homo- o heterodimerizar a través del dominio LZ para reconocer la secuencia pseudopalindrómica CAAT(A/T)ATTG (González y col., 1997; Palena y col., 1999; Tron y col., 2001); sin embargo, la interacción entre ellos es

selectiva. Por ejemplo, haciendo estudios *in vitro* se demostró que AtHB5 es capaz de formar heterodímeros con AtHB6, AtHB7 y AtHB12, pero interacciona débilmente con AtHB16 y no forma heterodímeros con AtHB1 (Johannesson y col., 2001). La unión a la caja pseudopalindrómica por FTs HD-Zip I se demostró con estudios *in vivo* sólo para algunos miembros (Dai y col., 2008; Ariel y col., 2010). En otros casos los experimentos indicaron que algunos miembros de esta familia unen elementos en *cis* que difieren de la secuencia pseudopalindrómica encontrada *in vitro* (Comelli y col., 2012; Valdés y col., 2012; De Smet y col., 2013; Lü y col., 2014). Aun así, en estos últimos casos, todas las regiones regulatorias unidas poseían al menos el núcleo central de la secuencia pseudopalindrómica.

La subfamilia HD-Zip I y las condiciones ambientales

Tal como se mencionó anteriormente, los primeros estudios realizados con miembros de la familia HD-Zip I indicaron que estos FTs estaban involucrados en la respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico. Los primeros ensayos experimentales que condujeron a la asociación entre estos FTs y las condiciones medioambientales fueron los estudios de expresión de los genes codificantes.

Un estudio general realizado por Henriksson y colaboradores en 2005 mostró que varios HD-Zip I de *Arabidopsis* modificaban sus niveles de expresión en respuesta a condiciones estresantes como salinidad o sequía (Henriksson y col., 2005). Por ejemplo, la expresión de los genes parálogos de *Arabidopsis* *AtHB7* y *AtHB12* se indujo por ABA y estrés hídrico (Söderman y col., 1996; Hjellström y col., 2003; Olsson y col., 2004).

Un FT de la familia HD-Zip I muy estudiado e involucrado en la tolerancia al estrés abiótico es HaHB4 de *Heliantus annuus*. En plantas de girasol, *HaHB4* se expresa en muy bajos niveles en condiciones normales, pero cuando las mismas se trataron con ABA, manitol, NaCl y especialmente cuando se sometieron a estrés hídrico, la expresión de este gen aumentó notoriamente en raíces, tallos y hojas (Gago y col., 2002; Dezar y col., 2005a). Por otro lado, cuando fueron sometidas a condiciones de déficit hídrico y deshidratación las plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan en forma ectópica y constitutiva el ADNc de *HaHB4* presentaron una marcada tolerancia, comparadas con sus pares salvajes (Dezar y col., 2005b). Otros ejemplos de FTs HD-Zip I que se relacionaron con la tolerancia a estrés abiótico son AtHB13 y su parálogo

HaHB1. Recientemente se demostró que la sobreexpresión de éstos en *Arabidopsis* indujo la expresión de proteínas que estabilizan las membranas celulares, causando un aumento en la tolerancia a la sequía, la salinidad y las bajas temperaturas (Cabello y col., 2012; Cabello y Chan, 2012).

Además de la relación con el estrés no biológico, a dos miembros particulares de esta subfamilia se le encontraron funciones en la tolerancia al estrés biótico. Uno es el caso de *HaHB4*, que al ser expresado ectópicamente indujo la síntesis de ácido jasmónico, el aumento de los volátiles verdes y de inhibidores de proteasas, y como consecuencia de estos cambios generó una mayor tolerancia al ataque de herbívoros y sensibilidad a patógenos biotróficos (Manavella y col., 2008). El otro caso identificado es el de *AtHB13*; cuando este gen se sobreexpresó en plantas de *Arabidopsis*, éstas fueron capaces de resistir infecciones causadas por oomicetes (*Hyaloperonospora arabidopsidis*) y áfidos (*Myzus persicae*; Gao y col., 2014).

La percepción de la luz es otro proceso en el que algunos HD-Zip I parecen estar involucrados. *AtHB23* interacciona con el fitocromo B (PhyB) en el núcleo, y se encuentra involucrado en la vía de señalización de la luz mediada por PhyB a través de un mecanismo desconocido (Choi y col., 2014). Por otro lado, *AtHB1* generó fotomorfogénesis constitutiva cuando se expresó ectópicamente en plantas de tabaco (Aoyama y col., 1995) y es regulado por PIF1 para promover la elongación de los hipocotilos en condiciones de día corto (Capella y col., 2015a).

La subfamilia HD-Zip I y el desarrollo vegetal

Existen pocos estudios en los que se relacione la función de los FTs HD-Zip I con el control del desarrollo de la planta. Probablemente esto se deba a la dificultad de tener mutantes de otras especies que no sean las utilizadas como modelos y a que la asociación con los factores ambientales, orientó la investigación hacia ese eje. Sin embargo, unos pocos informes dan cuenta que al menos algunos HD-Zip I participan también en la determinación de eventos particulares del desarrollo vegetal. En este sentido, estudios hechos durante la década pasada demostraron que LMI1 (*AtHB51*), de *Arabidopsis*, controla la identidad del meristema mediante la regulación de la expresión de LFY, lo que afecta la forma de las hojas y la formación de brácteas (Saddic y col., 2006). Otro caso es el de *AtHB12* cuyas plantas mutantes (*athb12*) en un fondo genético Wassilewskija (WS) presentan inflorescencias más largas y mayores niveles de

GA₂₀OX2 que los controles salvajes (Son y col., 2010). En cebada, se identificaron como responsables del fenotipo de seis filas de granos en las espigas a las mutaciones en *VRS1*, un miembro de esta familia de FTs (Komatsuda y col., 2007), mientras que en arveja, una mutación en *TENDRILESS (TL)* genera plantas que poseen hojas en lugar de zarcillos (Hofer y col., 2009).

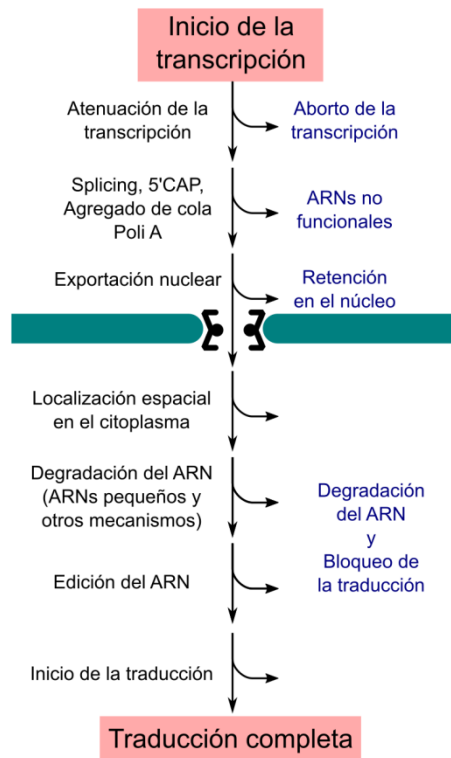
En forma general, podríamos decir que la mayoría de los HD-Zip I se encuentran involucrados en eventos del desarrollo en respuesta a condiciones ambientales y también estarían ejerciendo funciones en el desarrollo normal de las plantas.

Regulación post-transcripcional de la expresión proteica

A pesar de que el control sobre el inicio de la transcripción es el mecanismo de regulación génica predominante en plantas, se ejercen otros controles luego de que la ARN polimerasa comenzó a transcribir. La regulación génica post-transcripcional controla el transporte, la actividad y la estabilidad de los ARNs mensajeros producidos. Tanto el control transcripcional como el control post-transcripcional tienen como fin modular la cantidad de producto génico que se obtiene, para poder responder rápidamente ante una situación adversa sin generar un gasto energético excesivo (Alberts y col., 2002; Taiz y Zeiger, 2010).

La mayoría de los pasos que ocurren entre la generación del ARN mensajero y el comienzo de la traducción del mismo pueden estar regulados. Esto incluye la adición del 5'CAP y la cola de poli-A, la unión alternativa de exones o “*splicing*” alternativo, la degradación nuclear, la exportación al citoplasma, el almacenamiento en cuerpos P o cuerpos de estrés, la degradación del ARN mensajero por distintos mecanismos, y la eficiencia de la traducción, entre otros (**Imagen 7**).


Imagen 7: Controles post-transcripcionales posibles en la regulación de la expresión génica



Esquema mostrando los numerosos pasos en la vía entre la formación de un ARN y la traducción de la proteína que pueden ser regulados. No todos los transcritos sufren todos estos pasos de regulación. Adaptado de Alberts y col., 2002.

Son numerosas las revisiones existentes del conocimiento actual sobre el procesamiento del ARN (Carvalho y col., 2013; Reddy y col., 2013; Filichkin y col., 2015), el transporte a través del poro nuclear (Chinnusamy y col., 2008; Meier, 2012; Katahira, 2015; Parry, 2015), la localización de los ARNs maduros dentro del citoplasma (Kulkarni y col., 2010; Xu y Chua, 2011; Maldonado-Bonilla, 2014) y la degradación de los mismos, principalmente mediante ARNs pequeños (Bologna y Voinnet, 2014; Shaul, 2015; Hohn y Vázquez, 2016). De estos puntos y procesos de regulación, el inicio y procesividad de la traducción es lo menos estudiado hasta ahora.

La traducción de un ARN mensajero en plantas y otros organismos eucariotas es fundamentalmente similar. Sin embargo, existen importantes diferencias en cuanto a las isoformas de los factores de traducción y sus proteínas asociadas. También varían los mecanismos de regulación que actúan sobre la traducción y que involucran, entre otros, la fosforilación de algunos factores de iniciación, la asociación variable de las isoformas de éstos, elementos dentro de la secuencia de ARN e incluso la acción de ARNs pequeños (Muench y col., 2012).



Hipótesis y objetivos

Hipótesis

Hasta el comienzo de este trabajo, la función de los factores de transcripción HD-Zip I se asociaba principalmente a la respuesta a estrés abiótico y a los cambios en las condiciones de iluminación (Ariel y col., 2007; Ribichich y col., 2013; Ribone y col., 2015).

La primera hipótesis de trabajo de esta Tesis Doctoral plantea que estas proteínas tendrían funciones en el desarrollo de las plantas en condiciones normales de crecimiento. Postulamos que la especificidad de función de cada miembro estaría dada por la combinación de su patrón de expresión y las interacciones que pueda establecer con otras proteínas determinadas particularmente por los motivos presentes en las regiones carboxilo-terminales

La segunda hipótesis de trabajo plantea que los factores de transcripción de la familia HD-Zip I regulan a su vez otros factores de transcripción dentro de sus vías de señalización en respuesta a factores ambientales.

La tercera hipótesis de trabajo plantea que la regulación de la expresión de los genes que codifican factores de transcripción de la familia HD-Zip I se estaría dando en otros niveles además del transcripcional.

Objetivos generales

El primer objetivo general de esta Tesis Doctoral fue dilucidar cuál es la función natural que cumplen los factores de transcripción (FTs) HD-Zip I en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Para alcanzar este objetivo planteamos inicialmente aislar y caracterizar dos genes que codifican FTs HD-Zip I pertenecientes al subclado V, *AtHB13* y *AtHB23*, parálogos putativos. Nos interesó particularmente determinar sus funciones, saber si las mismas se han diversificado durante la evolución o son redundantes, si existe una regulación cruzada entre estos parálogos y cuáles son los mecanismos moleculares puestos en juego para cumplir dichas funciones.

El segundo objetivo general que propusimos, fue analizar la relación entre *AtHB13* y *JUB1*. *JUB1* es un FT de tipo NAC involucrado en los procesos de senescencia y tolerancia a estrés abiótico de *Arabidopsis thaliana*. Este FT sería un blanco putativo de *AtHB13*. Nos interesó puntualmente conocer si *JUB1* actuaba corriente abajo de

AtHB13, mediando las respuestas de tolerancia a sequía descritas en trabajos previos de este laboratorio.

El tercer objetivo general fue estudiar los niveles de regulación que afectan la expresión de los genes que codifican HD-Zip I. Propusimos analizar la función putativa de un marco de lectura abierto identificado en la región 5' no codificante de *AtHB1*.

Objetivos específicos

Clonar los ADNc correspondientes a los FTs *AtHB13* y *AtHB23* en vectores adecuados para transformar levaduras y plantas.

Obtener plantas de *Arabidopsis* mutantes y sobreexpresantes de *AtHB13* y *AtHB23*, y evaluar en detalle la fisiología y el desarrollo de estas plantas en condiciones óptimas de crecimiento.

Complementar las plantas mutantes con las construcciones sobreexpresantes correspondientes para confirmar la función de estos genes en los fenotipos que se encuentren con anterioridad.

Analizar el patrón de expresión de *AtHB13* y *AtHB23* en plantas de *Arabidopsis thaliana* crecidas en condiciones normales, a lo largo de todo el ciclo de vida de la planta. Para ello se obtendrán plantas transformadas con la región promotora y el 5' no codificante de este FT fusionados a los genes reporteros *GUS* o *GFP*.

Realizar mutaciones en los motivos conservados presentes en las regiones carboxilo terminales de *AtHB13* y *AtHB23*, identificados previamente en el laboratorio para poder estudiar su actividad en las funciones que se determinen en los ensayos de los puntos anteriores.

Comparar los transcriptomas de las plantas mutantes *athb13* y de plantas salvajes utilizando secuenciación masiva de ARNs.

Validar los datos obtenidos mediante RT-PCR cuantitativa.

Identificar las vías involucradas en el desarrollo de los fenotipos diferenciales observados en las plantas mutantes en el gen en estudio.

Analizar si existe redundancia de función mediante complementaciones cruzadas entre los genes *AtHB13* y *AtHB23*, para ello se transformarán plantas mutantes en *AtHB13* con construcciones que sobreexpresen *AtHB23* y viceversa.

Medir los niveles de transcripto de *JUB1* en plantas mutantes y sobreexpresantes de *AtHB13* en diversos estadios del desarrollo, en condiciones normales y de estrés hídrico.

Realizar cruzas entre plantas mutantes en *JUB1* y sobreexpresantes en *AtHB13*. Generar también cruzas entre mutantes en *AtHB13* y sobreexpresantes en *JUB1* para determinar si *AtHB13* actúa corriente arriba de *JUB1* a través de la evaluación fenotípica de dichas plantas.

Medir los niveles de transcriptos de *PR1*, *PR2*, *PR4* y *GLU* en plantas con niveles alterados de *JUB1* para determinar si este último FT actúa corriente abajo de *AtHB13* en la inducción de esos genes.

Analizar la conservación interespecífica del marco de lectura abierto presente en el 5' UTR *AtHB1* (CPuORF33) utilizando herramientas bioinformáticas. Estudiar particularmente las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas y otros factores que puedan influir en la acción de los uORF.

Obtener plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col0 transformadas con construcciones que contengan el promotor de *AtHB1* con distintas mutaciones puntuales que modifiquen la secuencia nucleotídica del CPuORF33, controlando la expresión de *AtHB1* y analizarlas fenotípicamente en condiciones normales de desarrollo.

Comparar los niveles de expresión, tanto a nivel proteico como de transcripto, en las plantas transformadas con el promotor de *AtHB1*, con y sin las mutaciones en el CPuORF33, en distintas condiciones de crecimiento.

Obtener plantas transformadas con los promotores mencionados en el punto anterior controlando la expresión de genes reporteros (*GFP* y *GUS*) y analizar el patrón de expresión a lo largo de todo el ciclo de vida de las plantas.

Transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes en el gen *RDR6* (*rdr6-12*) con las construcciones antes mencionadas para analizar la implicancia del sistema de silenciamiento por ARNs pequeños en el mecanismo de acción del CPuORF33.



**Materiales y
métodos**

Material utilizado

Cepas bacterianas

En la **Tabla 1** se detallan los genotipos de las cepas de *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens*, y *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo.

Tabla 1: Cepas bacterianas y de levaduras

Microorganismo	Cepa	Genotipo Relevante	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	F ⁻ ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 mK ⁺) phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1	(Woodcock y col., 1989)
<i>Escherichia coli</i>	DH10b	F ⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str ^R) endA1 λ ⁻	(Casadaban y Cohen, 1980)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	LBA4404	Posee el plásmido Ti desarmado pAL4404, con resistencia a estreptomicina, que se obtiene al reemplazar la región del ADN-T del plásmido pTiAch5 de la cepa salvaje Ach5 por el plásmido pBR322. Presenta resistencia cromosomal a rifampicina	(Ooms y col., 1982)

Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de bacterias, levaduras y plantas son los que se detallan en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Medios de cultivo

Medio de cultivo	Organismo que se cultiva	Composición	Referencia
Luria Bertani (LB)	<i>Escherichia coli</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Peptona de carne 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5 g/l; pH 7. Para medios sólidos, se añadieron 15 g/l de agar	(Sambrook y Russell, 2000)
Murashige y	<i>Arabidopsis</i>	Murashige and Skoog Basal Medium with	(Murashige

Skoog	<i>thaliana</i>	Gamborg's Vitamins (Sigma-Aldrich)KNO ₃ y 1,9 g/l; NH ₄ NO ₃ 1,65 g/l; CaCl ₂ .2H ₂ O 0,44 g/l; MgSO ₄ .7H ₂ O 0,37 g/l; KH ₂ PO ₄ 0,17 g/l; Na ₂ EDTA 37,3 mg/l; FeSO ₄ .7H ₂ O 27,8mg/l; MnSO ₄ .4H ₂ O 22,3 mg/l; H ₃ BO ₃ 6,2 mg/l; ZnSO ₄ .4H ₂ O 8,6 mg/l; KI 0,83 mg/l; Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O 0,25 mg/l; CuSO ₄ .5H ₂ O 0,025 mg/l; CoCl ₂ .6H ₂ O 0,025 mg/l; pH 5,8. Para medios sólidos, se añadieron 9 g/l de agar.	Skoog, 1962)
-------	-----------------	---	-----------------

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

Vectores utilizados

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

Los plásmidos *pBI121* y *pBI122* (Jefferson y col., 1987) derivan del vector binario *pBIN19*. El primero contiene el gen que codifica la enzima β-glucuronidasa de *Escherichia coli* (*GUS*) con la señal de poliadenilación de la nopalina sintetasa (*NOS*), clonado tras un fragmento de 800 pb que contiene el promotor duplicado 35S del virus del mosaico de la coliflor (*35SCaMV*). En el segundo se encuentra el fragmento de 800 pb correspondiente al promotor *35SCaMV* seguido de un sitio de múltiple clonado y el terminador *NOS*. En ambos vectores, dentro de las regiones de movilización de ADN, necesarias para la transformación de plantas, se encuentra el gen *NPTII* que confiere resistencia a kanamicina en plantas. Otras secuencias relevantes dentro de estos plásmidos incluyen el gen de resistencia a kanamicina en bacterias y un origen de replicación bacteriano *RK2*.

El plásmido *pCAMBIA1380* deriva del vector *pPZP* (Hajdukiewicz y col., 1994). Este plásmido contiene un sitio de múltiple clonado proveniente del *pUC8*. Dentro de

las regiones de movilización de ADN, necesarias para la transformación de plantas, se encuentra el gen *HPTII*, que confiere resistencia a higromicina en plantas, bajo el control del promotor *35SCaMV* y la señal de poliadenilación del virus del mosaico de la coliflor (*35S-Term*). Otras secuencias relevantes dentro de este vector incluyen el gen de resistencia a kanamicina en bacterias, el replicón *pVSI* para estabilidad en *Agrobacterium* y un origen de replicación bacteriano *pBR22*. El plásmido ***pCAMBIA-His*** deriva del *pCAMBIA1380*. Este plásmido (Capella y col., 2014) contiene el promotor *35SCaMV*, la cola de Histidinas, el sitio de múltiple clonado y el terminador *NOS* del vector *pBI122* insertado en los sitios *HindIII* y *EcoRI*.

Los plásmidos ***pENTR3C*** y ***pENTR D-Topo*** fueron desarrollados por Invitrogen® y actualmente son comercializados por ThermoScientific®. El primero permite el clonado de fragmentos amplificados por PCR mediante el uso de enzimas de restricción y ligasas, para luego introducir estos fragmentos mediante tecnología GATEWAY® en un vector de destino. El segundo también se utiliza para generar un vector de entrada GATEWAY®, pero utilizando el sistema de clonado direccional con topoisomerasas. Algunos componentes importantes de estos vectores son los sitios *attL1* y *attL2* flanqueando el sitio de inserción de la secuencia deseada para permitir la recombinación específica y el gen *ccdB* para selección negativa de no transformantes. Este vector contiene un gen de resistencia a kanamicina en bacterias y un origen de replicación bacteriano *pUC*.

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

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

un gen de resistencia a espectinomicina en bacterias y un origen de replicación bacteriano *ColE1*.

El plásmido *pRS300* es un derivado del vector *pBluescriptSK+*, conteniendo un fragmento de 404 pb de la horquilla del *MIR319a* de *Arabidopsis thaliana* clonado en el sitio *SmaI* (Schwab y col., 2006). Este vector se utilizó como molde para el clonado de los micro-ARN artificiales. El vector incluye el gen de resistencia a ampicilina en bacterias.

Los vectores *pENTR3C-PromAtHB1*, *pKGWFS7-PromAtHB1* (Capella y col., 2015b) y *pDONR221-AtHB13* (Cabello y col., 2012) se encontraban disponibles en el laboratorio y su construcción se describe en los trabajos citados.

El vector **U23330** se obtuvo del Arabidopsis Biological Resource Center (<http://abrc.osu.edu/>).

Material vegetal utilizado

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia 0 (Col0) para los experimentos de transformación estable por *floral dip*. Además, se usaron plantas de *Nicotiana benthamiana* para los ensayos de transformación transitoria de hojas.

Mutantes de *Arabidopsis thaliana*

En la **Tabla 3** se muestran las diferentes mutantes insercionales de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en esta Tesis Doctoral. En la misma se indican el nombre del genotipo mutante con el gen interrumpido, el ID del germoplasma, el ID del locus interrumpido y la referencia.

Tabla 3: Líneas mutantes utilizadas

Nombre	ID del germoplasma	ID del locus interrumpido	Locus	Referencia
<i>athb13-1</i>	SAIL_893_G05	<i>At1g69780</i>	<i>AtHB13</i>	Cabello y Chan, 2012
<i>athb13-2</i>	GABI_859H06	<i>At1g69780</i>	<i>AtHB13</i>	Ribone y col., 2015b
<i>rdr6-12</i>	CS24286 (ABRC)	<i>At3g49500</i>	<i>Rdr6</i>	Peragine y col., 2004
<i>upf1-5</i>	SALK_112922	<i>At5g47010</i>	<i>Upf1</i>	Arciga-Reyes y col., 2006
<i>upf3-1</i>	SALK_025175	<i>At1g33980</i>	<i>Upf3</i>	Arciga-Reyes y col., 2006

<i>ataf1-4</i>	GK565H08	<i>At1g01720</i>	<i>Ataf1</i>	Garapati y col., 2015
<i>ataf1-2</i>	SALK_057618	<i>At1g01720</i>	<i>Ataf1</i>	Lu y col., 2007
<i>jub1-1</i>	SALK_036474	<i>At2g43000</i>	<i>Jub1</i>	Wu y col., 2012

Oligonucleótidos

Las tablas 4 y 5 (**Tabla 4** y **Tabla 5**) indican el nombre, la secuencia y los sitios de restricción (cuando los hay) de los oligonucleótidos utilizados en esta Tesis. Los oligonucleótidos utilizados para los clonados se detallan en la **Tabla 4** mientras que aquellos utilizados para las determinaciones por RT-qPCR se describen en la **Tabla 5**.

Tabla 4: Oligonucleótidos utilizados para clonado

Los sitios de restricción se encuentran subrayados.

Nombre	Secuencia	Sitio de restricción	Uso	Construcción/es
PrAtHB1 R	gC <u>gggATCCg</u> ATCAACA <u>gAAATAAAACAAC</u>	<i>Bam</i> HI	Clonado	<i>35S:5'UTRnativo:GUS</i> y <i>35S:5'UTRfs:GUS</i>
5'UTR AtHB1 F	CCCTCTA <u>gAgAgACg</u> CTCACATTgCAAAAAC	<i>Xba</i> I	Clonado	<i>35S:5'UTRnativo:GUS</i> y <i>35S:5'UTRfs:GUS</i>
mutORF ins F	gTTCATgATgAggATTTTgTATCTg		Mutagénesis	<i>35S:5'UTRfs:GUS</i>
mutORF ins R	CAgATACAAAATCCTCATCATgAAC		Mutagénesis	<i>35S:5'UTRfs:GUS</i>
mutORFdel F	CCAgAAgATCATgATCTTTgAATCCTTCC		Mutagénesis	<i>35S:5'UTRfs:GUS</i>
mutORFdelR	AAggATTCAA <u>gATCATgATCTTCTggCgg</u>		Mutagénesis	<i>35S:5'UTRfs:GUS</i>
PrAtHB1 F	gC <u>ggTCgACg</u> AAAATAgCTgAATgTgTAAg	<i>Sal</i> I	Clonado	<i>PromAtHB1mut:GUS, PromAtHB1:At1</i> y <i>PromAtHB1mut:At1</i>
Prom-ATHB1 F	gCgTCTA <u>gAgATCAACA</u> gAAATAAAACAAC	<i>Xba</i> I	Clonado	<i>PromAtHB1mut:GUS, PromAtHB1:At1</i> y <i>PromAtHB1mut:At1</i>
prAT1 muORF F	TTCACgACgggATTTTgTATCTgCCCgTTg		Mutagénesis	<i>PromAtHB1mut:GUS</i> y <i>PromAtHB1:At1</i>
prAT1 muORF R	ATCCCgTCgTgAACTgCTATTCTCCCCTCC		Mutagénesis	<i>PromAtHB1mut</i> y <i>PromAtHB1:At1</i>

At13forward	GGCTCTAGAAATGTCTTGTAATAATGGAATGTC	<i>Xba</i> I	Clonado	35S: <i>AtHB13ΔAHA</i> ; 35S: <i>AtHB13ΔCTR</i> y 35S: <i>AtHB13WxA</i>
At13full	GCCGGATCCATTTCAATTGTACTGTTGCTGATC	<i>Bam</i> HI	Clonado	35S: <i>AtHB13ΔAHA</i>
AtHB13 ΔAHA	GCGGGATCCTTACATGTTACTGATACTATTCTC	<i>Bam</i> HI	Clonado	35S: <i>AtHB13ΔAHA</i>
AtHB13 ΔCTR	GCGGGATCCTCATGATTCTGTTTGTCTCTG	<i>Bam</i> HI	Clonado	35S: <i>AtHB13ΔCTR</i>
AtHB13 W285A W287A	GCGGATCCTCAATTGTACTGTTGCTGATCAAGCGCTGGCGC AAAACCAGA	<i>Bam</i> HI	Clonado	35S: <i>AtHB13WxA</i>
AtHB13 D289A	GCGGGATCCTCAATTGTACTGTTGCTGAGCAAGCCA	<i>Bam</i> HI	Clonado	35S: <i>AtHB13D289A</i>
AtHB23 F	GGGGATCCATGTCTTGTAATAATAATGGCTTAGC	<i>Bam</i> HI	Clonado	35S: <i>AtHB23</i>
AtHB23 R	GGGCTCGAGTCATCAATTGTATTGTTGCTGGTC	<i>Xho</i> I	Clonado	35S: <i>AtHB23</i>
amiRNA 13/23 I	GATATTCAATTGTATTGTGGCTGTCTCTCTTTTGTATTCC		Clonado	35S: <i>amiR13/23</i>
amiRNA 13/23 II	GACAGCCACAATACAATTGAATATCAAAGAGAATCAATGA		Clonado	35S: <i>amiR13/23</i>
amiRNA 13/23 III	GACAACCACAATACATTTGAATTTACAGGTCGTGATATG		Clonado	35S: <i>amiR13/23</i>
amiRNA 13/23 IV	GAAATTCAAATGTATTGTGGTTGTCTACATATATATTCCT		Clonado	35S: <i>amiR13/23</i>
amiRNA 23 I	GATAATGTCTAATCATATGGCACTCTCTTTTGTATTCC		Clonado	35S: <i>amiR23</i>
amiRNA 23 II	GAGTGCCATATGATTAGACATTATCAAAGAGAATCAATGA		Clonado	35S: <i>amiR23</i>
amiRNA 23 III	GAGTACCATATGATTTGACATTTTACAGGTCGTGATATG		Clonado	35S: <i>amiR23</i>
amiRNA 23 IV	GAAAATGTCAAATCATATGGTACTCTACATATATATTCCT		Clonado	35S: <i>amiR23</i>

35Spromoter F	TGACGCACAATCCCCTACTATC		Presencia de transgén
AtHB13 R	GCCGGATCCATTTCAATTGTAAGTGTGCTGATC	<i>Bam</i> HI	Presencia de transgén
<i>athb13-2</i> LP	CGACCAAAATCTCAAGCAAAC		Presencia de transgén
<i>athb13-2</i> RP	CGGCGCAGTTGAGATATCTAG		Presencia de transgén
T-DNA GK 08409	ATATTGACCATCATACTCATTGC		Presencia de transgén
<i>athb13-1</i> LP	AGGAGTTGCTTTCAGGTAGGG		Presencia de transgén
<i>athb13-1</i> RP	TATGAAATTGATGGTCTGCGG		Presencia de transgén
LB3 T-DNA Sail	TAGCATCTGAATTCATAACCAATCTCGATACAC		Presencia de transgén
prATHB13 F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAGAATGAAGA CCGTATTAGATAAGG		Clonado <i>promAtHB13:GFP:GUS</i>
prAtHB13 R	GGG <u>ICTAG</u> ACTTCTTCTGTTTTGCAACAGAAGTTAG	<i>Xba</i> I	Clonado <i>promAtHB13GFP:GUS</i>
AttL1	TAGTTAGTTACTTAAGCTCGGGC		Clonado GATEWAY
AttL2	CAGAGCTGCAGCTGGATGGC		Clonado GATEWAY

Tabla 5: Oligonucleótidos utilizados para las determinaciones por RT-qPCR

Nombre	Secuencia
AtHB13q (At1g69780) F	CTCCATggATTTgCTTCg
AtHB13q (At1g69780) R	TCCCATTTgTgACCCATC
AtHB23q (At1g26960) F	TTgATgACCAgTCTgggTTC
AtHB23q (At1g26960) R	gAATTggTTCATCTgACCACTT
GRP17 (At5g07530) F	gTCAAaggCAAAGTCTAAaggTg
GRP17 (At5g07530) R	AgACATACCTTCATCCCCAgAC
AtOPT8 (At5g53520) F	CTCgTTATgATCACCCTCAgg
AtOPT8 (At5g53520) R	TgATgAgAgTgATgACAAAgAAC
AtPTR5 (At5g01180) F	AACTCTgTCgTCgCTTCCCC
AtPTR5 (At5g01180) R	ACAgCACTCAgTTCCAAgAATg
SKS2 (At5g51480) F	TCAACAaggTTATAgCagTCAATg
SKS2 (At5g51480) R	ATAAgTgAAgTTCCAATTCggTg
GDSL-Like lipase (At5g03810) F	ggTggggTCgggAACAATATg
GDSL-Like lipase (At5g03810) R	gATTCgAAAAACCCATACTCgAC
GRP (At2g15340) F	gTTATAgCCATTgCATgTCTCTC
GRP (At2g15340) R	CTAAAACCACCAgAATTCggAC
CAP (At3g19690) F	gCCCACAACgAAgCCCgAAA
CAP (At3g19690) R	CgCAgCATCTTCAGCCgACA
F2809.220 (At3g57370) F	TAATggCCgTAgggCTCCTg
F2809.220 (At3g57370) R	TTggCAAACCACgTgggTACT
CYCMEE65 (At2g01280)F	ggTggTTTggCATgTgATTTATg
CYCMEE65 (At2g01280)R	gAgCTTgAATTCCCAACTCg
CYCP3;2 (At3g60550) F	AACAATTCCAAgACACCTCTgg
CYCP3;2 (At3g60550) R	AAAgATCTgAgTTTTgCCACCg
CYCJ18 (At2g01905) F	CTTCAAAATCTCTggCTgCTTC
CYCJ18 (At2g01905) R	TTgTCACCATTTTAACCCAggg
CYCB1;5 (At1g34460) F	CgAgACgAAgAggAATgCTC
CYCB1;5 (At1g34460) R	gTgCATgTACATCTTAggCTgA

PLP4 (At4g37050) F	gCATCgAAATggggATTgATgTg
PLP4 (At4g37050) R	TCggAACgAAgAgCTTgAAAgAC
PMEI (At5g62360) F	ATgCggCTCTCAACATCACATTAg
PMEI (At5g62360) R	TCTCATggCCgAgACTTCTTTAgg
CESA10 (At2g25540) F	ggTCTgCACTTCTTgCATCCATC
CESA10 (At2g25540) R	ggCAgCTCACTCACCCATgAAAC
EXP10 (At1g26770) F	AgCgAACAATAATggCggTTgg
EXP10 (At1g26770) R	CTTCTCCTgCAAaggAACCCCTC
XTH15 (At4g14130) F	ggAgACCCCAACACATCATATTCTT
XTH15 (At4g14130) R	CACCTCTCgTggCCCAATCg
JUB1 (At2g43000) F	CAACAAGCAgAggTATggACAC
JUB1 R (At2g43000) R	gTTTTcggTTTggTggTAAgATg
PR2 (At3g57260) F	TAAgAAggAACCAACgTATgAgAA
PR2 (At3g57260) R	CATAAAAAgCCCACAAgTCTCTAA
PR4 (At3g04720) F	gTTTAAgggTgAAgAACACAAgAAC
PR4 (At3g04720) R	ATTgAACATTgCTACATCCAAATC
GLU (At4g16260) F	ACCAAAACCTCTTTgACgCTTTAC
GLU (At4g16260) R	AATACgTTTCCACTCCTCTTCCAg

Construcciones genéticas realizadas

Construcciones genéticas para plantas

Construcciones para la expresión constitutiva

35S:AtHB13: El ADNc de *AtHB13* se encontraba clonado en el vector *pDONR221* (Cabello y col., 2012). Para obtener una construcción que permita sobreexpresar la región codificante de *AtHB13* sin ningún tipo de bandera se realizó una recombinación Gateway® (Invitrogen) utilizando como vector destino el plásmido *pK2GW7*.

35S:AtHB13AAHA, 35S:AtHB13WxA y 35S:AtHB13D289A: Los fragmentos indicados de *AtHB13* se amplificaron con oligonucleótidos específicos (**Tabla 4**) a partir de los vectores descritos en Capella y col., 2014 y luego se subclonaron en los sitios *XbaI* y *BamHI* del vector *pBII22* (Capella y col., 2014).

35S:AtHB23: El ADNc de *AtHB23* se amplificó utilizando oligonucleótidos específicos (**Tabla 4**) y el plásmido *U23330* (obtenido de la ABRC, <http://www.arabidopsis.org>) como molde. El producto amplificado se clonó en los sitios *BamHI* y *XhoI* del vector *pENTR3C* para luego realizar una recombinación Gateway® (Invitrogen) utilizando como vector de destino el plásmido *pK2GW7*.

35S:AtHB23 AAHA, 35S:AtHB23WxA, 35S:AtHB23D250A: Los fragmentos indicados de *AtHB23* se obtuvieron por PCR utilizando oligonucleótidos específicos (**Tabla 4**) y el plásmido *U23330* como molde. Los productos obtenidos se subclonaron en los sitios *XbaI* y *BamHI* del vector *pBII22* (Capella y col., 2014).

35S:5'UTRnativo:GUS: La región 5'UTR de *AtHB1* se amplificó mediante PCR usando los oligonucleótidos señalados (**Tabla 4**) y como molde, ADN genómico de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col0. El fragmento obtenido se subclonó en *pGEM T-easy* y luego se insertó en los sitios *XbaI* y *BamHI* del vector *pBII21*.

35S:5'UTRfs:GUS: Las mutaciones específicas se introdujeron mediante PCR utilizando los oligonucleótidos especificados (**Tabla 4**) y usando como molde la construcción *35S:5'UTRnativo:GUS* (descrita arriba). El fragmento obtenido se subclonó en *pGEM T-easy* y luego se insertó en los sitios *XbaI* y *BamHI* del vector *pBII21*.

Construcciones para expresar un gen reportero bajo el control de un promotor específico

PromAtHB13:GFP:GUS: Un fragmento de 1772 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción de *AtHB13* se amplificó con oligonucleótidos específicos (**Tabla 4**) a partir de ADN genómico de plantas salvajes (WT). El producto de PCR se clonó en *pGEM T-easy* y luego se subclonó en los sitios *SalI* y *XbaI* del plásmido *pENTR3C*. Posteriormente se realizó una recombinación Gateway® (Invitrogen) utilizando como vector de destino el plásmido *pKGWFS7*.

PromAtHB23:GFP:GUS: Un fragmento de 1793 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción de *AtHB23* se amplificó con oligonucleótidos específicos (**Tabla 4**) a partir de ADN genómico de plantas WT. El producto de PCR se clonó en *pGEM T-easy* y luego se subclonó en los sitios *BamHI* y *EcoRI* del plásmido *pENTR3C*. Posteriormente se realizó una recombinación Gateway® (Invitrogen) utilizando como vector de destino el plásmido *pKGWFS7*.

PromAtHB1mut:GFP:GUS: Las mutaciones específicas se introdujeron mediante PCR utilizando los oligonucleótidos especificados (**Tabla 4**) y usando como molde la construcción *pKGWFS7 PromAtHB1:GUS* (Capella y col., 2015b). El producto de amplificación obtenido se subclonó en pBluescript SK- y luego se insertó en los sitios *BglIII* y *HindIII* del plásmido *pKGWFS7 PromAtHB1:GUS*, reemplazando parte de la secuencia nativa. Finalmente la inserción se corroboró mediante secuenciación.

Construcciones para generar el silenciamiento de genes específicos.

35S:amiRNA23* y *35S:amiRNA13/23: Se diseñaron microARNs artificiales de acuerdo a lo descrito en Schwab y col., 2006 (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>). Se utilizaron oligonucleótidos específicos (**Tabla 4**) y el vector *pRS300* como molde. Los fragmentos resultantes se clonaron en los sitios *SalI* y *XbaI* del plásmido *pENTR3C* y luego se introdujeron en el vector *pK2GW7* mediante recombinación Gateway® (Invitrogen).

Construcciones para expresar un gen de interés bajo el control de un promotor específico

PromAtHB1:AtHB1* y *PromAtHB1mut:AtHB1: El promotor nativo (*PromAtHB1*) y el promotor mutado (*PromAtHB1mut*) de *AtHB1* se amplificaron a partir de los plásmidos *pKGWFS7 PromAtHB1:GUS* (Capella y col., 2015b) y *pKGWFS7 PromAtHB1mut* (descritos anteriormente en esta Tesis) utilizando los oligonucleótidos especificados (**Tabla 4**). Luego, los productos de PCR se subclonaron en los sitios *SalI*

y *XbaI* del vector *pMTL22*. Posteriormente los clones obtenidos se digirieron con las enzimas *BamHI* y *XbaI* para ser introducidos en los sitios *Bg/III* y *XbaI* del vector *pCAMBIA HA-AtHBI* (Capella, 2015c), reemplazando el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35S CaMV). Este clonado fue realizado por el Dr. Matías Capella.

Métodos utilizados para el trabajo con ácidos nucleicos y proteínas

Transformación de bacterias

Transformación de células de *Escherichia coli* y de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación

La preparación de células competentes de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*, y las condiciones de electroporación utilizadas fueron las recomendadas por el fabricante del equipo (*Gene Pulser*TM, Bio-Rad Laboratorios Inc., USA). El choque eléctrico se realizó en cubetas de 0,2 cm (Bio-Rad) aplicando una diferencia de potencial de 2,5 kV. Inmediatamente después del pulso eléctrico se agregó 1 ml de medio LB fresco y se incubó la suspensión durante 1 h a 37 °C para *Escherichia coli* y 1 h 30 min a 28 °C para *A. tumefaciens*. Finalmente, el cultivo se centrifugó a 4500 rpm durante 5 min, el sedimento celular se resuspendió en 200 µl de medio y se sembró sobre LB sólido suplementado con los antibióticos correspondientes en placas de Petri. Estas placas se incubaron a 37 °C o a 28 °C hasta la aparición de colonias (aproximadamente 16 y 48 h para *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*, respectivamente).

Obtención y cuantificación de ácidos nucleicos

Minipreparación de ADN plasmídico

Para la preparación de ADN plasmídico a partir de células de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* se utilizó el método de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979). Las células transformadas de *Escherichia coli* se cultivaron a 37 °C con agitación y hasta saturación en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente; mientras que las células transformadas de *Agrobacterium tumefaciens*

se cultivaron a 28 °C, con agitación hasta saturación en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente al vector (kanamicina 50 µg/ml; espectinomicina 100 µg/ml; cloranfenicol 35 µg/ml). Cuando las bacterias transformadas fueron *Agrobacterium tumefaciens*, se agregaron asimismo estreptomomicina 50 µg/ml y rifampicina 50 µg/ml para seleccionar la cepa LBA4404 utilizada. Luego se tomaron 1,5 ml de cada cultivo y se centrifugaron durante 5 min a 5000 rpm. Cada sedimento celular se resuspendió en 100 µl de Solución I y se incubó en hielo por 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, el ADN plasmídico fue resuspendido en 30-50 µl de agua destilada estéril.

Minipreparación de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana*

Para analizar la presencia de los transgenes en las plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas, se realizaron preparaciones de ADN genómico empleando un método rápido descrito por Li y Chory (1998) con algunas modificaciones. Se cortó una hoja joven y se colocó en un tubo, para ser macerada durante 15 s. Luego se agregaron 700 µl de solución de extracción de ADN genómico, se agitó vigorosamente durante 15 s, se dejó reposar en hielo, y se realizó una extracción con 700 µl de la mezcla fenol:cloroformo 1:1 (v/v). Luego de centrifugar 10 min a 12000 rpm, se recuperó el sobrenadante y se hizo otra extracción sólo con cloroformo (1 volumen). Posteriormente, se centrifugó 10 min a 12000 rpm, y se precipitó el ADN agregando al sobrenadante 1 volumen de isopropanol y 1/10 volúmenes de NaAc 3 M (pH 5,2), para luego incubar 1 h a -20 °C. La mezcla alcohólica se centrifugó 20 min a 12000 rpm, el precipitado se lavó con 500 µl de etanol 70 % (v/v) y se secó a temperatura ambiente. Finalmente el ADN genómico se resuspendió en 100 µl de agua destilada estéril.

Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

La purificación de fragmentos de ADN se realizó a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión (Promega), empleándose solución TAE 1 x tanto para la preparación del gel como para la solución de corrida. Una vez identificadas mediante visualización sobre transiluminador UV, las bandas correspondientes a los fragmentos esperados se escindieron utilizando un bisturí estéril y se incubaron con 2 volúmenes de agua milliQ 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 10.000 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 1 volumen de isopropanol. 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 alcohólica. Tras la precipitación y su posterior lavado con etanol 70 %, el fragmento purificado fue solubilizado en 12 µl de H₂O milliQ estéril.

En los casos en los que fue preciso obtener ADN de alta calidad a partir de geles de agarosa, se empleó el equipo comercial *GFX® PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Pharmacia Biotech Inc.).

La purificación de los vectores binarios y de clonado, después del corte con enzimas de restricción, fue realizada directamente por precipitación etanólica para evitar el daño mecánico.

Extracción y purificación de ARN total

Las extracciones de ARN fueron realizadas con un reactivo símil Trizol (Invitrogen™) preparado en el laboratorio, (Chomczynski y Sacchi, 1987). Para estas extracciones, se pulverizaron 50 – 100 µg de tejido vegetal con N₂ líquido en un mortero estéril, y luego se transfirió el polvo fino a un tubo de tipo Eppendorf en el cual se agregó 1 ml del reactivo de extracción. Tras mezclar varias veces por inversión, la mezcla se incubó a temperatura ambiente por 10 min antes de agregar 200 µl de cloroformo y centrifugar por 15 min a 11800 rpm a 4 °C. La fase acuosa se precipitó posteriormente con 1 volumen de isopropanol, incubando 10 min a -20 °C. Tras un lavado con etanol 70 % v/v y secado, el precipitado se resuspendió en 30 µl de agua milliQ estéril. La integridad del ARN extraído se corroboró por electroforesis en condiciones desnaturizantes, tal como se detalla más adelante.

Cuantificación de ácidos nucleicos

La calidad y cantidad del ADN y del ARN fueron evaluadas con el equipo Nanodrop NanoPhotometer™ (IMPLEN) midiendo la absorbancia a 260 nm (Sambrook y Russell, 2000), considerando que un valor de A_{260} de 1 corresponde, aproximadamente, a 40 mg/ml de ARN, a 50 mg/ml de ADN doble hebra o a 37 mg/ml de ADN simple hebra. Para cada medición se utilizó un volumen de 3 μ l por muestra. La posible contaminación por proteínas fue determinada mediante el cociente A_{260}/A_{280} , y la de carbohidratos y compuestos fenólicos mediante el cociente A_{260}/A_{230} . El valor para dichas relaciones cuando las muestras presentan una calidad aceptable debe estar comprendido entre 1,8 y 2.

Reacciones enzimáticas

Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

Las digestiones de fragmentos de ADN se realizaron con las enzimas de restricción y las soluciones reguladoras correspondientes, según las condiciones recomendadas por los fabricantes. En todos los casos fueron utilizadas de 1 a 5 U de enzima por cada microgramo de ADN a digerir.

Ligación de moléculas de ADN

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

Reacción de recombinación GATEWAY®

En el caso de reacciones LR, la recombinación *in vitro* de fragmentos de ADN se llevó a cabo utilizando 1 μ l de GATEWAY® LR Clonase® II Enzyme Mix (Invitrogen®), 1 μ l del vector de destino (150 ng/ μ l), 1 μ l de solución amortiguadora TE pH 8, y 2 μ l del vector de entrada (150 ng/ μ l). La incubación se realizó durante 3 horas a temperatura ambiente, y los 5 μ l fueron utilizados para transformar células competentes. En algunas ocasiones el vector de entrada se reemplazó por 2 μ l de

producto de PCR amplificado con oligonucleótidos adecuados (*AttL1* y *AttL2* de **Tabla 4**).

Para las reacciones BP, se utilizó 1 μ l de GATEWAY[®] BP Clonase[®] II Enzyme Mix (Invitrogen[®]), 1 μ l del vector de entrada (150 ng/ μ l), 1 μ l de solución amortiguadora TE pH 8 y 2 μ l del producto de PCR (150 ng/ μ l) o vector de destino (150 ng/ μ l - Hartley y col., 2000)

Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para las reacciones en las que el molde fue ADN plasmídico o ADN genómico vegetal los volúmenes de reacción fueron de 25 μ l. En todos los casos se utilizó la solución reguladora de pH provista por el fabricante de la enzima, a la cual se le agregaron los siguientes reactivos: MgCl₂ 2 mM; dNTP 0,2 mM de cada uno y dos oligonucleótidos específicos (0,4 μ M cada uno). Posteriormente, a esta mezcla de reacción se le añadieron entre 6 y 10 ng de ADN molde y la enzima Taq ADN polimerasa o Pfu ADN polimerasa (PB-L, Universidad de Quilmes, Bs. As.), en una concentración de 1,5 U de enzima por reacción. Finalmente se procedió a la reacción de amplificación.

Estas reacciones se llevaron a cabo en el termociclador PTC-100[®] Peltier Thermal Cycler (MJ Research), y en general se utilizó el siguiente programa, en el que la temperatura de hibridación se estableció de acuerdo a la composición de bases de los oligonucleótidos utilizados, aplicando la siguiente relación para su cálculo: $T_a = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C) - 5^\circ\text{C}$.

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

* El tiempo de extensión varió dependiendo del largo del fragmento a amplificar. En el caso de Taq ADN polimerasa el tiempo se estimó en 1 min por cada 1000 pb a amplificar. Cuando la polimerasa utilizada fue Pfu (presenta un mecanismo de prueba de error) el tiempo fue de 1 min por cada 600 pb.

Cuando se trabajó con ADN genómico como molde, se realizó una desnaturalización previa a 94 °C durante 5 min.

Transcripción reversa de ARN total

Las reacciones de transcripción reversa se llevaron a cabo cursando el siguiente protocolo en dos etapas: 1. En un volumen final de 10 μ l, se colocó 1 μ g de ARN con oligonucleótidos polidTV 0,1 μ M (poli-dTV consiste en 1 nucleótido variable, ubicado en el extremo 5', seguido de 24 nucleótidos de timina). Esta mezcla se incubó durante 5 min a 70 °C, para luego ser colocada inmediatamente en hielo (este tratamiento permite desarmar las estructuras secundarias del ARN). Terminado este proceso, se le adicionaron a la mezcla 6 μ l de solución amortiguadora de la enzima, 2 μ l de dNTP (20 mM), 200 U de transcriptasa reversa M-MLV (Promega) y se completó el volumen hasta 30 μ l con agua milliQ estéril. Dicha mezcla se incubó 1,5 h a 42 °C y luego se procedió a inactivar la enzima calentando la reacción 5 min a 80 °C más 30 s adicionales a 94 °C.

Análisis de ácidos nucleicos

Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Para el análisis de fragmentos de ADN en geles de agarosa se utilizó el sistema de tipo submarino (Ausubel y col., 2003). La concentración de agarosa varió entre 1,5 y 0,8 % (P/V), dependiendo del tamaño del fragmento analizado. Los geles fueron preparados en solución TAE 1 x y la muestra, antes de ser sembrada, fue mezclada con solución de siembra adicionada con GelRed® (Biotium) en una relación 1/10 (v/v).

La separación electroforética se realizó en solución TAE 1 x, a voltaje constante entre 1 y 5 V por cm 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 el ladder 100 pb (Productos Bio-Lógicos) o una muestra de ADN del bacteriófago λ , digerido previamente con la enzima *HindIII*. Esta digestión genera fragmentos de ADN de 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 y 125 pb.

Electroforesis de ARN en condiciones desnaturalizantes

La separación electroforética de moléculas de ARN se realizó en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes. Esta técnica se utilizó para analizar la integridad de las muestras de ARN a utilizar en diversos ensayos. La concentración de agarosa utilizada fue de 1 % (p/v) y los geles fueron preparados en solución HEPES 1 x y

formaldehído 6 %. Antes de la corrida electroforética, a cada muestra (entre 5 y 10 μg de ARN total) se le agregaron 3 volúmenes de solución de desnaturalización y la mezcla se incubó 5 min a 65 °C. Después del calentamiento, se agregó 1/10 del volumen de solución de siembra adicionada con GelRed® (Biotium). La separación electroforética se llevó a cabo en solución HEPES 1 x, empleando un voltaje constante de 3 V por cm de gel. La visualización del ARN se realizó en un transiluminador de luz UV (310 nm) Fotodyne, USA.

Cuantificación de transcritos por PCR en tiempo real

La PCR cuantitativa en tiempo real fue llevada a cabo usando un termociclador Mx3000P Multiplex qPCR system (Stratagene, La Jolla, CA) o PTC-200TM (MJ Research, Inc.) que tiene acoplado un detector de fluorescencia Cromos 4 (MJ Research, Inc.). Las reacciones se realizaron en volúmenes finales de 20 μl que contenían: 2,5 μl SyBr green 1 x; 0,1 μl dNTP (20 mM); 0,4 μl de cada oligonucleótido específico (20 pmol/ μl); 3 mM MgCl_2 ; 10 μl de una dilución 1/20 del producto de la transcripción reversa previamente descrita; y 0,1 μl Taq polimerasa. La fluorescencia emitida se registró en forma continua durante 40 ciclos. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se detallan en la **Tabla 5**.

Los niveles de expresión de los genes *ACTINA2* y *ACTINA8* de *Arabidopsis thaliana* se utilizaron para normalizar los niveles de expresión de los genes de interés ya que han sido evaluados previamente como genes normalizadores (Charrier y col., 2002), de acuerdo al método $\Delta\Delta\text{Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Todas las cuantificaciones fueron realizadas con triplicados biológicos y repetidas al menos tres veces. Las diferencias obtenidas se consideraron significativas para un valor 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).

Análisis del transcriptoma por RNA-Seq

Se realizaron extracciones de ARN total a partir de flores de plantas salvajes y mutantes *athb13-1* crecidas en condiciones normales durante 35 días utilizando RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), como sugiere el fabricante. Diez μg por muestra fueron enviados a la plataforma de Genome Technology Access Center en la Escuela de Medicina de la Universidad de Washington, donde los ARN mensajeros fueron purificados utilizando Dynal mRNA Direct kit (Life technology). Posteriormente, estos

ARN fueron fragmentados y sometidos a transcripción reversa para obtener ADNc doble hebra, para lo cual se utilizaron oligonucleótidos aleatorios.

Luego, se les adicionaron los adaptadores y los ADNc fueron secuenciados en un equipo HiSeq 2500. Los archivos fastQ fueron alineados con el último ensamblaje del genoma de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col0 (TAIR10; liberado en junio de 2009) mediante TopHat versión 2.0.8, usando Bowtie2 versión 2.1.0.

Una vez cuantificados los transcritos totales para cada réplica de los dos genotipos analizados, las lecturas fueron sometidas a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para identificar aquellos genes regulados diferencialmente. De aquellos que presentaron un valor p inferior a 0,05 sólo se continuó el estudio con los que se encontraban inducidos o reprimidos dos veces o más en la mutante *athb13-1* con respecto a su par salvaje. Finalmente, de estos últimos genes obtenidos se analizaron los que presentaron en promedio más de 10 lecturas.

Determinación de la secuencia de moléculas de ADN

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

Análisis de las secuencias

Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas, se analizaron con programas informáticos. Para las búsquedas de homología, se consultaron las bases de datos del EMBL, Gene Bank y SWISS PROT, utilizando el programa BLAST (Altschul y col., 1997) a través del servidor National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

El alineamiento de las secuencias proteicas se realizó utilizando la versión on-line del programa MAFFT mediante el algoritmo L-INS-i (<http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/software/>; Katoh y Toh, 2008) o PRALINE con los parámetros predeterminados (Simossis y Heringa, 2005). Las reconstrucciones filogenéticas se armaron empleando el programa ClustalW que utiliza un algoritmo basado en máxima

verosimilitud o *maximun likelihood* (<http://www.atgcmontpellier.fr/phyml/>; Goujon y col., 2010; Larkin y col., 2007), utilizando como modelo de sustitución al JTT.

Obtención y cuantificación de proteínas

Extracción de proteínas totales de tejidos de *Arabidopsis thaliana*

El procesamiento de las muestras en mortero se llevó a cabo agregando N₂ líquido hasta obtener un polvo fino que se transfirió a un tubo Eppendorf. Luego, se agregaron 200 µl de la solución amortiguadora de extracción y se mezcló con vórtex por 30 s. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y se mantuvo en baño de hielo.

Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford

La concentración de proteínas fue determinada utilizando esencialmente el método descrito por Bradford (Bradford, 1976). Como patrón se utilizó una solución de albúmina sérica bovina para realizar una curva de calibrado. Las determinaciones se realizaron con 2-10 µl de extracto proteico, dependiendo del tejido, y en 100 µl finales llevando a volumen con NaCl 150 mM, y 900 µl del reactivo de Bradford. Tras incubar las muestras cinco minutos a temperatura ambiente, se determinó la absorbancia del producto generado en un espectrofotómetro, a 595 nm.

Ensayo de simple híbrido en levadura

Tanto las construcciones necesarias como el ensayo de simple híbrido se realizaron en el laboratorio de la Dra. Salma Balazadeh (Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, Postdam, Alemania) según lo descrito en Pruneda-Paz y col., 2014

Métodos utilizados para el trabajo con material vegetal

Obtención de material vegetal y condiciones de cultivo

Cultivo de plantas

El cultivo de plantas de *Arabidopsis thaliana* y de *Nicotiana benthamiana* se realizó en una cámara de cultivo, con iluminación y temperatura controladas (16 h de luz a 24 °C y 8 h de oscuridad a 21 °C). Las condiciones de iluminación requeridas (120

$\mu\text{E}/\text{m}^2$) fueron obtenidas en forma artificial manteniendo las plantas bajo 6 tubos fluorescentes, intercalando tubos de luz blanca y tubos GroLux (Sylvania) ubicados en forma adyacente.

Las plantas se sembraron en macetas de 10 cm de diámetro con sustrato Klasmann TS1 (Klasmann-Deilmann GmbH). Se sembraron entre 5 y 10 semillas por maceta, se colocaron en una bandeja con solución Hoagland 0.5 x y se cubrieron con papel de nylon transparente. Las plantas se mantuvieron en cámara de cultivo, con condiciones de luz y temperatura controladas.

Luego de una semana, cuando se observó la aparición del primer par de hojas, se retiró el papel de nylon.

Para los ensayos de plántulas en placa, las semillas de *Arabidopsis thaliana* fueron desinfectadas y sembradas en placas de Petri con medio de cultivo MS agar. Luego de la ruptura de la dormancia durante 2 días en oscuridad a 4 °C, las placas se colocaron en la cámara de cultivo y se las cultivó durante el tiempo necesario en condiciones de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad) o día corto (8 h de luz y 16 h de oscuridad) según se especifica en la sección de resultados.

Transformación de *Arabidopsis thaliana*

El método que se utilizó para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* fue el de inmersión floral (*floral dip*), descrito por Clough y Bent (1998).

Se prepararon 8 macetas de 10 cm de diámetro según se especificó en la sección anterior. Las plantas se cultivaron, aproximadamente cuatro semanas, hasta la floración y cuando los pedúnculos florales estaban emergiendo, se cortaron las inflorescencias sin dañar las hojas caulinares. Dos o tres días después del corte, surgieron nuevas inflorescencias de las yemas laterales; las cuales volvieron a cortarse. Esta operación se repitió dos veces más, hasta que en todas las inflorescencias existieran al menos cuatro flores no abiertas. La transformación se realizó dos días después del último corte.

Para preparar la suspensión de transformación, se cultivaron células de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con la construcción adecuada en el vector *pBI121*, en 10 ml de medio LB suplementado con rifampicina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, estreptomycin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y kanamicina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o espectinomicina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 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 g durante 20 min y los sedimentos celulares se resuspendieron en

800 ml de solución de sacarosa al 5 % conteniendo 300 µl del detergente *Silwet L-77* (OSI Specialties, Inc.). Las plantas se sumergieron 60 s 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 vertical. Se regaron por subirrigación y las plantas se dejaron crecer hasta que las semillas estuvieran maduras, entre 4 y 5 semanas.

Finalmente, se recolectaron las semillas de cada maceta por separado, se limpiaron manualmente de los restos de vainas y tierra y se conservaron a 4 °C hasta el momento de su análisis.

Selección de transformantes de *Arabidopsis thaliana*

Las semillas recolectadas del experimento de transformación fueron esterilizadas mediante un lavado en etanol 70 % (v/v) durante 5 min, un lavado en lavandina 25 % durante 8 - 10 min y tres enjuagues con agua destilada estéril. Luego se sembraron en placas de Petri conteniendo medio MS suplementado con kanamicina 25 µg/ml, sulfadiazina 25 µg/ml o higromicina 25 µg/ml.

Para el caso de la selección con kanamicina o sulfadiazina, en los primeros días en la cámara de cultivo, la mayoría de las semillas germinaron (95–99 %). Aproximadamente a los 10 días, los cotiledones de las plantas sensibles se tornaron amarillos, mientras que los de las transformantes permanecieron verdes. Las placas se mantuvieron en la cámara de cultivo durante siete días más, hasta observar que las plantas transformadas desarrollaban hojas verdaderas, mientras que las no transformadas perecían.

Para el caso de la selección con higromicina, se siguió el protocolo propuesto por Harrison y col., 2006. Luego de un período de estratificación de 72 h, las semillas fueron expuestas a la luz durante 6 h para favorecer la germinación, y, posteriormente, las placas se mantuvieron en oscuridad total en la cámara de cultivo durante tres días. Las plantas transformadas se pudieron distinguir de las sensibles al antibiótico debido a que las transformantes elongaron el hipocotilo. Las placas se mantuvieron en la cámara de cultivo durante siete días más, hasta observar que los cotiledones se tornaron verdes.

Las plantas transformadas se pasaron a macetas con sustrato Klassman TS1 (Klasmann-Deilmann GmbH) regadas con solución Hoagland 0.5 x, y así se cultivaron hasta que las vainas estuvieron maduras. Luego se embolsó en sobres de papel cada

planta en forma individual para recolectar las semillas y conservarlas a 4 °C, hasta el momento de su análisis.

Identificación de las líneas transformantes de *Arabidopsis thaliana*

A las plantas F1 de cada construcción que habían sido seleccionadas por su resistencia al antibiótico correspondiente, se les realizó una extracción de ADN genómico a partir de una hoja de la roseta. Con el producto de esta extracción se hizo una reacción de PCR, empleando los oligonucleótidos y las condiciones de reacción de acuerdo a la construcción correspondiente. Con las líneas que dieron resultados positivos, se procedió a obtener plantas homocigotas.

Obtención de líneas homocigotas de *Arabidopsis thaliana*

Para la obtención de plantas homocigotas, se partió de las plantas transformantes identificadas en el análisis por PCR descrito en el punto anterior. En primer lugar, se cosecharon las semillas de cada planta F1 en forma independiente y se sembraron alrededor de 20 líneas en placas de Petri, para ser seleccionadas como se detalla en el punto anterior. En los casos en que se deseaba obtener plantas con una única inserción se analizó el porcentaje de resistencia de la progenie y sólo se continuó con aquellas líneas cuyas semillas fueron 75 % resistentes y 25 % susceptibles a la acción del antibiótico.

Cada una de las plantas provenientes de un evento de transformación independiente, hermanas entre sí, se trasplantó nuevamente a tierra y se la cosechó.

La siembra en placas de Petri en medio selectivo, pasaje a tierra y cosecha de semillas se repitió sucesivamente, y aquellas sublíneas en las que todas las plantas presentaron resistencia al antibiótico correspondiente fueron consideradas homocigotas. Así se obtuvieron al menos tres líneas de plantas homocigotas para cada construcción.

Transformación transitoria de plantas de *Nicotiana benthamiana*

Se utilizaron plantas de tabaco crecidas en macetas durante 21 días para transformar sus hojas. Se aplicó la técnica que utiliza *Agrobacterium tumefaciens* e infiltración con jeringa (adaptado de de Felippes y Weigel, 2010). Las bacterias se crecieron con agitación constante en medio LB a 28 °C conteniendo el plásmido binario con la construcción genética correspondiente. Al llegar a saturación, las células se centrifugaron a 2000 g por 10 min y se resuspendieron en medio de infiltración de

tabaco. Se mantuvieron en agitación suave a temperatura ambiente durante 3 h, luego se les midió la DO₆₀₀ y se las diluyó en medio de infiltración de *Nicotiana benthamiana* hasta llegar a una DO₆₀₀ de 0,4. En todos los casos se agregó al mismo tubo una suspensión de *Agrobacterium tumefaciens* transformada con un vector que permite la expresión de la proteína p19 a una DO₆₀₀ final de 0.05. p19 es una proteína supresora del silenciamiento mediado por ARNs pequeños, ya que captura ARNs de 21-25 nucleótidos, inhibiendo su función (Westhof, 2004; Canto y col., 2006). Esta suspensión bacteriana se utilizó para transformar las hojas de *Nicotiana benthamiana* en la cara abaxial mediante la ayuda de una jeringa plástica de 5 ml. Luego de 48 h, se cortaron las hojas infiltradas y se congelaron en nitrógeno líquido para su posterior análisis.

Análisis de plantas de *Arabidopsis thaliana*

Análisis histoquímico de la actividad β -glucuronidasa

Las plantas de *A. thaliana* transformadas con construcciones portando el gen reportero *GUS* se sometieron a pruebas histoquímicas de actividad β -glucuronidasa.

Para ello, las plántulas se transfirieron a una solución Na₂HPO₄ 50 mM (pH 7,0), Tritón X-100 0,1 %, X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-inolil β -D-glucuronido) 2 mM, se sometieron a vacío durante 5 min y se incubaron a 37 °C en luz durante 12 h. Luego de la incubación se fijaron en una solución de formaldehído 10 % v/v, etanol 20 % v/v y ácido acético 5 % v/v durante 10 min a temperatura ambiente. Se retiró el fijador, se agregó etanol 70 % para decolorar los tejidos y se guardaron en solución etanólica a 4 °C hasta ser fotografiadas. Las imágenes digitalizadas se tomaron con una cámara Coolpix 995 digital Nikon sobre microscopio óptico y/o lupa.

Análisis fluorométrico de la actividad β -glucuronidasa

La reacción fluorométrica se realizó siguiendo el método descrito por Welchen y González (2005). Se agregaron 5 o 10 μ l de extracto proteico a 200 μ l de una solución 1 mM de sustrato MUG (4-metilumbelliferil- β -D-glucuronido) disuelto en metanol 10 %. Los 200 μ l de cada reacción se incubaron a 37 °C en baño de agua durante 20 min. La reacción enzimática se detuvo utilizando 800 μ l de NaCO₃ 0,2 M. Los valores de medidas fluorométricas se expresaron en pmol de MU (4-metilumbelliferona) x min⁻¹ x μ g de proteínas totales⁻¹ de acuerdo a una curva patrón de RFU (unidades de

fluorescencia relativa) vs. la concentración de producto 4-MU. A fin de eliminar la actividad enzimática endógena, a cada lectura de determinación enzimática se le restó el valor correspondiente al extracto proteico proveniente de plantas no transformadas.

Medición de la longitud de los hipocotilos en plántulas

La longitud de los hipocotilos de los distintos genotipos de *Arabidopsis thaliana* fue medida siguiendo las recomendaciones de Fankhauser y Casal, 2004. Luego del tiempo de crecimiento indicado, al menos 25 plántulas por placa de cada genotipo fueron depositadas horizontalmente sobre una lámina de acetato, y escaneadas utilizando una resolución de 1200 puntos por pulgada.

La longitud de los hipocotilos fue cuantificada haciendo uso del software ImageJ. Los experimentos fueron realizados por triplicado, y repetidos al menos tres veces con distintos conjuntos de semillas. La significancia estadística de las diferencias entre los valores medios obtenidos fue analizada utilizando el lenguaje estadístico R (R Development Core Team, 2011).

Medición de la longitud de raíces en plántulas

Las semillas de los genotipos indicados se sembraron en placas de Petri conteniendo medio MS agar. Se sembraron sobre una única línea, espaciadas entre sí por 5 mm. Las placas se colocaron en posición vertical en las condiciones de cultivo indicadas anteriormente durante el período de tiempo necesario. Posteriormente se tomaron fotografías utilizando una cámara Coolpix 995 digital Nikon y se cuantificó el largo de las raíces utilizando el software ImageJ.

Medición de la longitud de la vara floral en plantas

La longitud de la vara floral se midió utilizando una regla plástica colocada de forma perpendicular a la superficie, cuidando de no dañar la planta.

Para las cinéticas de crecimiento, se consideró como tiempo 0 el día en que se pudo visualizar por primera vez el meristema floral a simple vista.

Medición de la hidratación de polen

La hidratación del grano de polen se midió utilizando flores en estadio 13 (Smyth y col., 1990) que fueron polinizadas artificialmente de acuerdo a Mayfield y Preuss (2000). La polinización se realizó bajo una lupa binocular Nikon SMZ800. El diámetro

del grano de polen se midió tomando fotografías cada 15 s luego del contacto con el estigma y durante el tiempo indicado en las figuras correspondientes. Posteriormente, las imágenes fueron analizadas utilizando el software ImageJ. Para la confección de los gráficos se promedió el diámetro de 15 granos de polen diferentes para cada genotipo, provenientes de distintas cruzas y cada experimento se repitió al menos tres veces.

Medición de la emergencia del tubo polínico

La emergencia del tubo polínico se midió de acuerdo a Boavida y McCormick, 2007. Para ello se colocó 1 ml de medio de germinación de polen sobre un portaobjetos y una vez solidificado el medio se dispersaron en la superficie granos de polen provenientes de anteras maduras. Luego se procedió a la incubación en una cámara húmeda durante el tiempo especificado en las figuras. El análisis se realizó tomando fotografías de numerosos campos en un microscopio Eclipse E200 (Nikon) y cuantificando mediante la ayuda del software ImageJ.

Visualización de calosa

Para realizar las tinciones de calosa con azul de anilina los tejidos se fijaron durante 1 h en una solución de etanol:ácido acético (3:1), se lavaron con agua, se trataron con NaOH 4 M durante una hora y se clarificaron usando NaClO 50 %. Posteriormente se tiñó con 0,1 % azul de anilina decolorado (en 0,1 M K_2HPO_4) durante 4 h. Finalmente, los tejidos se lavaron brevemente con agua y se montaron en un portaobjetos utilizando una mezcla de 0,1 % azul de anilina y 50 % de glicerol. La fluorescencia se visualizó utilizando un microscopio Nikon Eclipse E200 equipado con una cámara Nikon Coolpix L810.

Medición de la adhesión de polen

Los pistilos sin polinizar se saturaron artificialmente con granos de polen y luego se lavaron con 0.001% de Tween 20 en solución amortiguadora de fosfato (pH 7). Los granos de polen adheridos se tiñeron posteriormente con azul de anilina y se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E200 equipado con una cámara Nikon Coolpix L810.

Tratamientos de estrés hídrico en plantas

Los ensayos se realizaron con al menos 16 macetas de 10 cm x 7 cm que contenían la misma cantidad de tierra (100-120 g) y de 1 a 4 plantas de *Arabidopsis thaliana* por maceta, dependiendo del ensayo.

Para los ensayos de pérdida de agua en hojas se utilizó un estrés de tipo severo durante el período reproductivo; para ello se crecieron 4 plantas por maceta en condiciones normales de luz, riego y temperatura durante 21 días, se regaron hasta saturación y se retiró el agua sobrante para luego continuar el cultivo en las mismas condiciones descriptas. Se procuró generar una deshidratación paulatina y pareja de la tierra, girando periódicamente las macetas. En los tiempos indicados se cortaron hojas completamente desarrolladas y se determinó su peso (P_1). Estas hojas luego se colocaron en agua durante 5 h y se pesaron nuevamente (P_2). La fracción de agua perdida en la hoja se calculó como $(P_2 - P_1)/P_2$.

Para los ensayos de consumo de agua y producción se utilizó un estrés hídrico moderado en estadio reproductivo. Para ello se creció una planta por maceta y, aproximadamente 5 días luego del pasaje a estadio reproductivo, se saturaron las macetas de agua y se eliminó el excedente. Los días siguientes a este tratamiento hasta el final del ciclo de vida de las plantas, las macetas se pesaron periódicamente y se las llevó a todas a un mismo peso final, correspondiente al 50 % de la capacidad de campo, para mantener un mismo contenido de agua estimativo. Este peso fue mantenido durante el resto del ciclo de vida. Las bandejas se rotaron periódicamente para lograr una mayor homogeneidad. Se cuantificó la cantidad de agua agregada durante la totalidad del ensayo y la producción (en gramos de semillas por planta) que generaron las plantas estresadas y no estresadas.

Cortes histológicos

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

Soluciones utilizadas

Medio de infiltración de *Nicotiana benthamiana*: MgCl₂ 10 mM; MES pH 5,2 10 mM; acetosiringona 150 μM.

Solución I de Minipreparación: Tris-HCl 25 mM (pH 8); glucosa 50 mM; EDTA 10 mM.

Solución II de Minipreparación: NaOH 0,2 N; SDS 1% (p/v).

Solución III de Minipreparación: KAc 5 M, pH 5,2.

Solución de Extracción de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana*: Tris-HCl 200 mM (pH 8,0); NaCl 250 mM; EDTA 25 mM; SDS 0,5 % (p/v).

Solución de siembra de ADN: Azul de bromofenol 0,25 % (p/v); xilencianol FF 0,25 % (p/v); glicerol 30 % (v/v).

Solución Hoagland 1 x: NH₄H₂PO₄ 115,04 mg/l; KNO₃ 606,6 mg/l; Ca(NO₃)₂ 656,4 mg/l; MgSO₄ 240,78 mg/l; Fe-EDTA 20 μM; H₃BO₃ 2,86 mg/l; MnCl₂ 4H₂O 1,81 mg/l; ZnSO₄ 7H₂O 0,22 mg/l; CuSO₄ 5H₂O 0,08 mg/l; H₂MoO₄ H₂O 0,02 mg/l.

Solución TAE 1 x: Tris-Ac 20 mM (pH 8,5); EDTA 1 mM.

Tris-HCl pH 8: Tris 1M, HCl 0,029 M.

Tris-HCl pH 7: Tris 1M; HCl 0,046 M.

Medio de infiltración de *Nicotiana benthamiana*: MgCl₂ 10 mM; MES pH 5,2 10 mM; acetosiringona 150 μM.

Solución amortiguadora de extracción de proteínas: Solución fosfato de sodio pH 7,00 50 mM; EDTA pH 8,00 10 mM; SDS 0,1 %; β-mercaptoetanol 10 mM; Tritón X-100 1 %.

Trizol preparado en el laboratorio:

Preparación del fenol ácido:

- Se fundió el fenol en un baño a 68 °C.
- Se adicionó 0,1 % de hidroxiquinoleína (antioxidante, inhibidor de ARNasas).
- Se adicionó agua bidestilada para saturar.
- Se dejó descansar un día.
- Se extrajo el agua de la fase superior y se le adicionó agua nueva.
- Se repitieron los dos últimos pasos dos veces más.

- Se fraccionó en frascos, se rotuló y se guardó en heladera.
- De esta forma, el fenol es estable entre 8 a 10 meses.

Preparación de 100 ml de Trizol: fenol ácido 38 ml; tiocianato de guanidina (0,8 M) 9,453 g; tiocianato de amonio (0,4 M) 3,045 g; NaAc pH 5,0 (0,1 M) 3,34 ml del stock 3 M; glicerol (5 %) 5,75 ml del stock 87 %; agua bidestilada hasta 100 ml.



Capítulo 1:

El factor de transcripción AtHB13 cumple un papel importante en el desarrollo de la planta durante el estadio reproductivo

Introducción

Los factores de transcripción HD-Zip I AtHB13 y AtHB23

AtHB13 y su gen parálogo *AtHB23* codifican factores de transcripción (FTs) de la familia HD-Zip I. Recientemente fueron clasificados dentro del grupo V en una reconstrucción filogenética realizada sobre esta familia (Arce y col., 2011). Estos FTs tienen un 78 % de identidad de secuencia en el dominio HD-Zip y presentaron patrones de expresión muy similares en ensayos de histoquímica de plantas transformadas con construcciones en las cuales las secuencias promotoras dirigen la expresión del gen reportero *GUS*. En ambos casos se detectó expresión de *GUS* en el meristema apical, la unión de hojas al tallo, la región basal de los pétalos, sépalos y estambres y en el estigma. (Hanson y col., 2002; Kim y col., 2007). A pesar de tener un patrón de expresión espacio-temporal similar, los estudios disponibles indican que la expresión de *AtHB13* y *AtHB23* se regula de diferente manera: los transcritos de *AtHB13* aumentaron en respuesta a sequía, estrés salino y bajas temperaturas (Cabello y col., 2012; Cabello y Chan, 2012), mientras que los de su parálogo se redujeron en tratamientos con ABA y NaCl (Henriksson y col., 2005), lo que indica que estos parálogos probablemente tienen funciones diferentes.

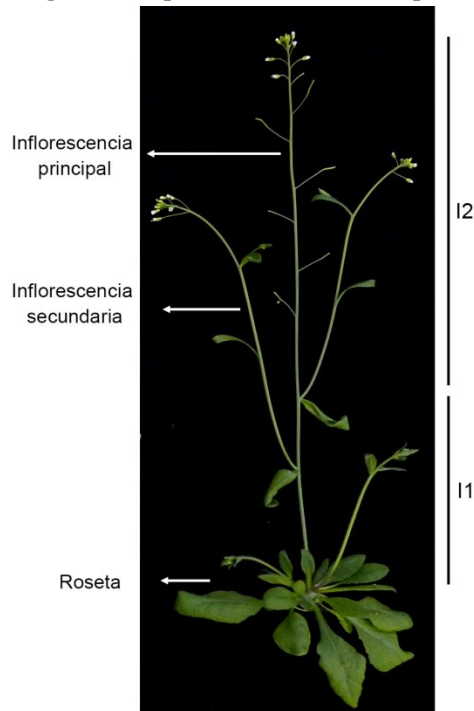
Cuando *AtHB13* fue sobreexpresado en plantas de *Arabidopsis thaliana* se observaron alteraciones en el desarrollo de los cotiledones y hojas en respuesta a la disponibilidad de carbono durante estadios tempranos del desarrollo (Hanson y col., 2001). En trabajos más recientes, también trabajando con sobreexpresantes, se describió que este gen confiere tolerancia a condiciones de congelamiento, sequía severa y estrés salino mediante un mecanismo de estabilización de membranas (Cabello y col., 2012; Cabello y Chan, 2012). También se demostró más tarde que estas plantas son capaces de resistir infecciones causadas por oomycetes (*Hyaloperonospora arabidopsidis*) y áfidos (*Myzus persicae*; Gao y col., 2014)

AtHB23 se describió como una proteína capaz de interactuar con el fitocromo B (PhyB); las plantas mutantes en este gen mostraron hipocotilos largos, defectos en la germinación de las semillas y en la expansión de los cotiledones cuando se crecieron bajo luz roja. Estos fenotipos diferenciales indicaron que *AtHB23* es una proteína importante en el reconocimiento de luz roja mediado por el fitocromo B (Choi y col., 2014).

La vara floral de *Arabidopsis thaliana*

La arquitectura de la porción aérea de una planta depende del número, tamaño, forma y posición de sus hojas, tallos y flores (Benlloch y col., 2007). Todos estos órganos derivan del meristema apical (SAM, del inglés: *Shoot Apical Meristem*), un pequeño grupo de células localizadas en el ápice superior (Wolpert y Tickle, 2010). Luego de la germinación, el SAM es un meristema vegetativo, capaz de producir hojas y ramas, pero cuando las condiciones endógenas y ambientales son adecuadas se produce la transición a la etapa reproductiva y el SAM se convierte en un meristema de inflorescencia, capaz de producir flores (Huijser y col., 2011; Andrés y Coupland, 2012). En el caso de *Arabidopsis*, durante la fase vegetativa el SAM sólo produce hojas sin elongación de los internodos, formando una roseta (**Imagen 8**); pero luego de la transición a la etapa reproductiva, los internodos sí elongan, lo que genera la inflorescencia principal. En la formación de la inflorescencia principal se pueden distinguir dos fases; en la primera (I1) el SAM produce hojas caulinares en sus costados, que acompañan inflorescencias secundarias axilares; en la segunda fase (I2), el SAM produce flores sin hojas subyacentes (**Imagen 8**; Ratcliffe y col., 1998). Durante todas las etapas de crecimiento es fundamental la coordinación correcta entre la proliferación celular, la diferenciación y la elongación para generar una estructura adecuada (Maeda y col., 2014).

Imagen 8: Arquitectura aérea de la planta de *Arabidopsis thaliana*



Fotografía ilustrativa de una planta de *Arabidopsis thaliana* de 35 días. *Izquierda:* se señalan las principales estructuras que forman la parte aérea de esta especie. *Derecha:* se marcan las dos partes de la inflorescencia principal.

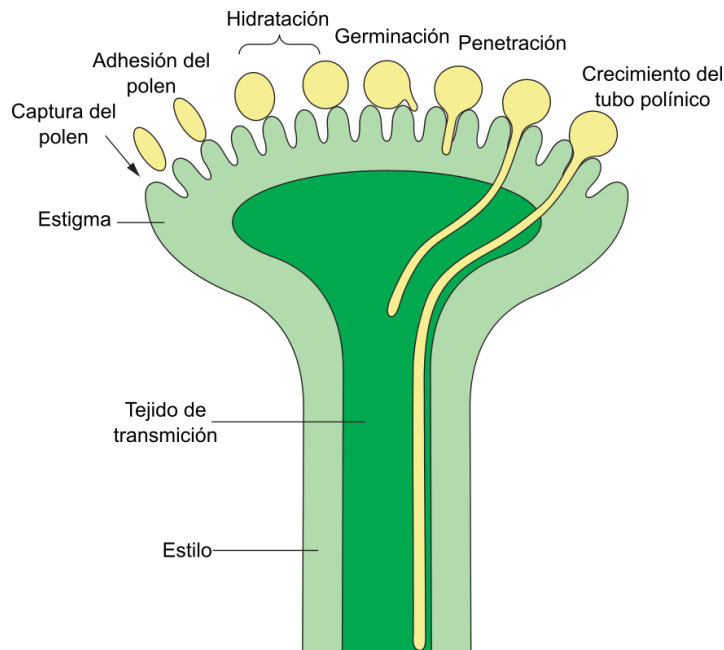
Polinización en *Arabidopsis*

En angiospermas, la polinización comienza cuando un grano de polen desecado entra en contacto con el estigma. Este proceso se denomina interacción polen-pistilo (Heslop-Harrison, 1975) y consiste de seis fases diferentes (Hiscock y Allen, 2008) que se esquematizan en la **Imagen 9**:

- 1) Captura y adhesión del grano de polen en el estigma
- 2) Hidratación del grano de polen
- 3) Germinación y producción del tubo polínico
- 4) Penetración del tubo polínico en el estigma
- 5) Crecimiento del tubo polínico a través del estigma y estilo
- 6) Entrada del tubo polínico al óvulo y descarga de las células espermáticas

En una interacción polen-pistilo compatible, los seis pasos se completan, dando como resultado una doble fertilización para formar el cigoto y el endosperma (Lord y Russell, 2002; Dresselhaus y col., 2006). Cuando la interacción es incompatible (entre diferentes especies, o en casos de autopolinización en plantas con autoincompatibilidad), alguno de estos pasos es defectuoso y la polinización se ve abortada.

Imagen 9: Interacción polen-pistilo en plantas con estigmas secos.



Diferentes estadios de la interacción polen-estigma. El esquema representa un estigma del tipo papilas secas, presente en la mayoría de las especies Brassicaceae. Se esquematizan granos de polen en distintos estadios de desarrollo sobre el estigma y creciendo dentro del tejido de transmisión del estilo. Adaptado de Hiscock y Allen, 2008.

La hidratación del grano de polen en estigmas secos está regulada muy finamente ya que este es uno de los principales puntos de rechazo del polen en los casos de incompatibilidad (Sarker y col., 1988; Hülskamp y col., 1995). Luego de la captura inicial, los pasos siguientes son interacciones fuertes entre el grano y las papilas del estigma que involucran proteínas y lípidos presentes en ambas superficies (Chapman y Goring, 2010). Respecto a los granos, es necesaria la cubierta del polen, una mezcla de lípidos y proteínas que se encuentra depositada en los intersticios de la exina.

La cubierta del polen cumple un rol vital en el contacto temprano entre el grano de polen y el estigma. Luego de la anthesis, la cubierta protege al grano de polen de la deshidratación extrema, contribuye a la adhesión al estigma y permite la hidratación del grano (Edlund y col., 2004). Algunas de las proteínas presentes en la cubierta del polen son proteínas similares a oleosinas, enzimas y pequeñas moléculas de la cubierta del polen (PCPs;). (Stephenson y col., 1997; Mayfield y col., 2001; Murphy, 2006). La cubierta del grano de polen es producida y almacenada en las células del tapetum, dentro de la antera, y luego de la apoptosis de las mismas se deposita en los granos de polen que se encuentran en el saco polínico (Heslop-Harrison, 1968).

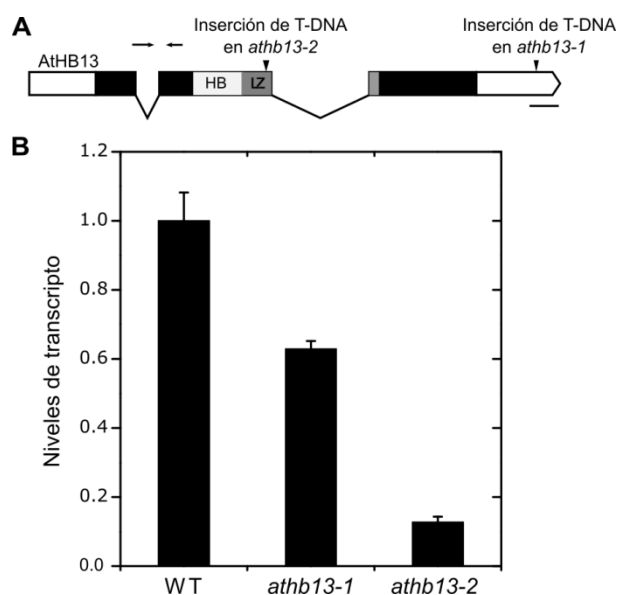
Resultados

La vara floral de plantas mutantes *athb13* crece más rápido que en plantas salvajes

Con el objetivo de conocer la función natural de *AtHB13* en *Arabidopsis thaliana*, se decidió hacer una caracterización exhaustiva de las plantas mutantes en ese gen. Para ello se obtuvieron semillas homocigotas de dos líneas mutantes distintas, denominadas *athb13-1* y *athb13-2*. La primera posee una inserción dentro de la región 3'UTR de *AtHB13*, mientras que en la segunda la inserción se encuentra dentro de la región codificante del cierre de leucinas.

Para confirmar que *AtHB13* se encontraba silenciado en estas líneas se decidió medir los niveles de transcritos de este gen. La mutante *athb13-1* mostró ser una planta silenciada en *AtHB13*, con niveles de transcritos 40 % menores respecto de los medidos en plantas salvajes. Por su parte, la mutante *athb13-2* tenía un mayor nivel de silenciamiento, y los transcritos de *AtHB13* disminuían un 90 % con respecto a los controles. En la **Imagen 10** se muestra un esquema de *AtHB13*, marcando los sitios de inserción para cada línea mutante y los niveles de transcritos de *AtHB13* correspondientes.

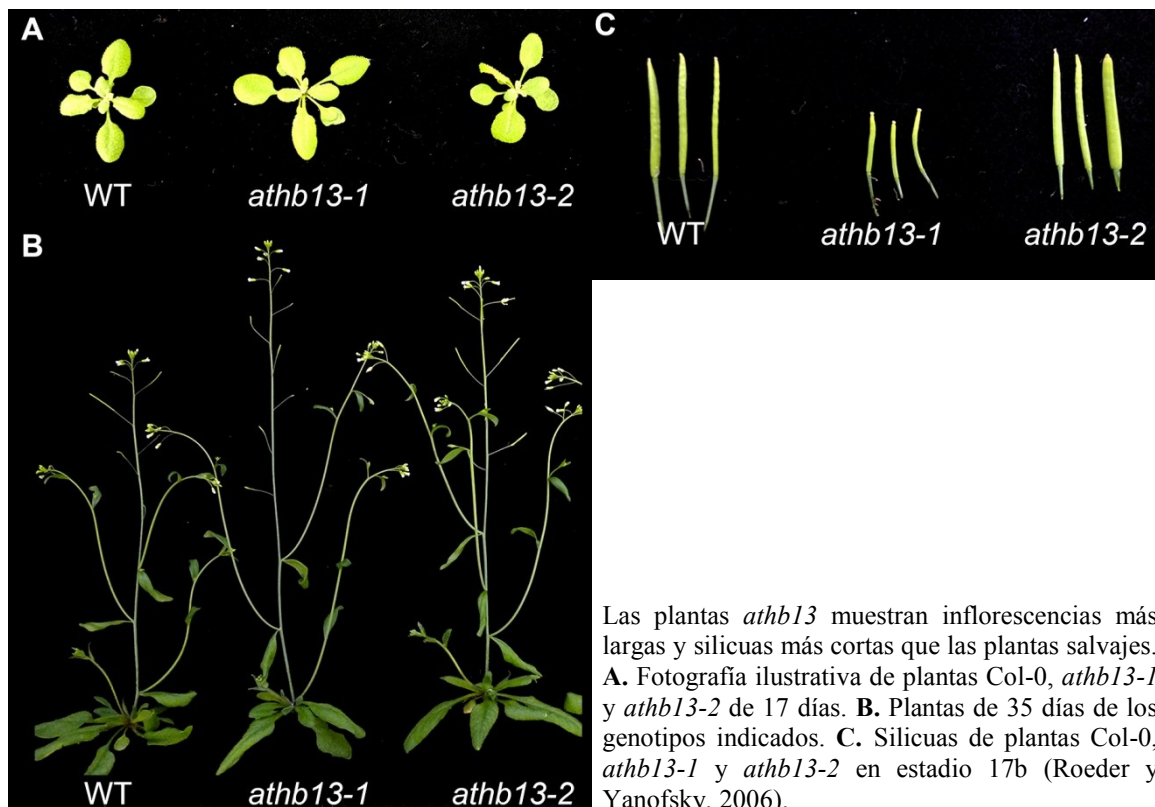
Imagen 10: Los transcritos de *AtHB13* se reprimen en distinto grado en dos mutantes diferentes



A. Representación esquemática del gen *AtHB13*. Cajas blancas: 5' y 3'UTRs, Cajas negras: exones, líneas: intrones, puntas de flechas: posición de las inserciones en cada mutante, flechas: sitios de unión de los oligonucleótidos usados en las reacciones de RT-qPCR. HB: homeobox, LZ: cierre de leucinas. Barra: 100 pb. **B.** Niveles de transcritos relativos de *AtHB13* en inflorescencias de plantas de 40 días. Los niveles de transcritos se relativizaron a los de plantas Col-0 aplicando el método $\Delta\Delta Ct$. Los transcritos de actinas (*ACTINA2* y *ACTINA8*) se utilizaron como referencia.

En el análisis fenotípico que se realizó a las dos líneas mutantes descritas, ninguna presentó alteraciones morfológicas o del desarrollo temporal durante la fase vegetativa, comparando con plantas salvajes de fondo Col-0 (**Imagen 11.A**). Luego del pasaje a floración, ambas mutantes mostraron una elongación de la vara floral más rápida y, hacia el final del ciclo de vida, este órgano era de mayor longitud que en plantas controles (**Imagen 11.B**), lo que indica que *AtHB13* funcionaría como un regulador negativo de la elongación de la vara floral. Además, durante el estadio reproductivo se pudo observar que las plantas *athb13-1* tenían silicuas más cortas que las plantas salvajes, pero esto no ocurría en la línea *athb13-2* (**Imagen 11.C**). Curiosamente, ni las anteras ni los carpelos de *athb13-1* mostraron defectos morfológicos visibles, siendo que los niveles de transcritos de *AtHB13* en las plantas *athb13-2* era un 10 % de los medidos en plantas salvajes, considerablemente menores que los evaluados en las plantas *athb13-1*.

Imagen 11: Las plantas *athb13* presentan un fenotipo diferencial en estadio reproductivo



Para profundizar la caracterización de este gen, se decidió analizar el patrón de expresión de *AtHB13* en plantas transgénicas que poseían la construcción *PromAtHB13:GFP:GUS*, en las cuales el fragmento de 1772 pb localizado corriente arriba del sitio de inicio de la traducción de *AtHB13* controla la expresión de los genes reporteros *GFP* y *GUS*. El análisis se realizó mediante histoquímica y la expresión de *GUS* fue evidente en la base de la vara floral en el momento del pasaje a floración y durante los días subsiguientes (**Imagen 12**). En plantas maduras, la expresión del reportero se vio en la región superior de la vara floral. Estas observaciones fueron acordes con una función del gen en la elongación de la vara floral, indicando que *AtHB13* cumple un papel en el desarrollo de este órgano.

Imagen 12: Cinética de expresión de *AtHB13* en la vara floral



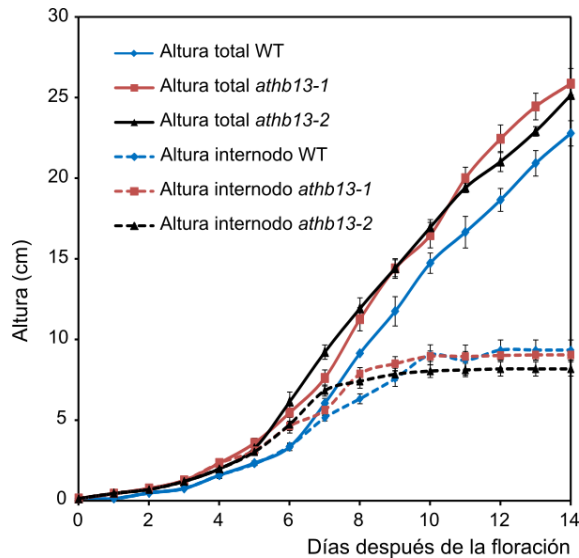
Detección histoquímica de la actividad enzimática de GUS en plantas *PromAtHB13:GFP:GUS* en los estadios del desarrollo indicados.

Siguiendo con la caracterización de *AtHB13*, se realizaron análisis cinéticos del crecimiento de la vara floral en los distintos genotipos en los cuales varía la expresión de este gen (**Imagen 13.A**). En ambas líneas mutantes (*athb13-1* y *athb13-2*) la vara floral creció más rápido que en las plantas control, tomando el momento en que la planta pasó a estadio reproductivo como tiempo cero. Esta diferencia en la velocidad del crecimiento se mantuvo hasta alcanzar la maduración completa de la planta, dando como resultado inflorescencias más largas en los genotipos mutantes comparadas con las de los controles.

La longitud de las varas florales se midió también separando dos sectores, uno que incluye los tejidos generados durante la fase I1 del desarrollo del SAM (región comprendida entre la roseta y el internodo superior) y otro incluyendo la región entre el internodo superior y la flor más joven (tejidos formados durante la fase I2 del desarrollo del SAM – Ver **Imagen 8**). Así se pudo observar que las diferencias en el crecimiento eran evidentes en la región comprendida entre el internodo superior y la flor, mientras

que la otra región no mostraba diferencias de elongación entre genotipos (**Imagen 13.A**).

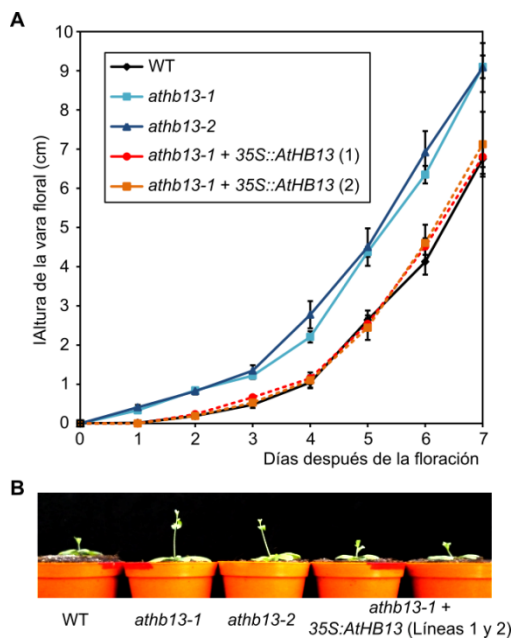
Imagen 13: Cinética de elongación de la vara floral de plantas *athb13*



Cinética de elongación de la vara floral en plantas salvajes (WT), *athb13-1* y *athb13-2*. Se considera tiempo 0 el día en que las plantas pasaron a estadio reproductivo. Cada punto representa la altura promedio de 16 plantas. Barras: error estándar.

Para comprobar que los fenotipos observados se debían a la mutación en *AtHB13* y no a la presencia de una segunda inserción en cada una de estas líneas, se transformaron plantas *athb13-1* homocigotas con la construcción *35S:AtHB13* y se evaluó el fenotipo de elongación de la vara floral en dos líneas insercionales independientes. La **Imagen 14** ilustra el hecho de que el fenotipo de las plantas complementadas fue indistinguible del de plantas salvajes. Esto implica que *AtHB13* es efectivamente responsable de las alteraciones en el desarrollo observadas.

Imagen 14: *AtHB13* es responsable del fenotipo de elongación rápida de la vara floral

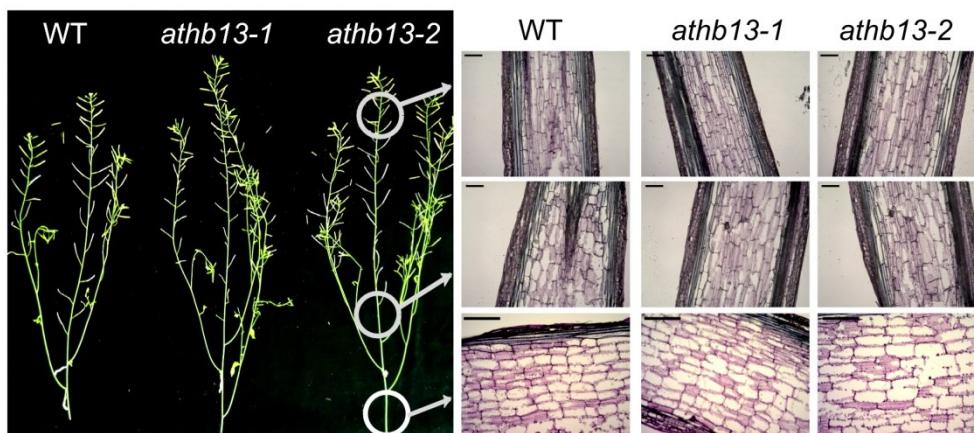


A. Cinética de la elongación de la vara floral en plantas WT, *athb13-1*, *athb13-2* y dos líneas independientes de plantas *athb13-1* complementadas con la construcción *35S::AtHB13*. Se considera tiempo 0 el día en que las plantas pasaron a estadio reproductivo. Cada punto representa la altura promedio de 16 plantas. Barras: error estándar. **B.** Imágenes representativas tomadas 4 días después del pasaje a estadio reproductivo para los genotipos indicados.

La mayor elongación de la vara floral en las mutantes *athb13* se debe a una mayor tasa de división celular.

Con el fin de determinar si las diferencias observadas se debían a una mayor tasa de división celular o a una diferencia en el tamaño final de las células, se realizaron cortes histológicos longitudinales en distintas regiones de la vara floral (**Imagen 15**). La longitud de las células se midió utilizando las fotos obtenidas. No se encontraron diferencias significativas entre los distintos genotipos, lo que indicaría que la diferencia morfológica se debería a un mayor nivel de división celular.

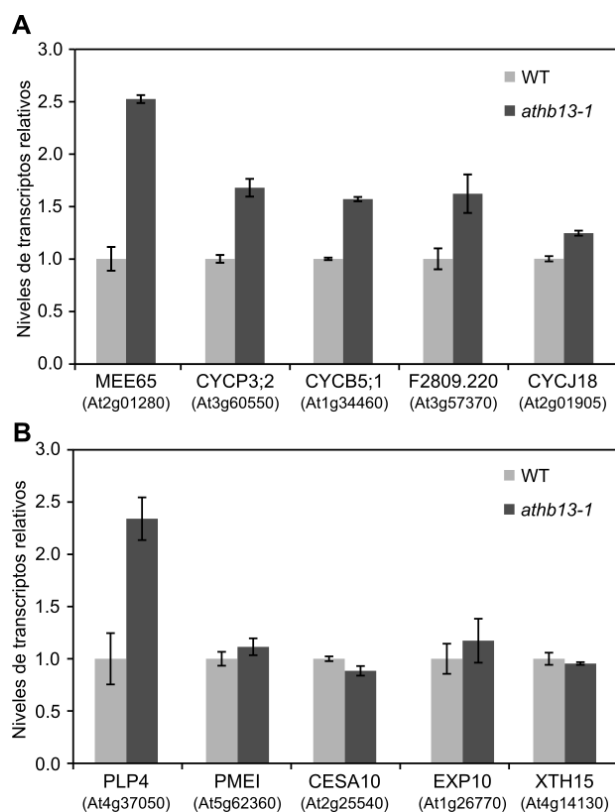
Imagen 15: Las plantas *athb13* presentan células de igual tamaño que las plantas salvajes.



Panel izquierdo: fotografía ilustrativa de plantas de 35 días de genotipos WT, *athb13-1* y *athb13-2* en la que se señalan con círculos las regiones tomadas para realizar los cortes histológicos. *Panel derecho:* cortes histológicos longitudinales de las diferentes zonas de la vara floral indicadas. Las secciones se tiñeron con azul de metileno. Barras: 0,25 mm.

Para analizar esto con mayor profundidad se decidió medir en plantas *athb13-1* y salvajes (WT) los niveles de transcritos de cinco genes diferentes relacionados con la expansión celular y otros cinco genes involucrados en la división celular. Dentro del primer grupo se encontraban los genes *PMEI* (*PLANT INVERTASE/PECTIN METHYLESTERASE INHIBITOR SUPERFAMILY PROTEIN*), *CESA10* (*CELLULOSE SYNTHASE 10*), *EXP10* (*EXPANSIN 10*), *PLP4* (*PATATIN-LIKE PROTEIN 4*) y *XTH15* (*XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE 15*) mientras que el segundo grupo estaba formado por genes que codifican para diversas ciclinas. Como se esperaba, los genes que codifican ciclinas se encontraban inducidos en las inflorescencias de plantas mutantes, mientras que los niveles de transcritos de *PMEI*, *CESA10*, *EXP10* y *XTH15* no mostraron diferencias significativas entre plantas *athb13-1* y WT. Curiosamente, los mensajeros de *PLP4*, un represor de la elongación celular (Li y col., 2011) se encontraban inducidos en las plantas mutantes (**Imagen 16**). Estas observaciones confirmaron que la función de *AtHBI3* como regulador negativo en la elongación de la vara floral se debe a una represión de la tasa de división celular.

Imagen 16: La expresión de genes involucrados en la división celular está aumentada en plantas mutantes.



A y B: expresión diferencial en plantas WT y *athb13-1* de cinco genes que codifican ciclinas involucradas en la división celular. **(A)** y de cinco genes involucrados en la expansión celular **(B)**. Los niveles de transcritos se normalizaron aplicando el método $\Delta\Delta Ct$. Barras de error: \pm SD calculada a partir de tres replicas biológicas independientes. Los transcritos de actinas (*ACTINA2* y *ACTINA8*) se utilizaron como referencia.

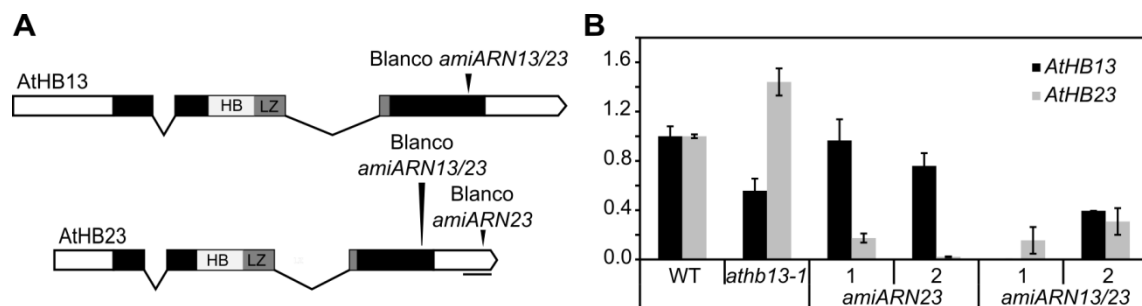
AtHB23 también regula negativamente la elongación de la vara floral.

Teniendo en cuenta el fenotipo observado en las plantas *athb13* y la capacidad de *AtHB13* de rescatarlo, nos interesó analizar si *AtHB23*, el gen parálogo de *AtHB13* tenía alguna función relacionada. Puntualmente quisimos saber si *AtHB23* también estaba involucrado en este proceso del desarrollo o si la función de ambos parálogos era totalmente distinta. Al momento de iniciar este trabajo, en las bases de recursos públicos no existían plantas mutantes *athb23* apropiadas y la única disponible poseía una segunda inserción en el gen *AtATH3*. Considerando la dificultad y el tiempo requerido para obtener una planta *athb23* a partir de esta línea con dos inserciones, decidimos crear plantas silenciadas en *AtHB23* utilizando microARNs artificiales. Para eso se diseñó un microARN artificial que permitía silenciar a *AtHB23* siguiendo las recomendaciones y protocolos propuestos por Schwab y col., 2006. La construcción obtenida se introdujo en plantas Col-0 a fin de obtener plantas *athb23* de ese fondo (*amiARN23*). Conjuntamente se diseñó un microARN artificial que permitía silenciar

tanto a *AtHB13* como a *AtHB23* y se transformaron plantas Col-0 para generar líneas *athb13/athb23* (*amiARN13/23*).

Para confirmar que efectivamente habíamos logrado obtener plantas silenciadas en los genes de interés, se midieron mediante RT-qPCR los niveles de transcritos de *AtHB13* y *AtHB23* en diversas líneas insercionales independientes para cada genotipo y se continuó el trabajo con aquellas que mostraban los niveles de silenciamiento más altos. La **Imagen 17** muestra un esquema de ambos genes de interés marcando el sitio blanco de los microARNs diseñados, además de los niveles de transcritos obtenidos en las líneas con las que se continuó el trabajo. Tal como se muestra en la imagen, los transcritos de *AtHB23* fueron claramente reprimidos tanto en las plantas silenciadas simples como en las dobles, mientras que los niveles de *AtHB13* sólo se modificaron en las plantas doblemente silenciadas (**Imagen 17**).

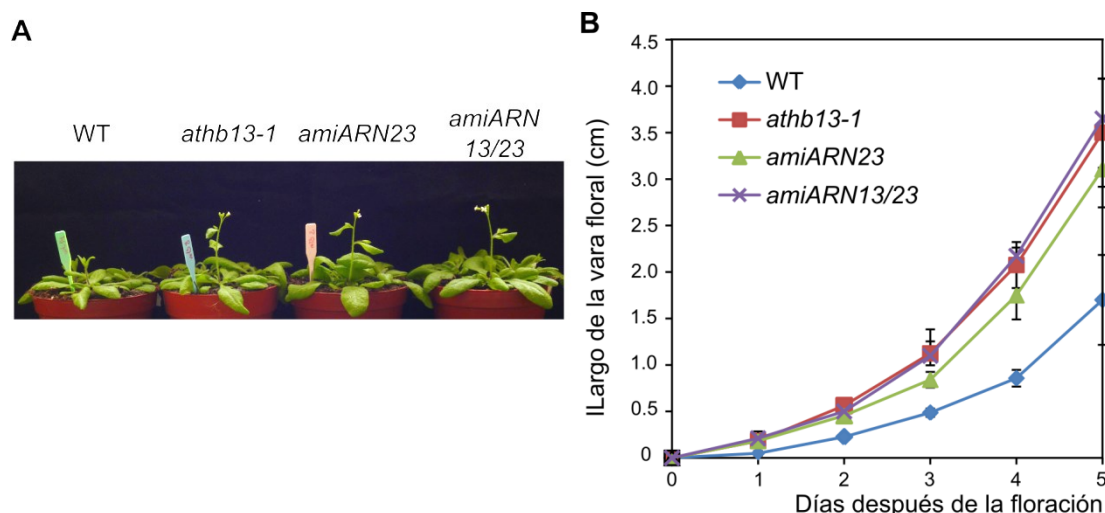
Imagen 17: Expresión de *AtHB13* y *AtHB23* en plantas silenciadas generadas utilizando microARNs artificiales.



A. Representación esquemática de los genes *AtHB13* y *AtHB23*. Blanco: 5' y 3'UTRs, Negro: exones, líneas: intrones, Flechas: secuencias blanco de los microARNs artificiales. HB: homeobox, LZ: cierre de leucinas. Barra: 100 pb. **B.** Niveles de transcritos relativos de *AtHB13* y *AtHB23* en inflorescencias de plantas de 35 días. Los niveles de transcritos se relativizaron a los de plantas Col-0 aplicando el método $\Delta\Delta Ct$. Los transcritos de actinas (*ACTINA2* y *ACTINA8*) se utilizaron como referencia.

Habiendo confirmado que las plantas obtenidas eran adecuadas se procedió a analizar la elongación de la vara floral en las mismas mediante una cinética de crecimiento (**Imagen 18**). En los tres genotipos silenciados se pudieron observar inflorescencias más largas que en las plantas salvajes, con cinéticas de crecimiento similares a las obtenidas en plantas *athb13* (**Imagen 18.B**). Estos resultados indicaron que ambos parálogos están involucrados en la elongación de la vara floral de forma independiente y que ambos ejercen roles negativos en este proceso del desarrollo.

Imagen 18: *AtHB23* es también un regulador negativo del crecimiento de la vara floral.

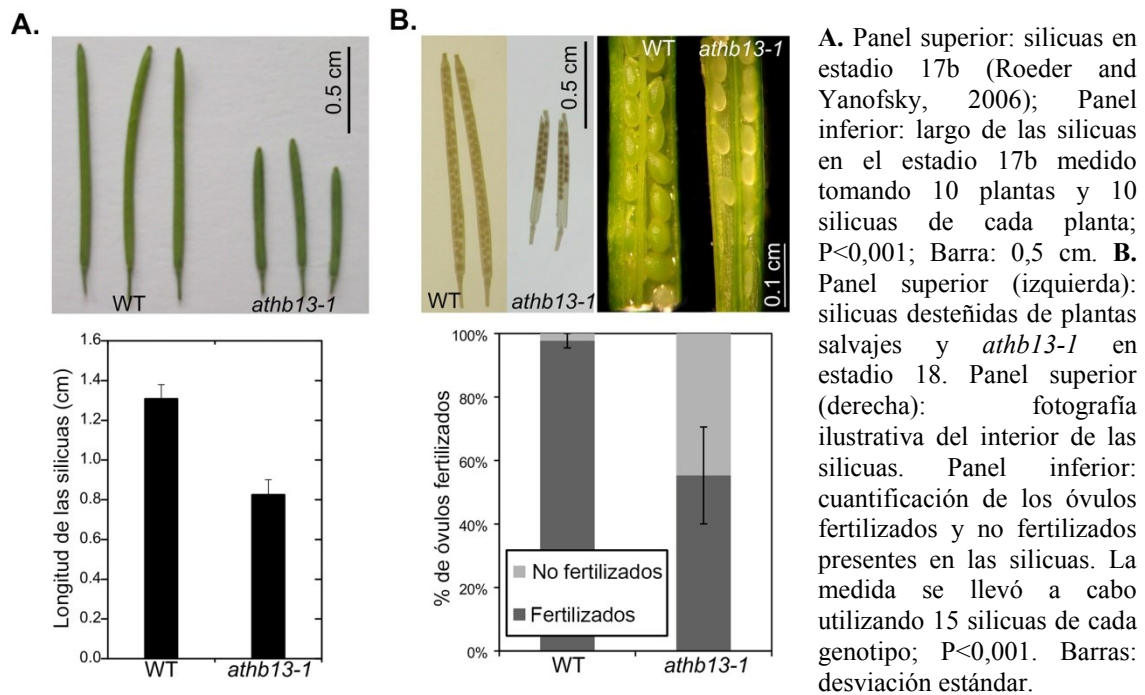


A. Plantas WT, *athb13-1*, *amiARN23* y *amiARN13/23* de 25 días mostrando la diferencia en la altura de la vara floral. **B.** Cinética de crecimiento de la vara floral en los distintos genotipos indicados. Se considera tiempo 0 el día en que las plantas pasaron a estadio reproductivo. Cada punto representa la altura promedio de 16 plantas. Barras: error estándar.

Las plantas mutantes *athb13-1* presentan silicuas más cortas, menos semillas y mayor cantidad de óvulos no fertilizados que sus controles

La **Imagen 11** muestra que las plantas *athb13-1* además de las diferencias descritas en el crecimiento de la vara floral también tienen silicuas de menor tamaño que las plantas salvajes. Se realizó una cuantificación de la longitud de las silicuas, y los resultados indicaron que la diferencia en los tamaños era significativa (**Imagen 19.A**). También se analizó la morfología interna de las silicuas maduras y se pudo observar que las mismas poseían semillas completamente desarrolladas en su interior, pero en menor cantidad que los controles. Además, las semillas se ubicaban principalmente en la parte más alejada del pedicelo (**Imagen 19.B**). Cuando se examinaron las silicuas en el estadio 17b (Roeder y Yanofsky, 2006) se observó que poseían el mismo número total de óvulos, pero numerosos óvulos en la parte inferior no estaban fertilizados (**Imagen 19.B**). Cabe destacar que las flores de las plantas mutantes no presentaban ningún defecto morfológico o del desarrollo visible.

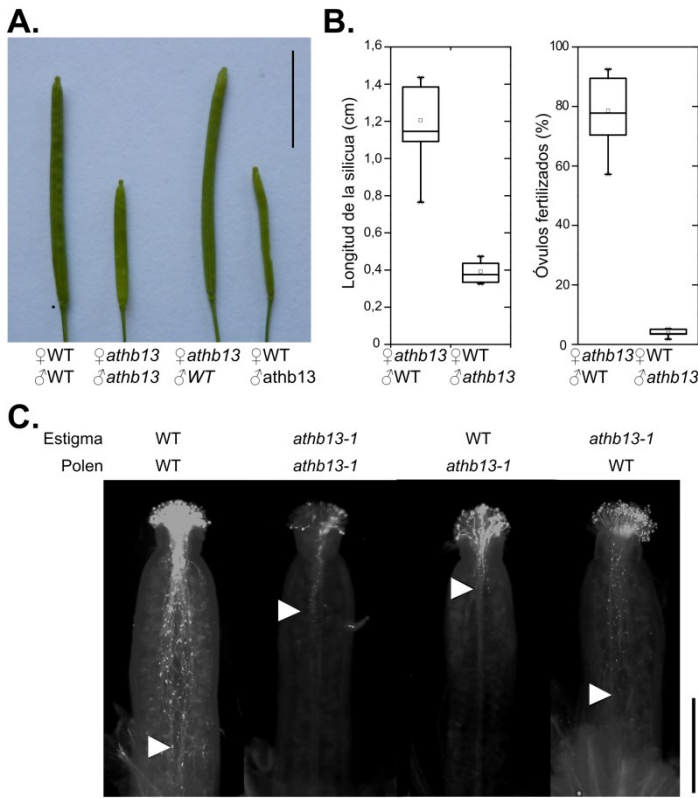
Imagen 19: Las plantas *athb13-1* presentan silicuas cortas y óvulos no fertilizados



La presencia de óvulos no fertilizados en las plantas *athb13-1* se debe a una deficiencia en la germinación de polen

La pregunta lógica que surgía a partir de las observaciones descritas más arriba, era si el fenotipo diferencial era específico de la parte masculina o femenina de la flor. Para responder esto se realizaron cruza recíprocas entre plantas salvajes y mutantes *athb13-1*. Cuando se polinizaron estigmas WT con polen proveniente de plantas *athb13-1*, las silicuas obtenidas presentaron un fenotipo idéntico al observado en las plantas mutantes. Por otra parte, cuando se utilizó polen WT para polinizar estigmas mutantes, los frutos obtenidos fueron de fenotipo salvaje. En conjunto, ambas observaciones indicaron que el fenotipo aberrante en las silicuas se debía a un defecto en los granos de polen (**Imagen 21.A y B**).

Imagen 20: La polinización cruzada entre plantas *athb13-1* y WT indican que el polen es defectuoso en las plantas mutantes

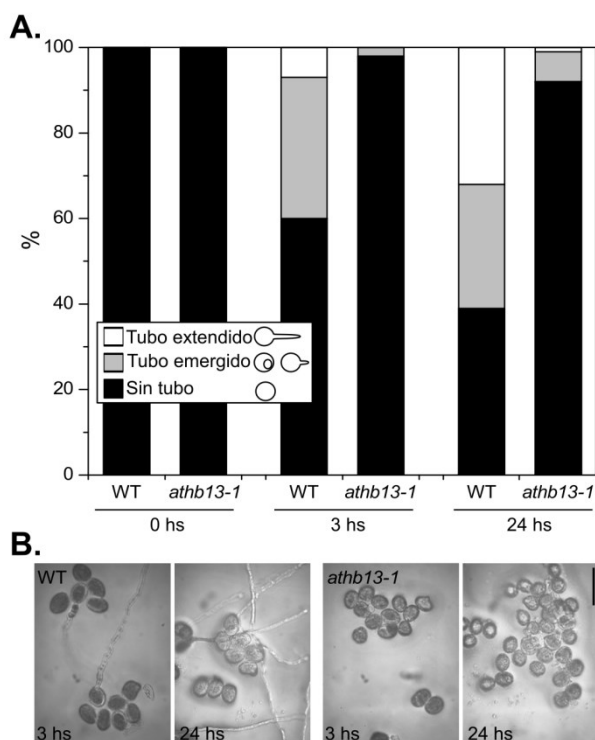


A. Silicuas obtenidas luego de la polinización cruzada entre plantas WT y *athb13-1*, cambiando el dador del estigma y el polen según se indica. Para cada cruce se utilizaron 15 flores en estadio 12 (Smyth y col., 1990). Barra: 0,5cm. (♀: estigma; ♂: polen). **B.** Diagrama de caja mostrando el largo de las silicuas y el porcentaje de óvulos fertilizados por silicua obtenidos en las polinizaciones cruzadas (n: 15 por cruce; $P < 0.001$). **C.** Fotografía ilustrativa de granos de polen en las cruces indicadas en la parte superior de la imagen. Los granos de polen se tiñeron con azul de anilina y luego se visualizaron bajo un microscopio de epifluorescencia. Las fotografías se tomaron 24 h luego de la polinización. Las flechas indican la longitud máxima alcanzada por el tubo polínico en cada caso. Barra: 500 μ m.

Las tinciones realizadas con azul de anilina en carpelos, 24 h luego de ser polinizados, confirmaron que sólo algunos granos de polen de las plantas *athb13-1* fueron capaces de germinar, tanto en estigmas salvajes como mutantes. De hecho, los tubos polínicos de las plantas *athb13-1* sólo alcanzaron la parte superior del ovario (**Imagen 20.C**). Cabe aclarar que las tinciones con azul de anilina permiten observar tejidos que contienen calosa, un polisacárido abundante en la pared celular del tubo polínico.

Consistentemente con los resultados mostrados antes, sólo un 10 % de los granos de polen de plantas *athb13-1* fue capaz de germinar y extender el tubo polínico cuando se hizo una germinación *in vitro* (**Imagen 21**).

Imagen 21: Los granos de polen *athb13-1* muestran una menor capacidad de germinación que los granos salvajes incluso *in vitro*



A. Cinética de la emergencia del tubo polínico en medio sólido ($n > 100$ granos de polen de cada genotipo en cada punto). **B.** Fotografías representativas de granos de polen 3 y 24 h luego del inicio del ensayo de germinación *in vitro*.

El déficit en el crecimiento del polen se debe a una interacción anormal entre el grano de polen y el estigma que impide la correcta hidratación del grano

Luego de inspeccionar la morfología general de los granos de polen de las plantas *athb13-1* (valiéndonos de la autofluorescencia que muestra la capa de exina que cubre al grano), y tras comprobar que no existían diferencias morfológicas evidentes (**Imagen 22**), decidimos profundizar en los pasos que debe sufrir un grano de polen para poder germinar sobre un estigma seco, como el de *Arabidopsis thaliana*.

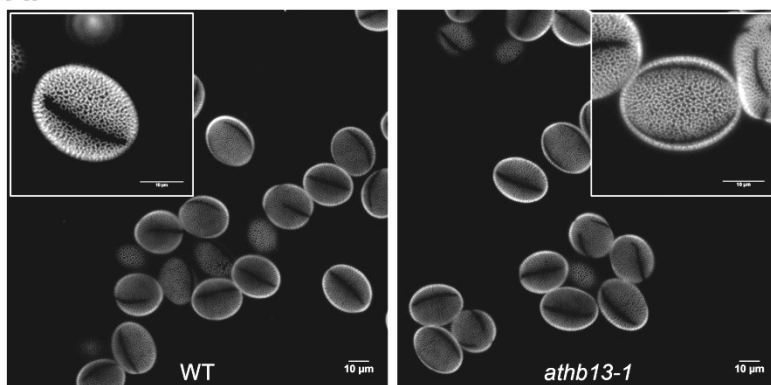
Son tres los eventos principales que deben ocurrir en una planta con estigma seco para permitir la germinación del grano de polen una vez que éste aterriza en el estigma: la adhesión del grano, la formación del pie y la hidratación. En *Arabidopsis*, la adhesión del polen es un evento crucial en el rechazo de los granos de polen de otra especie e implica una serie de numerosas interacciones célula-célula que aún no han sido bien caracterizadas (Heslop-Harrison, 2000; Chapman y Goring, 2010). Los granos de polen de *Arabidopsis* sólo se hidratarán si la adhesión se completó correctamente y el grano fue reconocido como de la misma especie. Por su parte, todos los granos de polen de

otra especie que caigan sobre el estigma de *Arabidopsis* se verán impedidos de hidratarse (Zinkl y col., 1999). Por eso decidimos en primer lugar comprobar si la adhesión ocurría, o no, en las plantas *athb13-1*.

Para eso se tomaron pistilos sin polinizar provenientes de plantas WT y *athb13-1*, se los saturó con polen del mismo genotipo y luego se lavaron los pistilos en solución amortiguadora de fosfato con 0,001 % de Tween 20 para eliminar aquellos granos de polen que no se hubieran adherido correctamente. Para poder visualizar los granos de polen que permanecían adheridos luego del lavado se realizó una tinción con azul de anilina y se observaron los estigmas en un microscopio de epifluorescencia. Como se ve en la **Imagen 22**, el número de granos de polen adheridos en cada caso es similar, indicando que la diferencia entre los genotipos no se da en el momento de la adhesión.

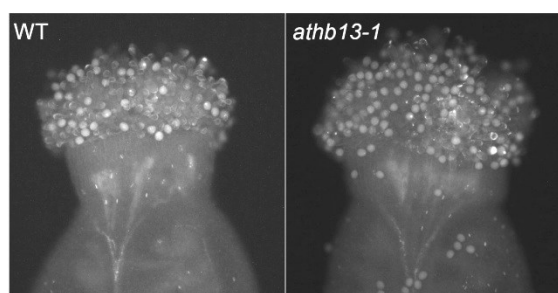
Imagen 22: Los granos de polen *athb13-1* no muestran alteraciones morfológicas, ni diferencias en la capacidad de adhesión.

A.



A. Imágenes de autofluorescencia de granos de polen WT y *athb13-1*. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal laser. Longitud de onda de excitación: 543 nm; Longitud de onda de emisión colectada: 590-650 nm. Barra = 10 µm.

B.

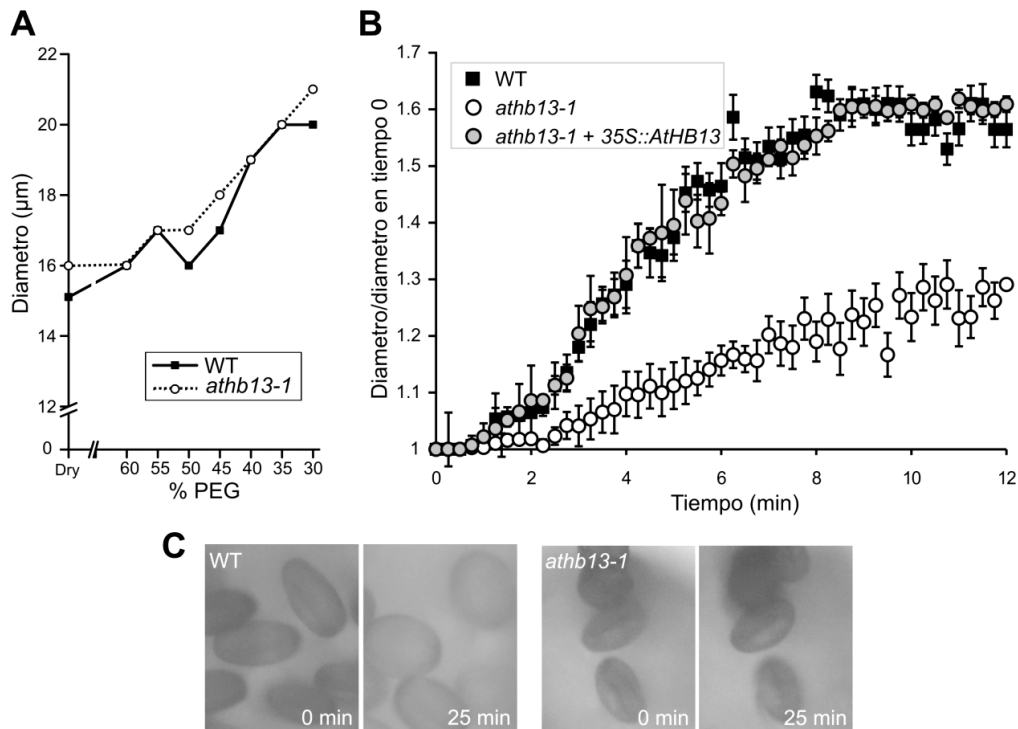


B. En ambos genotipos se observa un número similar de granos de polen adheridos al estigma, indicando que la adhesión no es el evento que se encuentra alterado en las plantas *athb13-1*

Tomando en cuenta que un grupo de genes involucrados en la hidratación de polen se encuentra regulado diferencialmente en plantas de *Arabidopsis thaliana* que expresan ectópicamente el gen *HaHBI*, un ortólogo de *AtHB13* de girasol, decidimos analizar la capacidad de hidratación de los granos de polen en las plantas *athb13-1*. Para eso se midió el diámetro que alcanzaban los granos en medios conteniendo

concentraciones crecientes de PEG 3350. La **Imagen 23.A** muestra cómo en este experimento el polen de plantas *athb13-1* no mostró ninguna diferencia en la hidratación respecto del polen obtenido de plantas salvajes.

Imagen 23: La hidratación de los granos de polen *athb13-1* sobre el estigma es deficiente.



A. Diámetro promedio de los granos de polen de plantas *athb13-1* y WT 5 min luego de colocarlos en las diluciones especificadas de PEG3350. (n = 15 granos de polen por punto). **B.** Cinética de la hidratación de polen en el estigma de plantas *athb13-1*, WT y *athb13-1* transformadas con 35S::AtHB13. Cada punto representa el diámetro promedio de 10 granos de polen. Barras: desviación estándar. **C.** Imágenes mostrando la hidratación de los granos de polen sobre el estigma.

Para confirmar lo observado en el ensayo de hidratación de polen realizado *in vitro*, decidimos realizar curvas de hidratación de polen sobre el estigma. Este tipo de experimento se lleva a cabo tomando estigmas no polinizados (estadio 12 de la flor; Smyth y col., 1990), colocando granos de polen de forma manual y observando la hidratación de los mismos a lo largo de los siguientes 15-20 minutos. Para poder obtener una curva de hidratación apropiada, los granos de polen se fotografiaron cada 15 segundos y se midió el diámetro utilizando el software ImageJ. Los resultados obtenidos resultaron llamativos, ya que tal como se ilustra en las **Imagen 23.B** y **C**, los granos de polen de plantas *athb13-1* iniciaron la hidratación junto con los granos de polen salvajes, pero no la completaron de la misma manera y su diámetro final resultó

mucho menor. La curva de hidratación se repitió utilizando estigmas salvajes y mutantes, y en ambos casos el resultado fue similar.

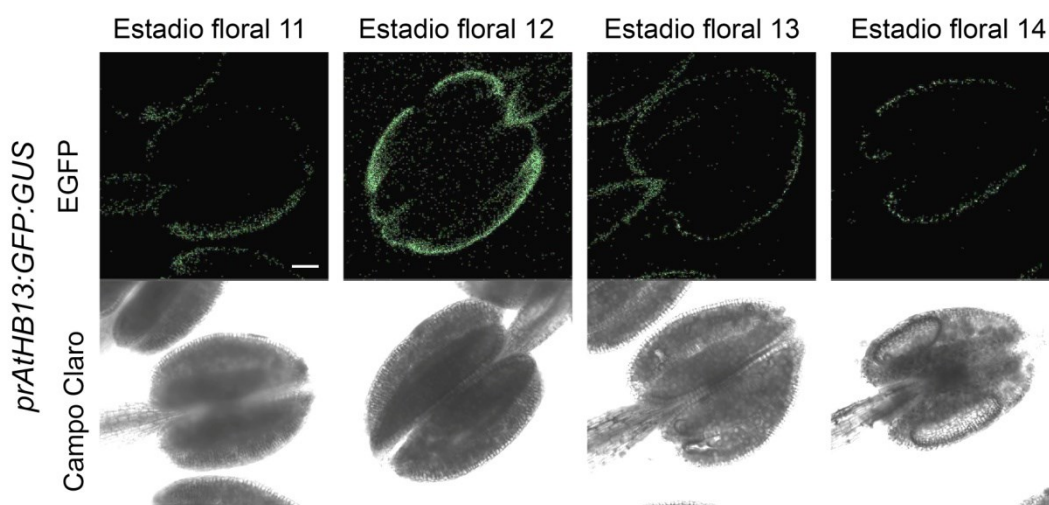
Estos resultados sugirieron que los granos de polen mutantes son capaces de absorber agua, pero tienen una deficiencia en la interacción con el estigma. Notoriamente, al contrario de otras plantas mutantes con defectos en la hidratación del polen (Mayfield y Preuss, 2000; Updegraff y col., 2009), las plantas *athb13-1* no muestran un retraso en la hidratación, sino una diferencia en la cantidad de agua absorbida (medida como la variación en el diámetro del grano de polen respecto al tiempo 0).

***AtHB13* se expresa en el tapetum de las anteras durante ciertos estadios florales**

Teniendo en cuenta que el fenotipo que se observaba era específico de la parte masculina de la flor, nos resultó llamativo que en los trabajos previos que describían el patrón de expresión de *AtHB13* no se mencionara que este gen se expresara en anteras o granos de polen. Por ello decidimos observar detalladamente estos tejidos utilizando las plantas *PromAtHB13:GFP:GUS* que se describieron anteriormente. Mediante histoquímica sólo pudimos detectar actividad de GUS en el filamento de los estambres, principalmente en la zona cercana a las anteras, y se vio una tinción muy leve en algunas anteras. Los granos de polen maduros, por su parte, no mostraron actividad del gen reportero en este ensayo.

Analizamos también anteras de flores en distintos estadios utilizando un microscopio confocal. Así pudimos visualizar que en las plantas *PromAtHB13:GFP:GUS* era posible detectar el gen reportero *GFP* en el tapetum de anteras en el estadio 12. Esta expresión sería transitoria, ya que en el estadio 11 no se observa y se pierde en el estadio 13 y posteriores (**Imagen 24**).

Imagen 24: *AtHB13* se expresa en el tapetum de la antera en ciertos estadios florales



Expresión de GFP en anteras de plantas *prAtHB13:GFP:GUS* en distintos estadios del desarrollo floral. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal laser espectral. Barras = 40 μ m.

AtHB13* es capaz de revertir el fenotipo de los granos de polen en plantas mutantes *athb13-1

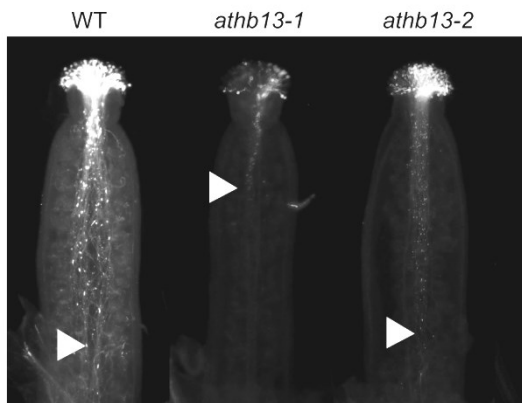
Notoriamente, los frutos de plantas *athb13-2* eran indistinguibles de los frutos de plantas salvajes si se tenía en cuenta su tamaño, cantidad de óvulos fertilizados y semillas (**Imagen 11.C**).

Este hecho podía indicar que el déficit en la hidratación del grano de polen en las plantas *athb13-1* era consecuencia de una segunda inserción de T-DNA en dicha línea, y por lo tanto, un fenotipo independiente de la acción de *AtHB13*.

Para explorar esta posibilidad, se midió la hidratación de los granos de polen sobre el estigma de plantas *athb13-1* complementadas con la construcción *35S:AtHB13*. Los resultados se muestran en la **Imagen 23.B**, en la que se puede observar que en este genotipo los granos de polen se hidratan de la misma manera que lo hacen los granos de plantas salvajes, indicando que la ausencia de *AtHB13* es efectivamente responsable del déficit en la hidratación del polen. Para este ensayo se utilizaron 5 líneas complementadas independientes y en 4 de ellas se produjo el resultado mostrado.

Teniendo en cuenta estos resultados, era desconcertante que las plantas *athb13-2* no mostraran ningún fenotipo diferencial en el desarrollo de las silicuas. Incluso cuando se evaluó la germinación de los granos de polen dentro del estigma; éstos germinaban correctamente y los tubos polínicos alcanzaban el fondo del ovario (**Imagen 25**).

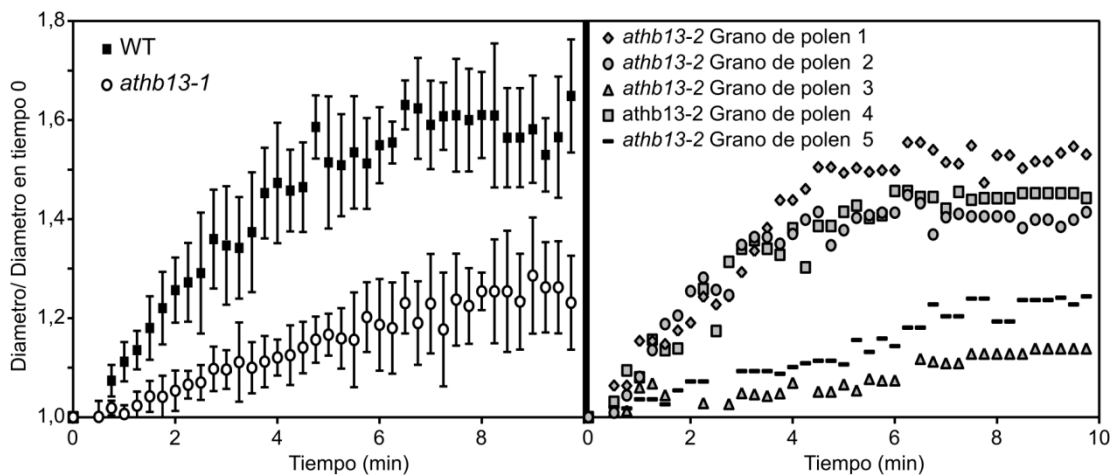
Imagen 25: Las plantas *athb13-2* no muestran déficit en la germinación de polen.



Crecimiento de tubos polínicos en pistilos de plantas de los distintos genotipos. Los granos de polen se tiñeron con azul de anilina y luego se visualizaron bajo un microscopio de epifluorescencia. Las fotografías se tomaron 24 h luego de la polinización. Las flechas indican la longitud máxima alcanzada por el tubo polínico en cada caso. Barra: 500 μm .

El análisis de la hidratación de los granos de polen sobre el estigma mostró que sí existía una diferencia entre el polen mutante *athb13-2* y el salvaje, ya que sólo un 50 % de los granos evaluados se comportaba de forma similar al polen salvaje y el porcentaje restante mostraba un fenotipo similar al observado en plantas *athb13-1* (Imagen 26).

Imagen 26: La hidratación de polen en plantas *athb13-2* es defectuosa.



Izquierda: cinética de la hidratación de polen en el estigma en plantas *athb13-1* y WT. Cada punto representa el diámetro promedio de 10 granos de polen. Barras: desviación estándar. *Derecha:* cinética de la hidratación de polen en el estigma para 5 granos de polen *athb13-2* individuales en un único experimento de polinización. Cada punto representa el diámetro de un grano de polen. Los resultados mostrados son representativos de lo obtenido en al menos 20 polinizaciones diferentes.

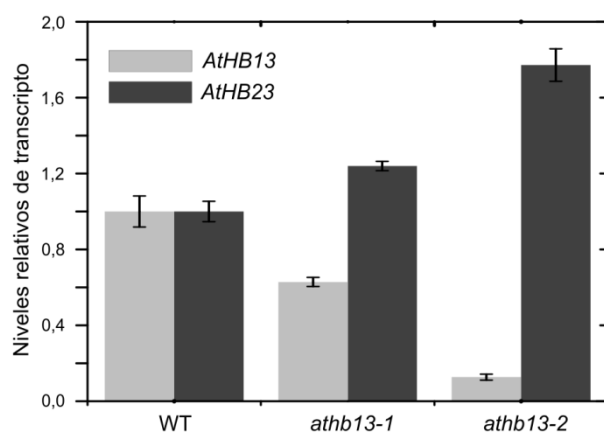
***AtHB23* es capaz de reemplazar a *AtHB13* en su función en la hidratación de polen**

Luego de esta serie de observaciones desconcertantes, y sabiendo que el par de factores de transcripción HD-Zip I AtHB7 y AtHB12 se regulan uno al otro para mantener un fino control del crecimiento de la planta (Ré y col., 2014), decidimos investigar el rol de *AtHB23*, el gen parálogo a *AtHB13*, un buen candidato para reemplazar a AtHB13 cuando este último no se expresa.

La hipótesis que planteamos fue que en las mutantes *athb13-1* los niveles de transcritos de *AtHB13* podrían ser percibidos por la planta como suficientes (aunque no lo fueran), mientras que en las mutantes *athb13-2*, los mensajeros de *AtHB13* eran detectados como insuficientes y *AtHB23* se inducía significativamente para reemplazar a *AtHB13*. Esta hipótesis está basada en que el fenotipo diferencial lo presentan justamente las mutantes *athb13-1* con mayores niveles de expresión que las mutantes *athb13-2*, teniendo las primeras transcritos truncos ya que la inserción está en la región 3'UTR.

El primer paso para corroborar esta hipótesis fue medir los niveles de transcritos de *AtHB23* presentes en las inflorescencias de plantas *athb13-1* y *athb13-2* y compararlos con los obtenidos en plantas salvajes. Esto se realizó mediante RT-qPCR y los resultados se muestran en la **Imagen 27**, en la que se puede ver que la expresión de *AtHB23* se encuentra levemente inducida en las plantas *athb13-1* y que esta expresión es mayor en las mutantes *athb13-2*, mostrando una relación inversa con los niveles de transcritos de *AtHB13*.

Imagen 27: *AtHB23* se encuentra regulado positivamente en las plantas mutantes *athb13*

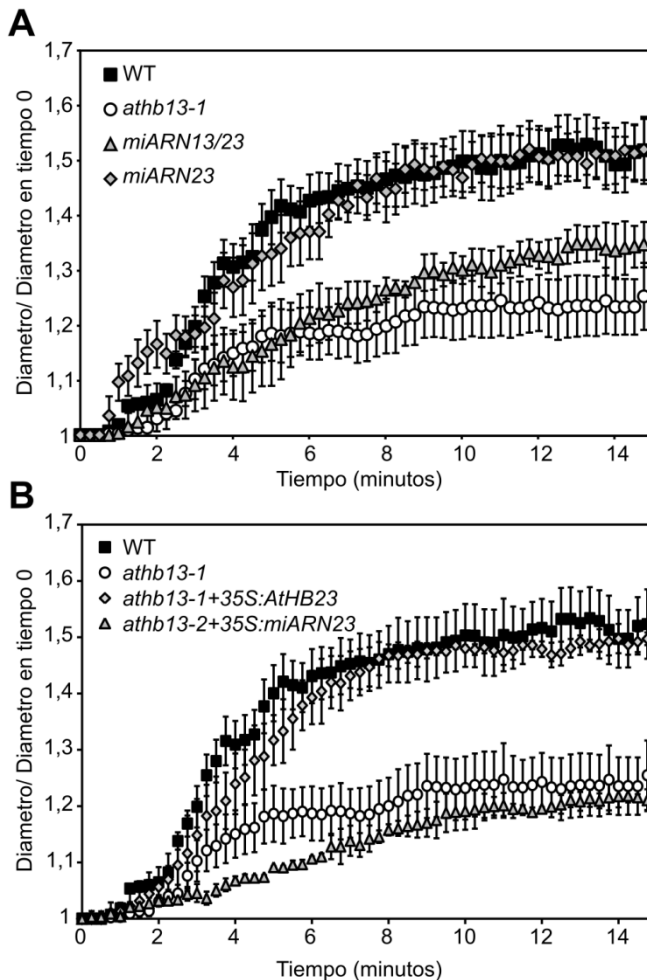


Niveles de transcritos de *AtHB13* y *AtHB23* en inflorescencias de plantas WT, *athb13-1* y *athb13-2*. Los niveles de transcritos se relativizaron a los de plantas WT, aplicando el método $\Delta\Delta Ct$. Las barras de error representan el error estándar calculado a partir de tres réplicas biológicas. Los niveles de transcritos de actinas (*ACTINA2* y *ACTINA8*) se utilizaron como referencia.

El resultado mostrado previamente avalaba la hipótesis planteada, pero para obtener más pruebas que la soporten analizamos qué sucedía con la hidratación de los granos de polen en las plantas *miARN23* y *miARN13/23* obtenidas previamente. Los

resultados se muestran en la **Imagen 28.A.** e indican que sólo la disminución de transcritos de *AtHB23* no es suficiente para generar defectos en la hidratación del polen (*miARN23*). Sin embargo, cuando tanto *AtHB23* como *AtHB13* faltan (*miARN13/23*) la hidratación de los granos de polen se ve afectada, tal como sucede en las plantas *athb13-1*.

Imagen 28: *AtHB23* puede cumplir la función de *AtHB13* en la hidratación de polen.



A. Cinética de la hidratación de polen en el estigma de plantas *miARN23* y *miARN13/23* polinizadas artificialmente. Se utilizaron flores en estadio 12 (Smyth y col., 1990). Se tomaron imágenes cada 15 s. Cada punto representa el diámetro promedio de 10 granos de polen. Las barras representan la desviación estándar para cada punto. **B.** Cinética de la hidratación de polen en el estigma para flores *WT*, *athb13-1*, *athb13-1* transformadas con *35S:AtHB23* y *athb13-2* transformadas con *35S:miARN23*. Los estigmas fueron polinizados artificialmente. Se utilizaron flores en estadio 12 (Smyth y col., 1990). Se tomaron imágenes cada 15 s. El eje Y representa el diámetro relativo del grano de polen respecto al diámetro a tiempo 0 (n = 10 granos de polen por genotipo). Las barras representan la desviación estándar en cada punto.

Estos resultados por si solos no terminaban de demostrar que *AtHB23* podía suplir la función de *AtHB13* en la hidratación del polen. Por eso se transformaron, por un lado, plantas *athb13-1* con la construcción *35S:AtHB23* y, por otro lado, plantas *athb13-2* con la construcción *miARN23*. El objetivo en el primer caso fue saber si al aumentar los niveles de *AtHB23* en las mutantes defectuosas en la hidratación este fenotipo podía ser rescatado, lo que indicaría que *AtHB23* efectivamente puede cumplir el rol de *AtHB13*. En el segundo caso intentábamos saber si la inducción de *AtHB23* era la responsable de la ausencia del fenotipo en el polen; al silenciar *AtHB23* en estas

plantas se debería observar la deficiencia en la germinación del polen característica de las plantas *athb13-1*.

Los resultados logrados terminaron de confirmar la hipótesis planteada (**Imagen 28.B**). En las plantas mutantes complementadas con la construcción *35S:AtHB23* se pudo ver una hidratación normal de los granos de polen, mientras que en las plantas *athb13-2* transformadas con la construcción expresando el *miARN23* los granos de polen se hidrataron de forma similar a la primer mutante *athb13* en todos los casos.

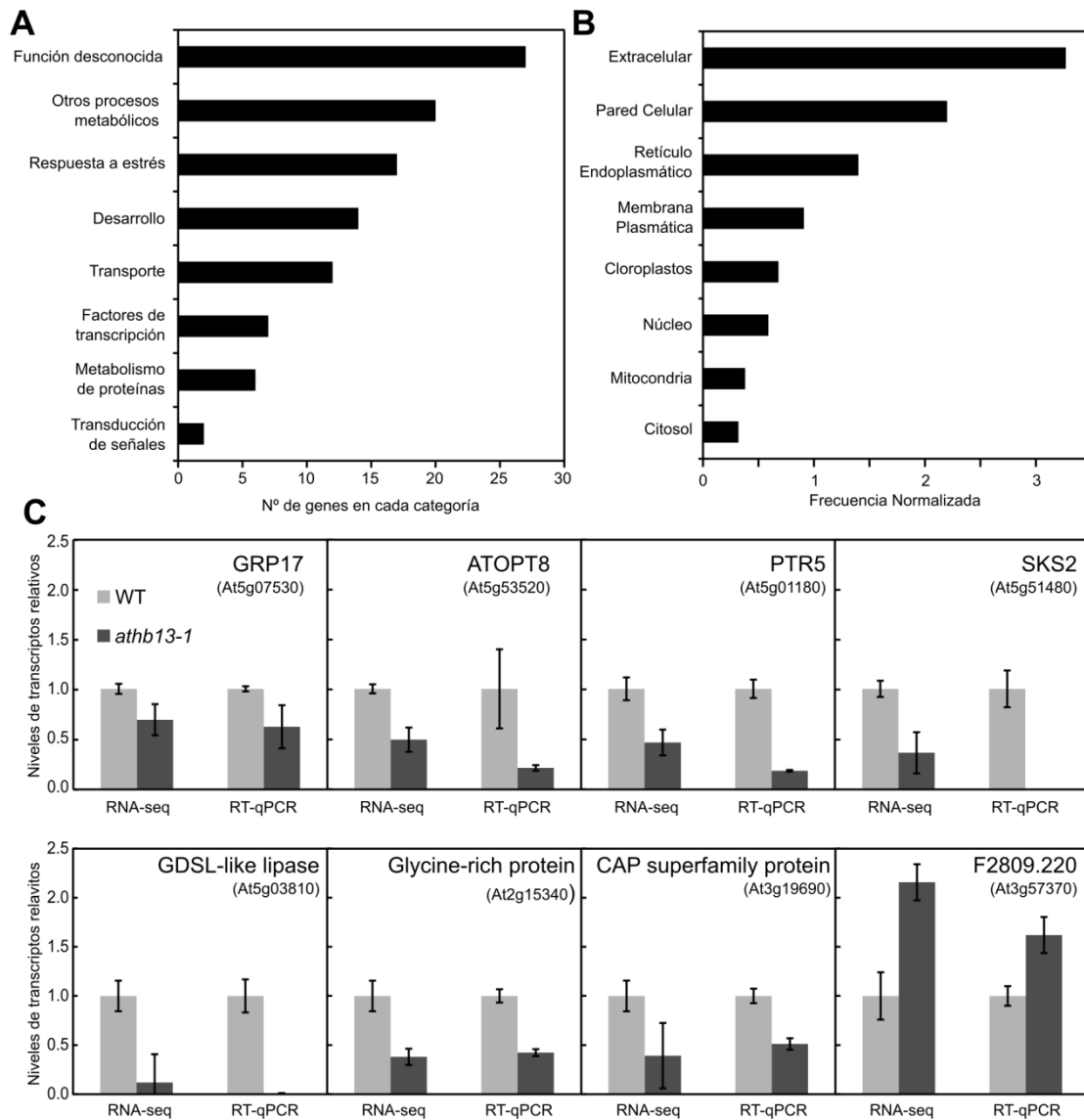
El análisis del transcriptoma de las mutantes *athb13-1* indica que *AtHB13* regula genes involucrados en la diferenciación celular y el transporte

Con el fin de revelar el mecanismo molecular subyacente en la hidratación anormal del polen observada en las mutantes *athb13-1*, se llevó a cabo un análisis del transcriptoma de estas plantas mediante RNA-Seq (Secuenciación masiva de ARN, del inglés: *RNA-Sequencing*). Para ello se extrajo ARN total de inflorescencias de plantas salvajes y mutantes *athb13-1*. Como tejido de partida se utilizó la inflorescencia completa, debido a que la expresión de *AtHB13* había sido detectada en varios tejidos de la misma (anteras y estigma) en forma transitoria.

Se detectó un grupo de 800 genes expresados diferencialmente en las plantas mutantes; entre ellos, 323 mostraban una inducción o represión de al menos dos veces (**Anexo 1**). Desafortunadamente, la función de la mayoría de estos genes es desconocida (**Imagen 29.A**). Los resultados del RNA-Seq fueron validados por RT-PCR en tiempo real, utilizando algunos de los genes expresados diferencialmente (**Imagen 29.C**).

Un número considerable de genes que codifican para proteínas presentes en la cubierta del polen (Mayfield y col., 2001) de la familia GRP se encontraron levemente reprimidos en las plantas mutantes, además de *EXL3*, otro gen que codifica una proteína presente en la cubierta del polen e involucrada en la hidratación del grano. Aun cuando la represión fue de aproximadamente un 30 % respecto de los niveles encontrados en plantas salvajes, el hecho de que todos los genes de esta familia se encuentren reprimidos podría ser significativo para explicar la diferencia observada en la hidratación de los granos de polen (**Imagen 30**).

Imagen 29: Resultados del ensayo de RNA-Seq



A. Función de los genes expresados diferencialmente entre inflorescencias *athb13-1* y WT. **B.** Localización sub-celular de las proteínas codificadas por los genes expresados diferencialmente en inflorescencias *athb13-1*. En **A** y **B** la clasificación se realizó de acuerdo a los términos GO usando el “BAR Classification Superviewer” (http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_classification_superviewer.cgi). **C.** Niveles de transcritos de varios genes de *Arabidopsis* cuantificados por RNA-Seq y validados por RT-PCR en tiempo real utilizando ARN total aislado a partir de inflorescencias salvajes y mutantes *athb13-1*. Todos los valores fueron normalizados con respecto al obtenido en las plantas salvajes utilizando el método del $\Delta\Delta Ct$. Los niveles de transcritos de Actinas (*ACTINA2* y *ACTINA8*) fueron usados como referencia. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas biológicas para cada genotipo.

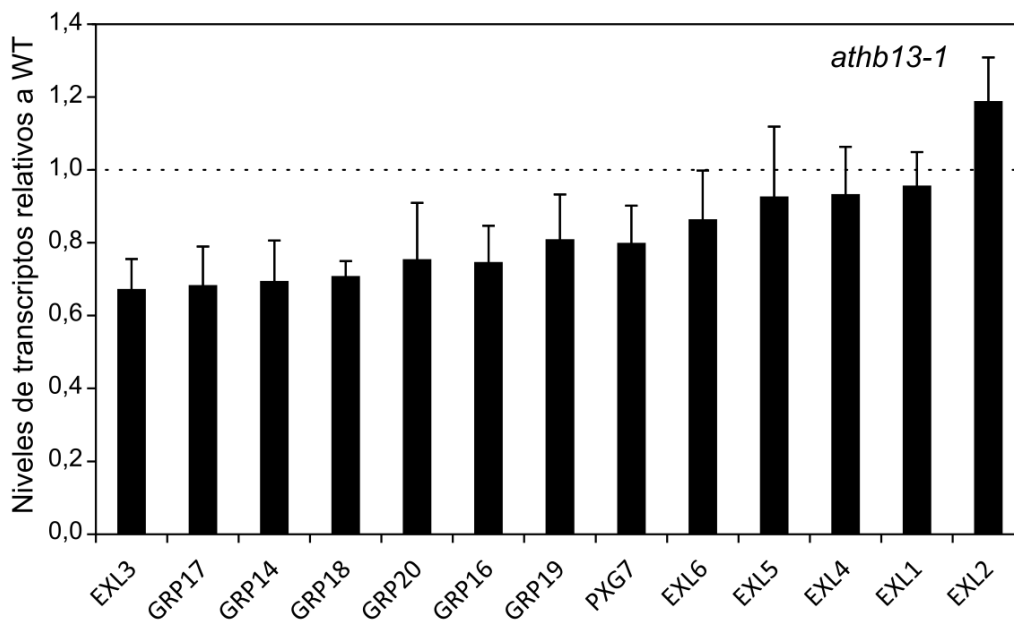
Otro genes regulados diferencialmente fueron identificados como involucrados en la organización y desarrollo celular; varios de ellos relacionados con la germinación del polen, la modificación de la pared celular del tubo polínico y el crecimiento direccional.

La regulación de estos genes podría explicar el fenotipo observado, pero probablemente no se trate de genes blancos directos de *AtHB13*, si no que se encuentren diferencialmente regulados debido a la ausencia de alguna/s señal/es corriente arriba en la cascada de regulación. Otro de los grupos de genes regulados codifica proteínas relacionadas con el transporte, y se conoce que la germinación del polen sobre el estigma está mediada por el transporte de numerosas proteínas y lípidos (Bock y col., 2006; Komarova y col., 2008). El **Anexo 2** muestra los genes regulados diferencialmente que previamente han sido asociados a la germinación del polen.

Una observación llamativa acerca de la localización subcelular de las proteínas codificadas por los genes expresados diferencialmente es que la mayoría de los péptidos con función conocida se localizan en el espacio extracelular, algo consistente con diferencias en la comunicación polen-estigma (**Imagen 29.B**)

Curiosamente, sólo 36 de los 323 genes expresados diferencialmente se encontraron reprimidos, indicando que *AtHB13* es probablemente un FT activador de la expresión en inflorescencias. Por otro lado, 28 de los genes expresados diferencialmente tienen en su región promotora la secuencia pseudopalindrómica CAATNATTG, reconocida por los FTs de la familia HD-Zip I.

Imagen 30: Los transcritos que codifican varias proteínas presentes en la cubierta del polen se encuentran reprimidos en plantas *athb13-1*.



Niveles de transcritos relativos de diversos genes codificantes para proteínas presentes en la cubierta del polen en inflorescencias de plantas *athb13-1*. Los niveles de transcritos se relativizaron a los de inflorescencias de plantas WT utilizando los valores de RPKM promedio de tres réplicas biológicas independientes para cada genotipo. Las barras de error representan la desviación estándar calculada a partir de tres réplicas biológicas.

Dos triptófanos dentro del motivo AHA de AtHB13 son esenciales para su función

Los factores de transcripción HD-Zip I tienen un motivo de transactivación de tipo AHA en su extremo carboxilo terminal (Arce y col., 2011). Capella y colaboradores mostraron que el motivo AHA presente en AtHB13 y, en particular, los triptófanos de este dominio son esenciales para la activación transcripcional en levaduras (Capella y col., 2014). A pesar de eso, aún no se había demostrado ninguna función de estos motivos en *Arabidopsis thaliana*.

Considerando los fenotipos presentados por las plantas *athb13-1*, tanto en la elongación de la vara floral como en la hidratación del polen, decidimos aprovecharlos para conocer si el motivo AHA de AtHB13 era realmente funcional en plantas. Para eso se generaron distintas construcciones en las que el promotor constitutivo 35S CaMV dirigía la expresión de la región codificante de *AtHB13* con mutaciones o eliminaciones en el motivo AHA. Las construcciones creadas se grafican en la **Imagen 31.A** y fueron similares a las utilizadas por Capella y col., 2014. En un caso se eliminó totalmente la región C-terminal de la proteína (*At13ΔC*), en otro sólo se quitó el motivo AHA (*At13ΔAHA*) y en la tercera se mutaron los triptófanos de ese motivo (W→A, *At13WxA*). Como control de este último caso se generó también una versión de AtHB13 en la que una asparagina cercana a los triptófanos fue mutada (D→A, *At13D269A*).

Se transformaron plantas *athb13-1* con las construcciones descritas arriba y los resultados obtenidos se muestran en la **Imagen 31**, en la que se puede ver que sólo las plantas transformadas con la construcción *At13D289A* recuperaron el fenotipo de las plantas salvajes, tanto en el caso de la elongación de la vara floral, como en el desarrollo de las silicuas y la germinación de los granos de polen. Estos resultados confirman que los triptófanos presentes en el motivo AHA de AtHB13 no sólo son necesarios para la capacidad de activación de este FT en levaduras, sino que también son esenciales para la función de la proteína en planta.

Imagen 31: El motivo AHA de AtHB13 es esencial para su funcionalidad en planta.



A. Representación esquemática de la proteína AtHB13 y las distintas variantes que se usaron para complementar las plantas *athb13-1* (Capella y col., 2014).

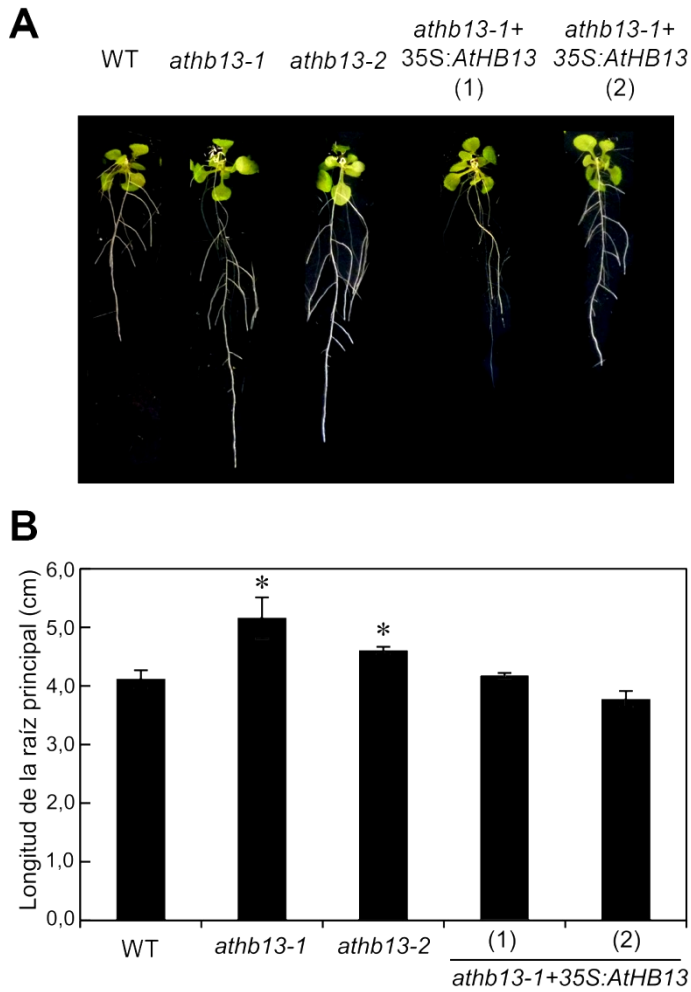
B. Fotografías representativas de plantas la vara principal de plantas *athb13-1* de 35 días transformadas con las construcciones indicadas. **C.** Fotografías representativas de las silicuas de los genotipos indicados.

AtHB13 también cumple un rol en el desarrollo y crecimiento de la raíz principal de *Arabidopsis thaliana*

Como parte de un trabajo en colaboración con el “Wageningen Seed Lab”, de la Universidad de Wageningen en los Países Bajos, las plantas mutantes y complementadas de *AtHB13* fueron evaluadas también en cuanto al desarrollo de sus raíces. Los primeros resultados obtenidos mostraron que las plantas mutantes *athb13-1* y *athb13-2* presentan raíces más largas que el correspondiente control, fenotipo que se

reverte en las plantas *athb13-1* complementadas con la construcción *35S:AtHB13* (Imagen 32). Estos resultados sugieren un papel negativo de *AtHB13* en el crecimiento de la raíz principal, característica que será explorada en mayor profundidad en futuros trabajos.

Imagen 32: Las plantas *athb13* presentan raíces más largas que las plantas salvajes.



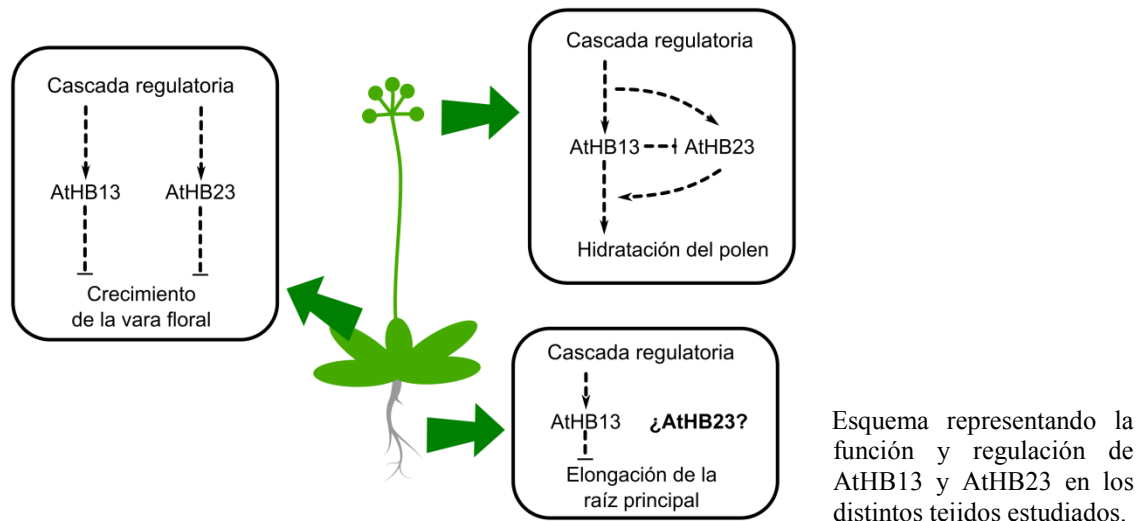
A. Crecimiento de la raíz principal en plantas WT, *athb13-1*, *athb13-2* y dos líneas complementadas *athb13-1+35S:AtHB13* de 15 días. **B.** Longitud de la raíz primaria de plantas de 15 días en los distintos genotipos señalados. Las barras de error muestran la desviación estándar de tres réplicas biológicas independientes para cada genotipo. Asteriscos: $p < 0,01$.

Discusión

Los factores de transcripción (FTs) de la familia HD-Zip I han sido relacionados con eventos del desarrollo asociados a respuestas a las condiciones medioambientales estresantes y sólo en un muy limitado número de casos con procesos del desarrollo normal de las plantas. En *Arabidopsis*, los FTs HD-Zip I LMI1 (Saddic y col., 2006) y AtHB12 (Son y col., 2010) fueron descritos participando en los procesos de floración y desarrollo de la vara floral, respectivamente. Los ejemplos en otras especies son *VRS1* de cebada y *TL* de arveja; las plantas mutantes en el primero muestran un fenotipo particular en sus espigas (Komatsuda y col., 2007); mientras que mutaciones en *TL* de arveja hace que en lugar de zarcillos crezcan hojas (Hofer y col., 2009).. En todos los casos, el papel en el desarrollo de las plantas de estos genes se encontró gracias al estudio de plantas mutantes que presentaban fenotipos anormales. De hecho, en los dos últimos casos las mutaciones que poseían las mutantes usadas se encontraban en la región carboxilo terminal de estos FTs.

En cuanto a la función de los FTs HD-Zip I en el desarrollo normal de las plantas, evaluando las mutantes *athb13-1* en condiciones normales pudimos determinar que en el estadio reproductivo ocurrían serias anomalías; más precisamente, la vara floral crecía más rápido y las silicuas eran claramente más cortas y con menos semillas. En el primer caso, una segunda mutante mostró el mismo fenotipo, pero esto no ocurrió así con respecto al fenotipo de silicuas. Los estudios siguientes permitieron probar que ambos fenómenos observados estaban causados por la ausencia de AtHB13, pero que en cada tejido la relación entre AtHB13 y AtHB23 era diferente. En la **Imagen 33** se esquematizan las distintas relaciones existentes entre los parálogos. En un caso ambas proteínas son necesarias para una misma función (la elongación apropiada de la vara floral), mientras que en un tejido diferente, una sola (AtHB13) es necesaria para la actividad (hidratación de polen). Sin embargo, en ausencia de este FT su parólogo es capaz de reemplazarlo.

Imagen 33: *AtHB13* y *AtHB23* tienen una regulación y función diferencial en distintos tejidos



Un problema frecuente en el estudio de los FTs en plantas es el solapamiento de funciones de genes parálogos, atribuible a que poseen capacidades moleculares similares (unión a ADN, interacción con otras proteínas) y/o patrones de expresión parecidos. Esto hace que sea necesario en muchos casos obtener plantas dobles o triples mutantes para poder obtener un fenotipo visible que permita elucidar la función de esos FTs. Respecto de esto, es abundante la bibliografía que describe factores de transcripción de plantas con función redundante (Xu y col., 2006; Zhang y Wang, 2005; Zhu y col., 2015), pero sólo en pocos casos se describieron pares de factores de transcripción con algunas funciones redundantes y otras específicas tal como sucede, por ejemplo, con WRKY11 y WRKY17 en la defensa contra patógenos (Journot-Catalino y col., 2006) al igual que en el caso descrito en este capítulo. En lo que concierne a la familia de FTs HD-Zip I, en el par genes parálogos *AtHB7* y *AtHB12* se describió recientemente que muestran un mecanismo de regulación muy interesante en el cual cada miembro del par es capaz de afectar la expresión del otro de forma distinta en cada estadio de la planta (Ré y col., 2014). Fue esta observación particular la que nos llevó a proponer que *AtHB23* podía estar reemplazando a *AtHB13* en la función de hidratación del polen.

Una pregunta importante que surge de estas observaciones es cómo la planta reconoce la ausencia de *AtHB13* y aumenta la expresión de *AtHB23* en las inflorescencias. Hasta el momento no fuimos capaces de responder esta pregunta, ya que *AtHB23* no posee en su secuencia promotora la caja pseudopalindrómica

CAATNATTG unida por los FTs HD-Zip I (Palena y col., 1999; Johannesson y col., 2001).

Nuestras hipótesis son que una o más proteínas intermediarias actúan para generar la señal y aumentar la expresión de *AtHB23*. Esta idea es consistente con las observaciones hechas en las cuales los niveles de transcritos, y no de la proteína, de *AtHB13* y *AtHB23* muestran una relación inversamente proporcional.

Por el otro lado, también es interesante conocer por qué tanto *AtHB13* como *AtHB23* están involucrados en la elongación de la vara floral. Dos hipótesis surgen para explicar este fenómeno; la primera postula que ambos FTs tienen genes blancos diferentes y específicos, lo que hace a ambos necesarios; la segunda hipótesis plantea que *AtHB13* y *AtHB23* pueden formar heterodímeros y sólo de esta forma serían capaces de activar uno o más genes blancos, lo que hace que la ausencia de cualquiera de ellos sea suficiente para provocar el desarrollo anormal de la vara floral. La heterodimerización entre FTs HD-Zip I fue propuesta anteriormente por Harris y col., 2011 aunque no comprobada experimentalmente, al menos para el par 13/23.

En cuanto al papel de *AtHB13* en la hidratación del polen, anteriormente se había descrito que tanto *AtHB13* como *AtHB23* se expresaban en el estigma (Hanson y col., 2002; Kim y col., 2007). Por eso nos resultó llamativo que el fenotipo observado en las mutantes *athb13-1* fuera específico de la parte masculina de la flor, y no estuviera involucrado el estigma. El estudio posterior de la expresión de GFP en las plantas *pAtHB13:GFP:GUS* permitió ver que *AtHB13* también se expresaba en anteras, lo que explicaba mejor los cambios fenotípicos en estos órganos.

La cubierta del polen está formada por numerosos tipos de lípidos y un número más reducido de proteínas (Murphy, 2006). Estas proteínas son sintetizadas en el tapetum de la antera y luego secretadas para formar parte de un material viscoso en el cual se embeben los granos de polen antes de salir de la antera (Edlund y col., 2004). Por eso la expresión de *AtHB13* en el tapetum de las anteras, y más precisamente en el estadio 12 de las flores podría indicar que este FT es necesario para activar la expresión de algunas proteínas presentes en la cubierta del polen y necesarias para la hidratación del mismo. Tal como se explicó en la sección de resultados, el análisis del transcriptoma de las mutantes *athb13-1*, hecho mediante RNA-Seq, reveló que un gran porcentaje de los genes expresados diferencialmente codifica proteínas de ubicación extracelular. Una de estas proteínas es *GRP17*, descrita como involucrada en la hidratación de los granos de polen (Mayfield y Preuss, 2000; Mayfield y col., 2001). Además, de las 15 proteínas

conocidas que se expresan en la cubierta del polen en *Arabidopsis*, los genes que codifican 7 de ellas se encuentran reprimidos en las plantas *athb13-1* en el mismo porcentaje en el que se ven reprimidos los niveles de *AtHB13*, y aunque la represión de estos genes sea leve, el hecho de que sean muchos podría explicar el fenotipo observado. Cuando se evaluó la hidratación del polen en plantas *athb13-2*, en las que algunos granos de polen *athb13-2* se hidrataban igual que granos WT y otros lo hacían como granos *athb13-1*. Estas últimas observaciones contribuirían a la comprensión del proceso. Es posible que la complementación natural ejercida por *AtHB23* no sea completa y al generarse la sustancia heterogénea que conforma la cubierta de polen, algunos granos adquieran una cubierta funcional y otros no.

Respecto de la importancia que podrían tener los motivos conservados presentes en la región carboxilo terminal de esta familia de FTs para la función de los mismos, si bien en trabajos previos se probó que la región carboxilo terminal es esencial para la transactivación, los experimentos correspondientes se realizaron utilizando sistemas heterólogos, o las secuencias activadoras corriente arriba del promotor de *GALI* de levaduras (Arce y col., 2011; Capella y col., 2014) y sólo en los dos casos mencionados en el párrafo anterior la funcionalidad del motivo AHA fue indirectamente demostrada *in planta* (Komatsuda y col., 2007; Hofer y col., 2009), pero en ninguno de estos trabajos se demostró *in planta* la importancia de los triptófanos presentes en el motivo AHA. En este trabajo pudimos demostrar que no sólo la región carboxilo terminal de *AtHB13* es necesaria para su función, si no que puntualmente los triptófanos 285 y 287 del motivo AHA son esenciales. Tanto *AtHB13* como *AtHB23* son buenos candidatos para estudios posteriores de los motivos conservados presentes en la región carboxilo terminal ya que poseen además del AHA, otros motivos conservados de función desconocida (Arce y col., 2011).

Si bien los resultados descritos en este capítulo abren nuevas preguntas a responder, queda claro que *AtHB13* y *AtHB23* se pueden complementar para cumplir una función en la hidratación del polen y son necesarios al unísono para un correcto desarrollo de la vara floral.



Capítulo 2:

AtHB13 regula la expresión de *JUB1*, un factor de transcripción de la familia NAC

Introducción

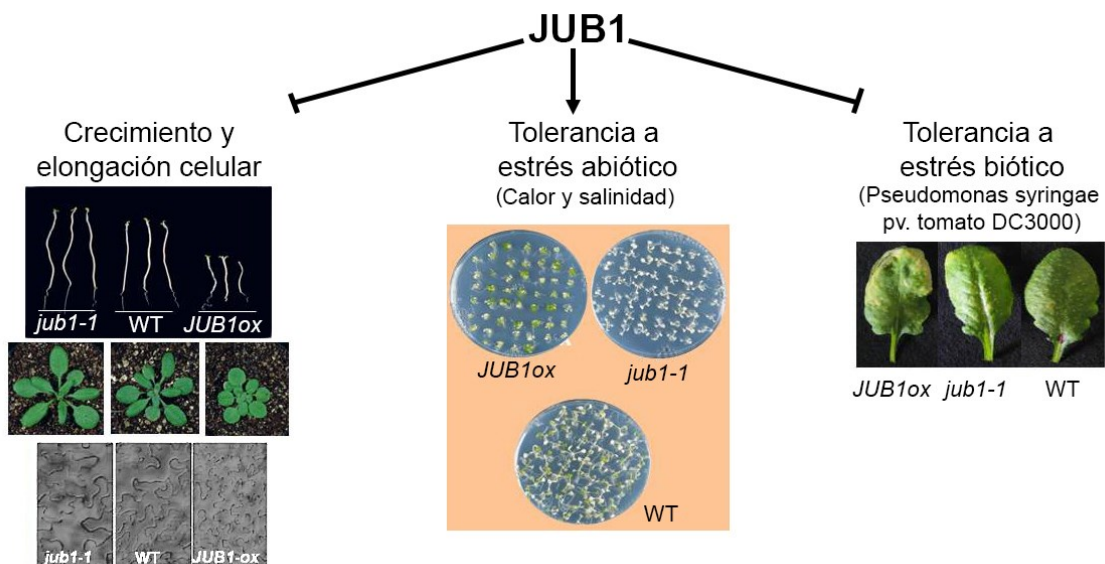
Los factores de transcripción (FTs) NAC constituyen una de las mayores familias de FTs exclusivos de plantas y se encuentran ampliamente distribuidos en angiospermas. En *Arabidopsis thaliana* conforman una familia de 117 miembros. Estos FTs se caracterizan por tener todos el mismo dominio de unión a ADN y el nombre NAC lleva las iniciales de los tres primeros miembros identificados: NAM (del inglés, *No Apical Meristem*, de Petunia), ATAF1-2 (del inglés, *Arabidopsis Thaliana Activating Factor*) y CUC2 (del inglés, *Cup-shaped Cotyledon*, Souer y col., 1996; Aida y col., 1997). Si bien sólo unos pocos miembros de esta extensa familia han sido estudiados en profundidad hasta la fecha, estos FTs han sido asociados a diversos procesos del desarrollo, la defensa y la respuesta a estrés abiótico (Souer y col., 1996; Aida y col., 1997; Sablowski y Meyerowitz, 1998; Xie y col., 2000; Takada y col., 2001; Nakashima y col., 2012)

JUNGBRUNNEN1 (JUB1, ANAC042), de *Arabidopsis thaliana* es un miembro de la familia NAC descrito recientemente como relacionado a la respuesta a estrés abiótico. La expresión de este FT se induce cuando las plantas son sometidas a condiciones de estrés salino, calor y otros tratamientos que aumentan los niveles de H₂O₂ endógenos. Además, las plantas sobreexpresantes de *JUB1* (*JUB1ox*) mostraron una mayor tolerancia a los estreses mencionados y el comportamiento opuesto se observó en plantas mutantes (*jub1-1*) (Wu y col., 2012; Shahnejat-Bushehri y col., 2012). Los autores de estos trabajos propusieron que la tolerancia de las plantas sobreexpresantes se debería a que *JUB1* generaría una red de regulación génica que controlaría la concentración de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) intracelular. Esto surge porque los transcriptos de numerosos genes que responden a los niveles de H₂O₂ estaban aumentados en plantas *JUB1ox* con respecto a los de plantas salvajes (WT) luego de un tratamiento con H₂O₂ y lo opuesto se observó en plantas *jub1-1* (Wu y col., 2012).

JUB1 participa también en eventos del desarrollo, particularmente es un regulador positivo de la longevidad. Cuando se expresó ectópicamente en *Arabidopsis* generó un marcado retraso en la senescencia y una extensión en el ciclo de vida de las plantas (Wu y col., 2012). Por otro lado, modifica la arquitectura general de la planta regulando la elongación celular en diversos estadios a través de la regulación las vías de señalización de GA/BR. Reprime directamente la expresión de *GA3ox1* (del inglés, *GA3 oxidase 1*),

DWARF4 y *PIF4* (del inglés, *Phytochrome Interacting Factor 4*) y activa los genes *DELLA GAI* (del inglés, *GA Insensitive*) y *RGL1* (del inglés, *Repressor of GA-Like 1*. (Shahnejat-Bushehri y col., 2016). La regulación de los genes antes mencionados genera la acumulación de proteínas DELLA lo que deriva en el aumento de la susceptibilidad al patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato DC3000* (*Pst DC3000*). Por este motivo, JUB1 puede considerarse también un regulador negativo de la defensa mediando en la relación entre el crecimiento y la inmunidad de la planta. La **Imagen 34** resume las diferentes funciones propuestas para JUB1 en las plantas.

Imagen 34: JUB1 cumple un papel importante en el desarrollo de la planta y en su respuesta ante estrés biótico y abiótico.



Esquema mostrando las diversas funciones que se han asignado a JUB1.

Entre los distintos estreses abióticos que puede sufrir una planta, la sequía es el que genera mayores pérdidas de productividad en la agricultura. Por eso se han hecho grandes esfuerzos en entender las bases moleculares que subyacen en la adaptación de las plantas a este estrés y en generar cultivares con mayor tolerancia a las condiciones de sequía (Wang y col., 2003). A pesar de estos esfuerzos, en la mayoría de los casos, las plantas que logran tolerar el estrés hídrico tienen un bajo rendimiento en la producción de granos, tanto en condiciones de crecimiento normales como ante un estrés leve (Skirycz y col., 2011), ya que el mecanismo más común puesto en juego para tolerar sequía involucra el cierre estomático con la consecuente disminución en el rendimiento fotosintético (Kasuga y col., 1999). De todas formas, se han descrito

algunos eventos transgénicos en los que las plantas son capaces de tolerar el estrés y también incrementar su producción, y entre ellos se encuentran las plantas que expresan ectópicamente *HaHBI* o su homólogo *AtHB13* (Cabello y Chan, 2012), pero no se comprende totalmente qué combinación de mecanismos se pone en juego para lograr ese efecto (Nelson y col., 2007; Castiglioni y col., 2008; Li y col., 2008).

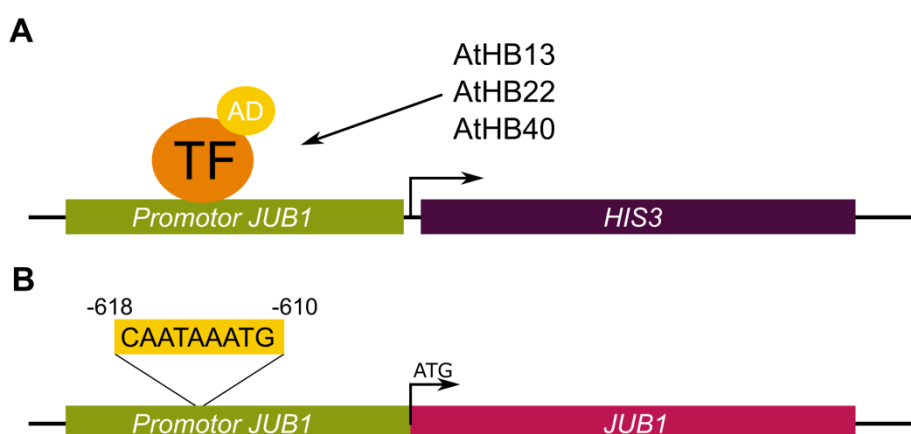
Resultados

Los resultados mostrados en este capítulo se obtuvieron en colaboración con el laboratorio de la Dra. Salma Balazadeh, del Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, Postdam, Alemania

AtHB13 es capaz de unir el promotor de *JUB1*

Con el objetivo que comprender cómo es la cascada de señalización que actúa corriente arriba de *JUB1* se realizó un ensayo de simple híbrido en levaduras buscando FTs capaces de unir el promotor de *JUB1*. Se tomó una porción de 1000 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción de *JUB1* y se clonó dirigiendo la expresión del gen reportero en levaduras *HIS3* en el vector *pTUY1H* (Castrillo y col., 2011) según lo descrito en Pruneda-Paz y col., 2014. Luego se transformaron levaduras con esta construcción y se enfrentaron a una biblioteca de aproximadamente 2000 factores de transcripción de *Arabidopsis thaliana* (Pruneda-Paz y col., 2014). Los resultados obtenidos indicaron que tres factores de transcripción de la familia HD-Zip I eran capaces de unir el promotor de *JUB1*: AtHB13, AtHB22 y AtHB40. Estos resultados concuerdan con el hecho de que 600 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción el promotor de *JUB1* hay una secuencia (CAATAAATG) muy similar a la caja pseudopalindrómica reconocida por los FTs de la familia HD-Zip I (**Imagen 35**).

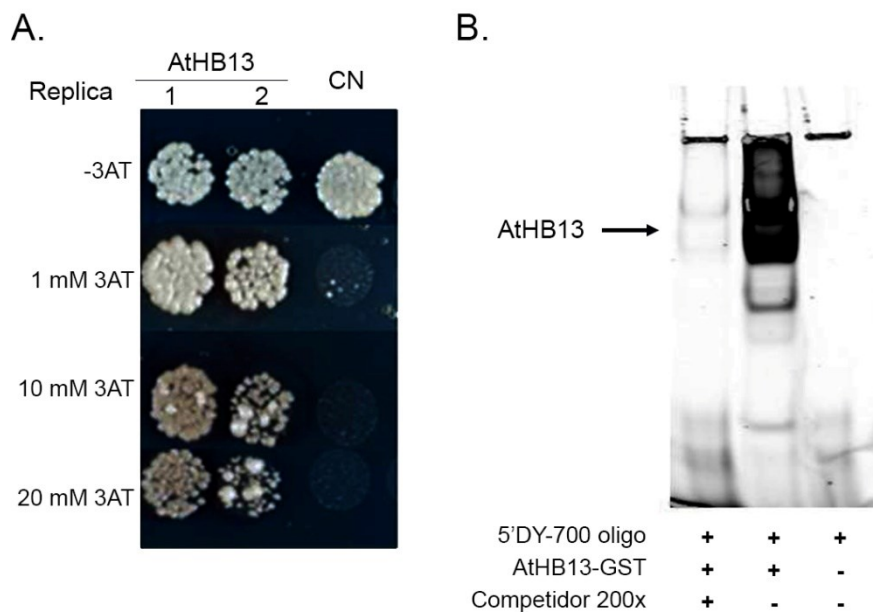
Imagen 35: AtHB13, AtHB22 y AtHB40 son capaces de unir el promotor de *JUB1*



A. Esquema representando el ensayo exploratorio de simple híbrido en levaduras, realizado para encontrar los FTs que tienen como blanco al promotor de *JUB1*. AtHB13, AtHB22 y AtHB40 fueron tres FTs encontrados mediante este ensayo. **B.** Esquema mostrando la localización dentro del promotor de *JUB1* de la caja pseudopalindrómica que podrían estar uniendo los FTs HD-Zip I encontrados en el ensayo de simple híbrido en levaduras.

Como *AtHB13* es, de los tres genes encontrados, el más estudiado hasta el momento y en el laboratorio contábamos con plantas mutantes y sobreexpresantes de este gen, se decidió estudiar en primer lugar la interacción *AtHB13-PromotorJUB1*. Se validó el ensayo de simple híbrido con la biblioteca, corroborando la interacción en levaduras con los clones aislados y haciendo estudios de interacción *in vitro*. La **Imagen 36** muestra el ensayo de simple híbrido en levaduras que permitió confirmar la interacción entre *AtHB13* y el promotor de *JUB1*, descartando la posibilidad de un resultado falso positivo. Asimismo, esta imagen muestra un ensayo de retardo en gel (EMSA, del inglés: *Electrophoretic Mobility Shift Assay*) que indica la unión de la proteína de fusión *AtHB13-GST* a una región de 40 pb del promotor de *JUB1* que contiene la caja pseudopalindrómica.

Imagen 36: Ensayos *in vivo* e *in vitro* confirman la interacción entre *AtHB13* y el promotor de *JUB1*



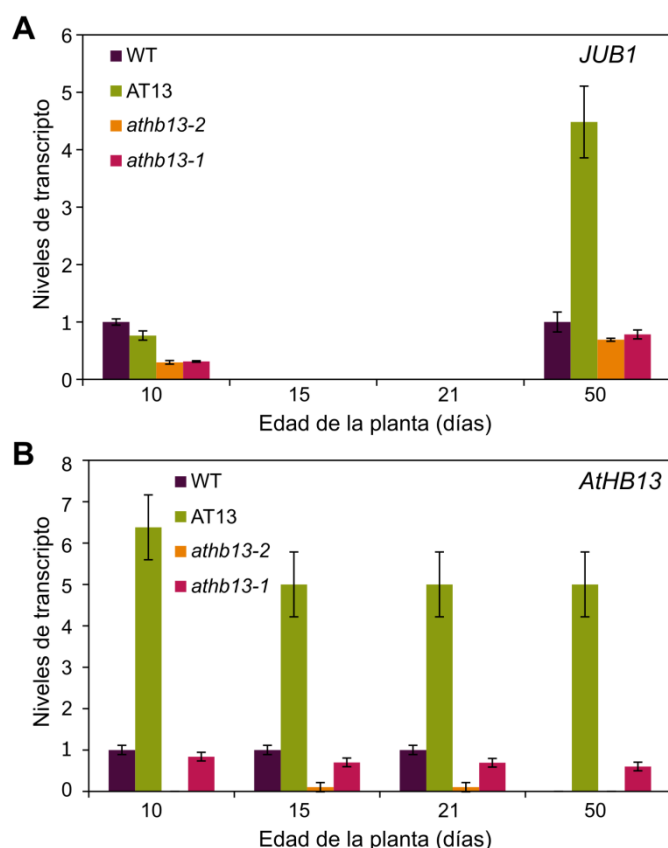
A. Ensayo de simple híbrido en levaduras para confirmar la interacción entre *AtHB13* y la secuencia promotora de *JUB1*. *3AT*: 3-Amino-1,2,4-triazole. *CN*: Control Negativo. **B.** EMSA mostrando que la proteína de fusión *AtHB13-GST* es capaz de unir un fragmento de 40 pb del promotor de *JUB1* que contiene la secuencia CAATAAATG. *5'-DY700-Oligo*: oligonucleótidos doble hebra marcados. *Competidor*: oligonucleótidos no marcados conteniendo la caja pseudopalindrómica que unen los FTs HD-Zip I.

Para corroborar que *JUB1* es un gen blanco de *AtHB13* en las plantas, se midieron los niveles de transcritos de *JUB1* en plantas mutantes (*athb13-1* y *athb13-2*) y sobreexpresantes (*AT13*) en *AtHB13*. Estas mediciones se realizaron en cuatro estadios diferentes del ciclo de vida y los resultados indicaron que *AtHB13* regula la expresión

de *JUB1* en plántulas y en plantas de 50 días de edad. Notoriamente *JUB1* fue indetectable en estadios intermedios (**Imagen 37**).

Estos resultados sugirieron que si bien *AtHB13* es capaz de regular positivamente la transcripción de *JUB1*, no sería el único actor en su regulación, ya que entre los 10 y los 50 días de la planta, existe algún mecanismo o FT represor que impide la inducción de *JUB1* aun cuando *AtHB13* se encuentra sobreexpresado.

Imagen 37: *AtHB13* regula la expresión de *JUB1* en algunos estadios de la planta



A. Niveles de transcritos de *JUB1* en distintos estadios de plantas WT, *AT13*, *athb13-1* y *athb13-2*. **B.** Niveles de transcritos de *AtHB13* en plantas WT, *AT13*, *athb13-1* y *athb13-2* en los mismos estadios que en **A**. Los niveles de transcritos se relativizaron a los de plantas WT aplicando el método $\Delta\Delta Ct$. Los transcritos de actinas (*ACTINA2* y *ACTINA8*) se utilizaron como referencia.

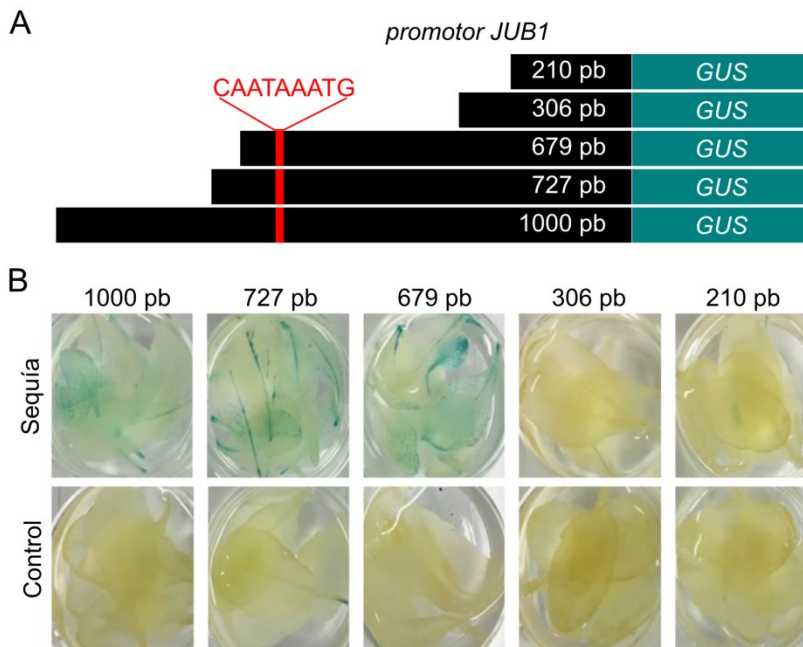
La sobreexpresión de *JUB1* confiere tolerancia al estrés hídrico en *Arabidopsis thaliana*

Dado que tanto la expresión de *AtHB13* como la de *JUB1* se inducen por algunos tipos de estrés abiótico, que *AtHB13* estaría regulando a *JUB1* y que *AtHB13* confiere tolerancia a estrés hídrico cuando se sobreexpresa, decidimos investigar si *JUB1* es parte de la vía de señalización disparada por *AtHB13* para conferir tolerancia (Cabello y col., 2012; Cabello y Chan, 2012).

En primer lugar analizamos la expresión de *JUB1* en condiciones de estrés hídrico. Se tomaron plantas transformadas con construcciones que poseían distintas regiones del

promotor de *JUB1* dirigiendo la expresión del gen reportero *GUS* y se las sometió a condiciones de estrés hídrico en etapa reproductiva durante seis días. En la **Imagen 38** se muestran las tinciones histoquímicas obtenidas en condiciones normales y luego del tratamiento. Se puede observar que las versiones más largas del promotor de *JUB1* generan una inducción del reportero cuando las plantas son sometidas a estrés hídrico mientras que dicha inducción se pierde cuando los segmentos del promotor no poseen la caja pseudopalindrómica. Estos resultados indican que la expresión de *JUB1* se induce ante un tratamiento con estrés hídrico y que la secuencia CAATAAATG sería importante para generar esta inducción.

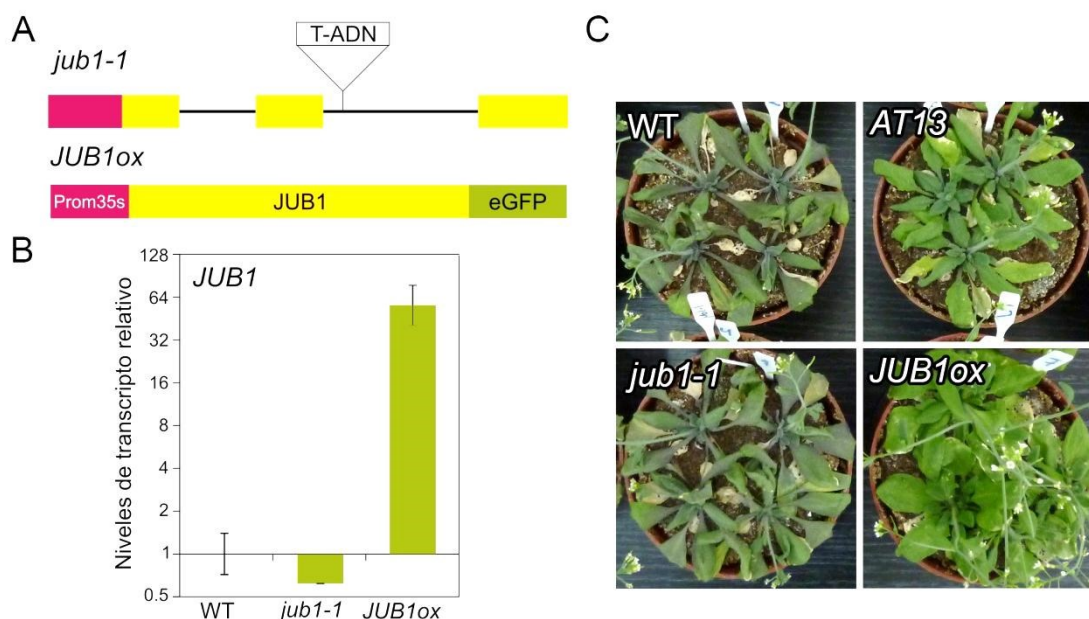
Imagen 38: La expresión de *JUB1* se induce ante condiciones de sequía



A. Esquema mostrando las diferentes construcciones hechas con segmentos del promotor de *JUB1* dirigiendo la expresión del gen *GUS* y utilizadas para transformar plantas. En rojo se muestra la posición de la caja pseudopalindrómica reconocida por AtHB13. **B.** Tinciones histoquímicas obtenidas en condiciones normales y luego de un tratamiento de estrés hídrico de seis días.

Posteriormente, evaluamos el comportamiento de las plantas mutantes (*jub1-1*) y sobreexpresantes en el gen *JUB1* (*JUB1ox*, **Imagen 39.C y B**) en las condiciones de estrés hídrico en las cuales las plantas *AT13* habían mostrado tener tolerancia. La **Imagen 39.C** muestra que cuando se aplicó un tratamiento de estrés severo en estadio reproductivo, tanto las plantas *AT13* como las plantas *JUB1ox* toleraron mejor que las WT, mientras que las plantas mutantes *jub1-1* se comportaron en forma similar a los controles.

Imagen 39: La sobreexpresión de *JUB1* confiere tolerancia a estrés hídrico



A. Arriba: representación esquemática del gen *JUB1* mostrando el sitio de inserción del T-ADN en la mutante *jub1-1*. Caja rosada: promotor, Cajas amarillas: exones, Líneas: intrones. Abajo: representación esquemática de la construcción utilizada para generar las plantas sobreexpresantes *JUB1ox*. **B.** Niveles de transcritos relativos de *JUB1* en plantas WT, *jub1-1* y *JUB1ox*. Los niveles de transcritos se relativizaron a los de plantas WT aplicando el método $\Delta\Delta Ct$. Los transcritos de actinas (*ACTINA2* y *ACTINA8*) se utilizaron como referencia. **C.** Imágenes ilustrativas de plantas WT, *AT13*, *jub1-1* y *JUB1ox* sometidas a estrés hídrico severo durante el estadio reproductivo. Las fotos se tomaron 10 días después de la última irrigación.

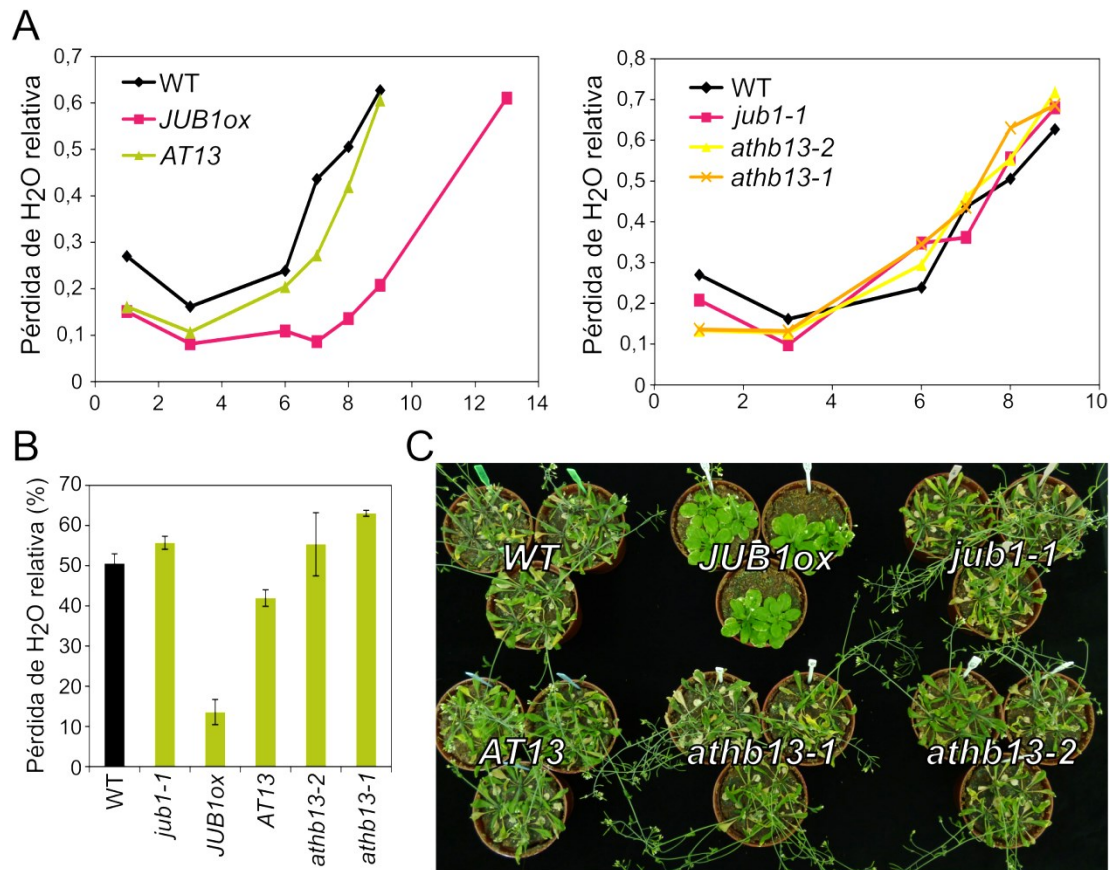
Con el objeto de caracterizar la respuesta diferencial al estrés hídrico presentada por las plantas de los distintos genotipos, cuantificamos la pérdida de agua a lo largo del tratamiento de estrés. Con este fin, se tomaron plantas que habían pasado al estadio reproductivo y se dejaron de regar completamente. En los tiempos indicados se cortaron hojas, se pesaron (P_1) y rehidrataron durante cinco horas, para luego realizar una segunda determinación del peso de las mismas (P_2). Con estos datos se calculó la cantidad relativa de agua perdida por las hojas para cada punto según la siguiente fórmula:

$$\text{Pérdida de H}_2\text{O relativa} = \frac{(P_2 - P_1)}{P_2}$$

Las plantas *JUB1ox* perdieron menos agua que las plantas WT e incluso menos que las plantas *AT13* cuando se las sometió a estrés hídrico severo en estadio reproductivo (**Imagen 40**). En forma concordante con el comportamiento observado frente al estrés (ver más arriba), las diferencias entre plantas WT, *athb13* y *jub1-1* no fueron significativas. Esto indicaría que la tolerancia al estrés hídrico estaría dada por la

expresión ectópica de *JUB1* y *AtHB13*, pero no sería una función natural de estos genes en la planta, o al menos no serían los únicos actores participantes en la respuesta a este estrés.

Imagen 40: Las plantas *JUB1ox* pierden menos agua que plantas salvajes durante un estrés hídrico severo

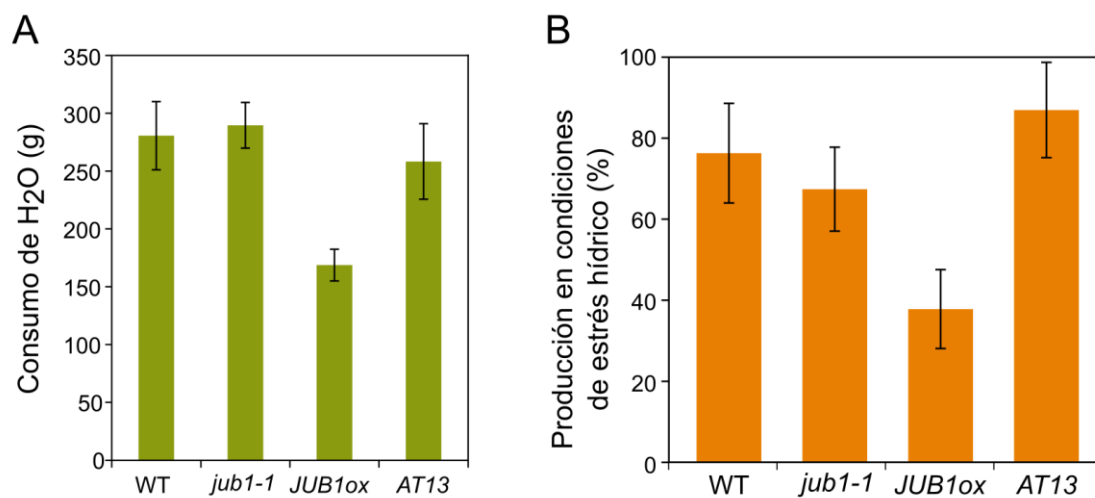


A. Cinética de la pérdida de agua relativa en hojas de plantas mutantes y sobreexpresantes. *Izquierda:* plantas WT, *JUB1ox* y *AT13*. *Derecha:* WT, *jub1-1*, *athb13-1* y *athb13-2*. Cada punto representa el valor promedio de cuatro hojas. Se muestra un ensayo representativo de las tres réplicas realizadas. **B.** Comparación del contenido de agua relativo en hojas el octavo día luego de iniciado el tratamiento de estrés severo. Para cada punto se utilizaron cuatro hojas. Barras: error estándar. **C.** Fotografía representativa de los distintos genotipos evaluados el octavo día luego de iniciado el estrés hídrico severo.

A continuación evaluamos el comportamiento de las plantas *JUB1ox* frente a un estrés hídrico moderado. Las plantas se sembraron colocando sólo una en cada maceta y se crecieron en condiciones normales hasta alcanzar el estadio reproductivo. Luego se dejó de regar hasta que las macetas alcanzaron un peso equivalente al 50% de su capacidad de campo. Esta capacidad de campo se mantuvo a lo largo del tiempo y hasta la muerte de las plantas pesando regularmente las macetas y agregando la cantidad de agua necesaria a cada una para mantener el peso adecuado. Como controles se utilizaron

plantas en las cuales la capacidad de campo se mantuvo cercana al 90 % durante todo el ciclo de vida. Al final del ensayo se sumó el agua agregada a cada planta a lo largo de todo el ensayo y se cuantificó la producción de semillas de cada una. Las plantas *JUB1ox* consumieron una menor cantidad de agua que los controles, pero fueron las más afectadas en cuanto a su producción, mostrando una reducción del 60 % en su productividad cuando fueron sometidas a estrés hídrico en comparación con las condiciones de irrigación óptimas (**Imagen 41**).

Imagen 41: La producción de semillas se afecta más en plantas *JUB1ox* que en sus controles ante un estrés hídrico moderado.



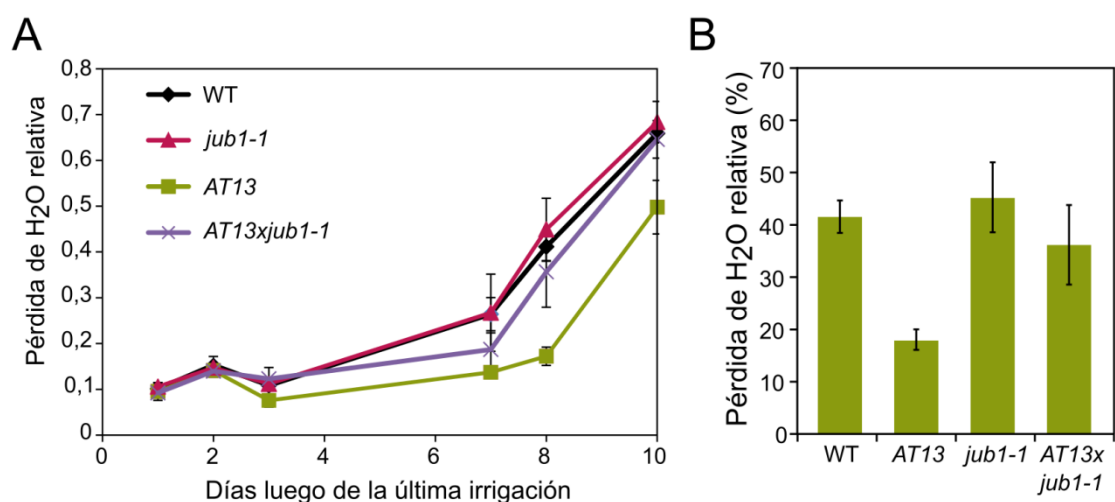
A. Cantidad total de agua agregada a cada maceta durante el ensayo de estrés hídrico moderado. El gráfico muestra el promedio de cinco plantas para cada genotipo. Barras: error estándar. Se muestra un ensayo representativo de las tres réplicas realizadas. **B.** Producción de semillas en condiciones de estrés hídrico moderado relativa a la producción obtenida en condiciones control para cada genotipo. El gráfico muestra el promedio de cinco plantas para cada genotipo. Barras: error estándar. Se muestra un ensayo representativo de las tres réplicas realizadas.

La tolerancia a estrés hídrico de las plantas *AT13* está mediada en parte por *JUB1*

Los resultados mostrados hasta el momento prueban que la sobreexpresión de *JUB1* confiere una mayor tolerancia al estrés hídrico, de forma similar a lo sucede con *AtHB13*. Sin embargo, de estos resultados no se puede inferir que la tolerancia de las plantas *AT13* esté mediada por *JUB1*. Para investigar esta cuestión, generamos cruza entre las plantas *AT13* y *jub1-1* (*AT13xjub1-1*) y evaluamos su comportamiento ante el estrés hídrico. Luego de confirmar mediante PCR que poseíamos plantas homocigotas para la mutación en *JUB1* y sobreexpresantes de *AtHB13* llevamos a cabo un ensayo de

estrés hídrico severo en el que se evaluó la pérdida de agua de las hojas a lo largo del tiempo. Los resultados se reflejan en la **Imagen 42**, en la que se puede apreciar que el comportamiento de las plantas *AT13xjub1-1* se asemeja al de plantas *jub1-1*, lo que sugiere que efectivamente, la tolerancia al estrés hídrico de las plantas *AT13* está mediada, al menos en parte, por *JUB1*.

Imagen 42: Las plantas *AT13OX/jub1-1* muestran menor tolerancia al estrés hídrico moderado que plantas *AT13*



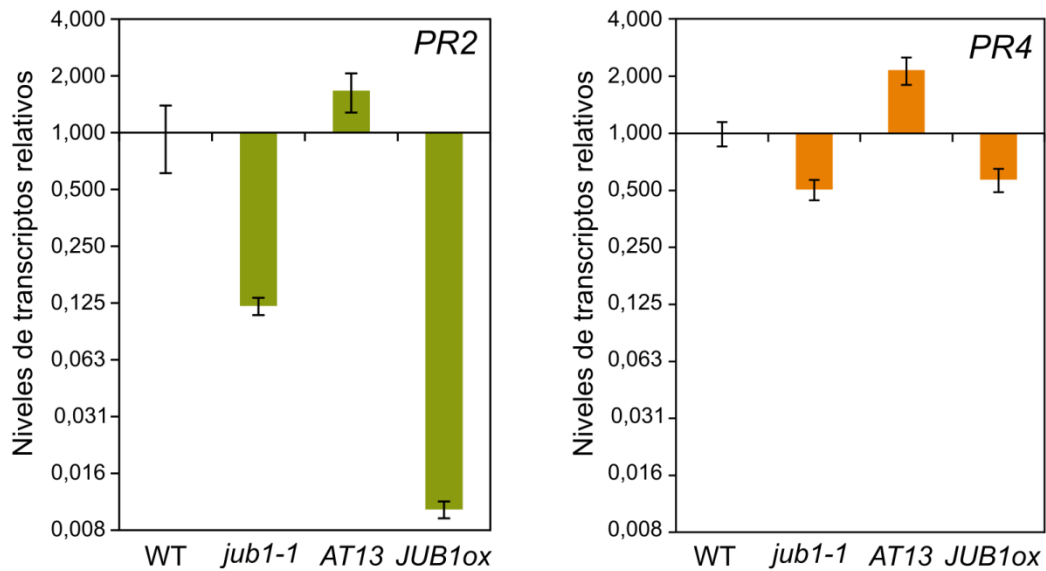
A. Cinética de la pérdida de agua relativa en hojas de plantas de distintos genotipos. Cada punto representa el valor promedio para cuatro hojas. Se muestra un ensayo representativo de las tres réplicas realizadas. **B.** Comparación del contenido de agua relativo en hojas el octavo día luego de iniciado el tratamiento de sequía severo. Para cada punto se utilizaron cuatro hojas. Barras: error estándar.

La tolerancia a sequía conferida por la sobreexpresión de *JUB1* no está mediada por *PR2* ni por *PR4*

Teniendo en cuenta que las plantas *AT13* son capaces de tolerar las condiciones de sequía mediante la estabilización de sus membranas y que esto lo consiguen mediante la inducción de la expresión de los genes relacionados a patogénesis *PR2*, *PR4* y *GLU* (Cabello y Chan, 2012), decidimos medir los niveles de transcritos de estos genes en las plantas mutantes y sobreexpresantes de *JUB1*. El objetivo de este ensayo fue saber si *JUB1* estaba involucrado en la cascada de regulación mediante la cual AtHB13 induce la expresión de *PR2*, *PR4* y *GLU*. Respetando lo informado por Cabello y Chan (2012), las medidas se realizaron utilizando ADNc tomado de hojas de roseta de plantas de 25 días. En estas condiciones el gen *GLU* no se pudo detectar en ninguno de los genotipos y los transcritos de *PR2* y *PR4* no mostraron el grado de inducción informado

anteriormente para plantas *AT13*, sino una inducción menor (**Imagen 43**). Si bien *JUB1* parece afectar de alguna manera la expresión de *PR2* y *PR4*, esta regulación no es positiva, y no parece ser específica, ya que tanto en las plantas mutantes como en las sobreexpresantes de *JUB1* estos genes están reprimidos.

Imagen 43: *JUB1* no regula positivamente la expresión de *PR2* ni *PR4*.

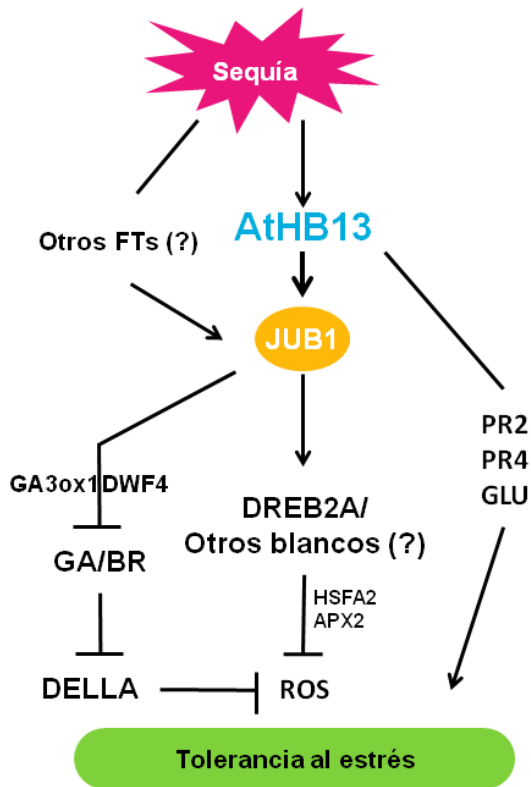


Niveles de transcritos relativos de *PR2* y *PR4* de plantas WT, *AT13*, *jub1-1* y *JUB1ox* de 25 días. Los niveles de transcritos se relativizaron a los de plantas WT aplicando el método $\Delta\Delta Ct$. Los transcritos de actinas (*ACTINA2* y *ACTINA8*) se utilizaron como referencia.

Discusión

Los resultados mostrados en este capítulo indican que la sobreexpresión de *AtHB13* es capaz de generar tolerancia a sequía por al menos dos vías diferentes. Por un lado, ya se había informado que la inducción de los genes relacionados a patogénesis *PR2*, *PR4* y *GLU* participaban de la señalización en respuesta a estrés abiótico; es más, la sobreexpresión de cada uno de estos genes separadamente confirió tolerancia parcial al estrés hídrico (Cabello y Chan, 2012). Por otro lado, la inducción de *JUB1* también generó un aumento de la tolerancia a sequía (**Imagen 44**). Esta inducción parece ser una condición necesaria para lograr la tolerancia a sequía, ya que cuando se generaron las cruzas *ATI3xjub1-1*, las plantas obtenidas se comportaron de forma similar a las plantas salvajes en los ensayos de estrés hídrico realizados. Estas observaciones en conjunto, cuyas conclusiones se esquematizan en la **Imagen 44**, abren nuevas preguntas a responder que requerirán de experimentos adicionales en un futuro cercano.

Imagen 44: Modelo propuesto que muestra el papel de *AtHB13* y *JUB1*, así como la relación entre estos FTs en la tolerancia a sequía.



Representación gráfica que resume los conocimientos actuales acerca del accionar de *AtHB13* y *JUB1* ante condiciones de estrés hídrico.

La expresión de *JUB1* está mediada por numerosos factores de transcripción además de *AtHB13*, tal como lo reflejan los resultados obtenidos en el ensayo de simple híbrido en levaduras aquí mostrado y el trabajo publicado por Shahnejat-Bushehri y col., 2016. Estos resultados podrían explicar por qué en algunos estadios de la planta los transcritos de *JUB1* no se detectan, a pesar de que *AtHB13* esté sobreexpresado y serían coherentes con el hecho que las plantas que sobreexpresan *PR2* o *PR4* son capaces de tolerar condiciones de sequía (Cabello y Chan, 2012) a pesar de que la expresión de *JUB1* no se indujo artificialmente.

En base a los resultados obtenidos, podemos concluir que la sobreexpresión de *JUB1*, lamentablemente, no constituiría una herramienta biotecnológica de interés, ya que las plantas *JUB1ox* mostraron un marcado descenso de la productividad cuando se sometieron a condiciones de estrés hídrico, dando incluso una mayor pérdida de producción que las plantas control. Este escenario es diferente al observado para *AtHB13* y otros genes de la familia HD-Zip I, cuya sobreexpresión resultó una herramienta para generar cultivos con mayor productividad ante condiciones adversas (Cabello y Chan, 2012; Chan y col., 2013; Raineri y col., 2015; Cabello y col., 2016).

Estas observaciones resaltan la importancia de las cascadas de regulación génica, que son capaces de, a partir de un estímulo, controlar la expresión de una gran cantidad de genes en distintas vías de respuesta para permitir que el individuo sobreviva en las condiciones ambientales del momento (Arce y col., 2008). En este caso, *AtHB13* se encuentra corriente arriba de *JUB1* y regula dos o más vías independientes de respuesta, tal que las plantas *AT13* son capaces de tolerar la sequía sin perder productividad. En cambio, la expresión ectópica de *JUB1* regula una vía de respuesta que le permite a las plantas tolerar la sequía, pero no evitar la pérdida de productividad.

Curiosamente, en todos los ensayos de sequía realizados, excepto en aquellos en los que se midió productividad, las plantas *JUB1ox* mostraron un mejor desempeño que las plantas *AT13*. Una posible explicación para esto radica en los niveles de expresión de cada gen en dichas plantas. En el caso de *AT13*, la expresión de *AtHB13* era sólo 5 veces superior a la de plantas control, mientras que en las plantas *JUB1ox* la expresión de *JUB1* sobrepasaba en 50 veces la obtenida en plantas salvajes. Un trabajo reciente de este laboratorio mostró que los niveles de transcritos del transgén en plantas que expresan ectópicamente FTs HD-Zip I se relaciona directamente con el grado de tolerancia a estrés encontrado (Romani y col., 2015) y esto podría quizás extenderse en este caso al FT *JUB1*. De todas formas, la discordancia entre la pérdida de

productividad observada en las sobreexpresantes de *JUB1* y no en las de *AtHB13* podría explicarse porque *AtHB13*, aún sobreexpresado, no induce la expresión de *JUB1* en casi toda la vida de las plantas, a excepción de estadios muy tempranos o muy tardíos. Esto indicaría que durante los estadios intermedios, *AtHB13* despliega otros mecanismos, probablemente la inducción de los genes relacionados a patogénesis como ya fue descrito, para conferir tolerancia a estrés hídrico.

Como conclusión puede decirse que *AtHB13* induce la expresión de *JUB1* en estadios específicos del desarrollo y la sobreexpresión de *JUB1* confiere tolerancia a estrés hídrico severo pero genera pérdidas de productividad en condiciones de estrés moderado. *JUB1* es necesario para que *AtHB13* confiera tolerancia a estrés en estadios particulares pero en otros, promueve vías de señalización alternativas que conducen asimismo a la tolerancia.

Capítulo 3:

**Un marco de lectura abierto presente en la región
5' no codificante de *AtHB1* regula negativamente
la traducción del marco de lectura principal**

Introducción

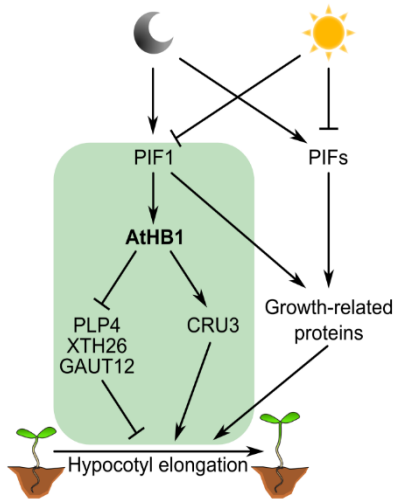
La función de AtHB1 en plantas

AtHB1 es un factor de transcripción perteneciente al clado III de la subfamilia HD-Zip I de factores de transcripción de *Arabidopsis thaliana*, con capacidad para activar la transcripción de sus genes blanco (Arce y col., 2011; Capella y col., 2014). En estudios previos se identificó el dominio activador en la región carboxilo terminal de AtHB1 y se demostró su capacidad reguladora tanto en levaduras como en plantas. Este dominio interactúa con AtTBP2, un componente de la maquinaria basal de transcripción (Capella y col., 2014).

La expresión de *AtHB1* se reprimió en plantas tratadas con NaCl y bajas temperaturas y se indujo en condiciones de oscuridad (Henriksson y col., 2005). Por otra parte, la sobreexpresión de *AtHB1* en plantas de tabaco afectó el desarrollo del parénquima en empalizada y generó en las plantas un fenotipo de fotomorfogénesis constitutiva cuando éstas fueron crecidas en oscuridad (Aoyama y col., 1995).

Después de estos informes, un estudio más detallado hecho en nuestro laboratorio mostró que *AtHB1* se expresa principalmente en hipocotilos y raíces y esta expresión está directamente regulada por PIF1 (*Phytochrome-Interacting Factor 1*), un factor de transcripción capaz de promover la elongación celular del hipocotilo ante la falta de luz (Capella y col., 2015b). Analizando la longitud de los hipocotilos en plantas mutantes y sobreexpresantes en *AtHB1* y *PIF1*, junto con dobles mutantes *athb1/pif1*, se pudo determinar que AtHB1 actúa corriente abajo de PIF1, regulando la expresión de genes involucrados en la elongación y síntesis de la pared celular (Capella y col., 2015b). En la **Imagen 45** se muestra el modelo propuesto para explicar la regulación y la función de AtHB1 en la elongación del hipocotilo.

Imagen 45: Modelo propuesto para la acción de *AtHB1* en la elongación del hipocotilo.



Adaptado de Capella y col., 2015b. Durante la noche, PIF1 se acumula en el núcleo e induce la expresión de AtHB1. Esto provoca la regulación de numerosos genes involucrados en la composición de la pared celular y en la elongación celular para promover el crecimiento del hipocotilo. PIF1 y otros PIFs (entre ellos PIF3, PIF4 y PIF5) también regulan, independientemente de AtHB1, otras proteínas involucradas en la elongación de las células del hipocotilo.

Marcos abiertos de lectura y péptidos conservados en las regiones no codificantes de los genes de plantas

La secuencia codificante de un ARN mensajero se encuentra generalmente flanqueada por secuencias conocidas como regiones no codificantes (UTR, del inglés *Untranslated Region*). Estas regiones pueden contener distintos elementos regulatorios de la traducción y, en particular, en las secuencias 5'UTR se pueden encontrar bucles, sitios de unión a proteínas, segmentos internos de entrada del ribosoma (IRES, del inglés *Internal Ribosome Entry Sequences*) o marcos de lectura abiertos corriente arriba (uORF, del inglés *upstream Open Reading Frames*; Somers y col., 2013).

Los uORF codifican péptidos en los marcos de lectura abiertos que se encuentran corriente arriba de la secuencia codificante primaria (Von Arnim y col., 2014). Teniendo en cuenta el modelo del inicio de la traducción de Kozak, el primer triplete AUG en el ARN mensajero comenzando desde el capuchón del extremo 5' es el triplete reconocido por los ribosomas para iniciar la traducción. Por lo tanto, cuando existe un uORF, el AUG de éste es el codón de inicio reconocido, produciendo en general una reducción en la eficiencia de traducción de la región codificante principal del mensajero (Kozak, 1987, Kozak, 2002).

Los uORFs son relativamente comunes (entre un 20-50% de los transcritos eucariotas posee uORFs), pero notoriamente, menos de un 1% de estos ARN mensajeros presentan conservación de los uORFs entre diferentes especies (CPuORF, del inglés *Conserved Peptide uORF*; Jorgensen y Dorantes-Acosta, 2012). Un análisis

de los transcriptomas de arroz y *Arabidopsis thaliana* permitió identificar 26 CPuORFs diferentes en plantas (Hayden y Jorgensen, 2007). Curiosamente, 22 de las 26 familias identificadas que contienen CPuORFs cumplen funciones regulatorias en las plantas y puntualmente, los factores de transcripción se encuentran estadísticamente sobrerrepresentados, conteniendo un 26 % de los CPuORFs descritos. Por otra parte, es notable que enzimas de expresión constitutiva (“*housekeeping*”) y otras responsables del metabolismo primario y secundario se encuentran ausentes entre los genes que poseen CPuORFs (Hayden y Jorgensen, 2007).

La función de los CPuORFs ha sido poco estudiada y los informes existentes indican que éstos controlan la traducción de los mORF (ORF principal, del inglés *main Open Reading Frame*) corriente abajo. En algunos casos, se ha informado que los uORF están regulados por una molécula señalizadora pequeña que interaccionaría con el péptido nascente cambiando su conformación; esto derivaría, o no, en el trabado del ribosoma (Rahmani y col., 2009; Ivanov y col., 2010; Alatorre-Cobos y col., 2012; Guerrero-González y col., 2014; Laing y col., 2015)

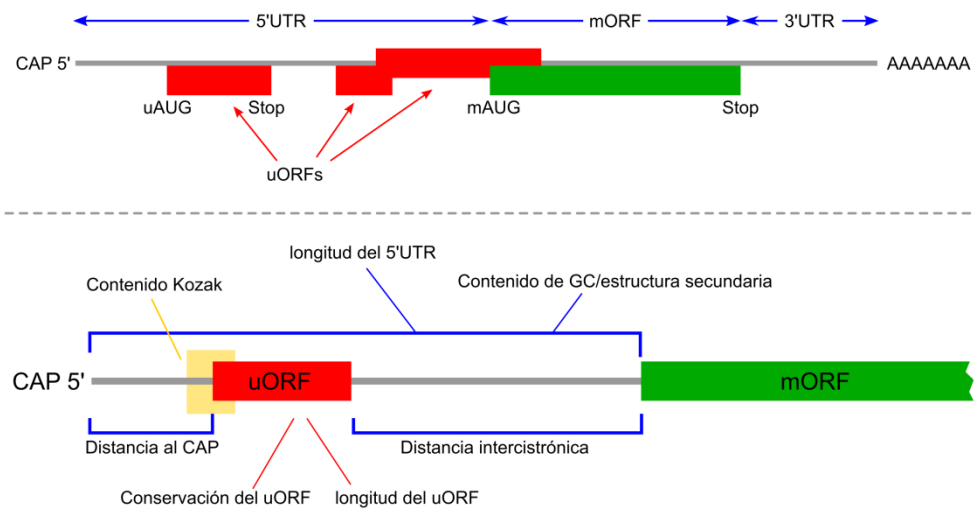
Uno de los CPuORF descritos, el CPuORF33, se encuentra en la región 5' no codificante de *AtHBI* (Hayden y Jorgensen, 2007) y a la fecha sólo se conoce parcialmente su función (Capella, 2015c), pero se desconoce totalmente su mecanismo de acción.

Los mecanismos de acción de los uORFs

En un uORF pueden señalarse distintas propiedades que están relacionadas con su función en el control postranscripcional del ORF principal (Somers y col., 2013; Von Arnim y col., 2014). Como se observa en la **Imagen 46**, entre las características más importantes se encuentran el largo del 5'UTR, la estructura secundaria que pueda formar, la secuencia y el contenido de GC del uORF y la posición que ocupa.

Por otra parte, son numerosos los mecanismos a través de los cuales un uORF puede regular postranscripcionalmente la traducción del marco de lectura principal. Entre los mismos se pueden citar la reiniciación de los ribosomas, la interacción con las IRES, el decaimiento mediado por ARNm sin sentido (NMD, del inglés *Nonsense-Mediated Decay*), el retraso de la traducción por el uso de codones inusuales o el trabado del ribosoma por parte del péptido traducido a partir del uORF (Somers y col., 2013).

Imagen 46: Propiedades de un uORF que pueden influir en su mecanismo de acción



Panel superior: representación esquemática de un ARN mensajero que posee uORFs. En un mismo mensajero pueden existir varios uORFs (rojo) que pueden solaparse entre ellos o con el mORF (verde).
Panel inferior: esquema mostrando algunas de las propiedades más importantes de un uORF que pueden influir en su modo de regular la traducción del mORF.

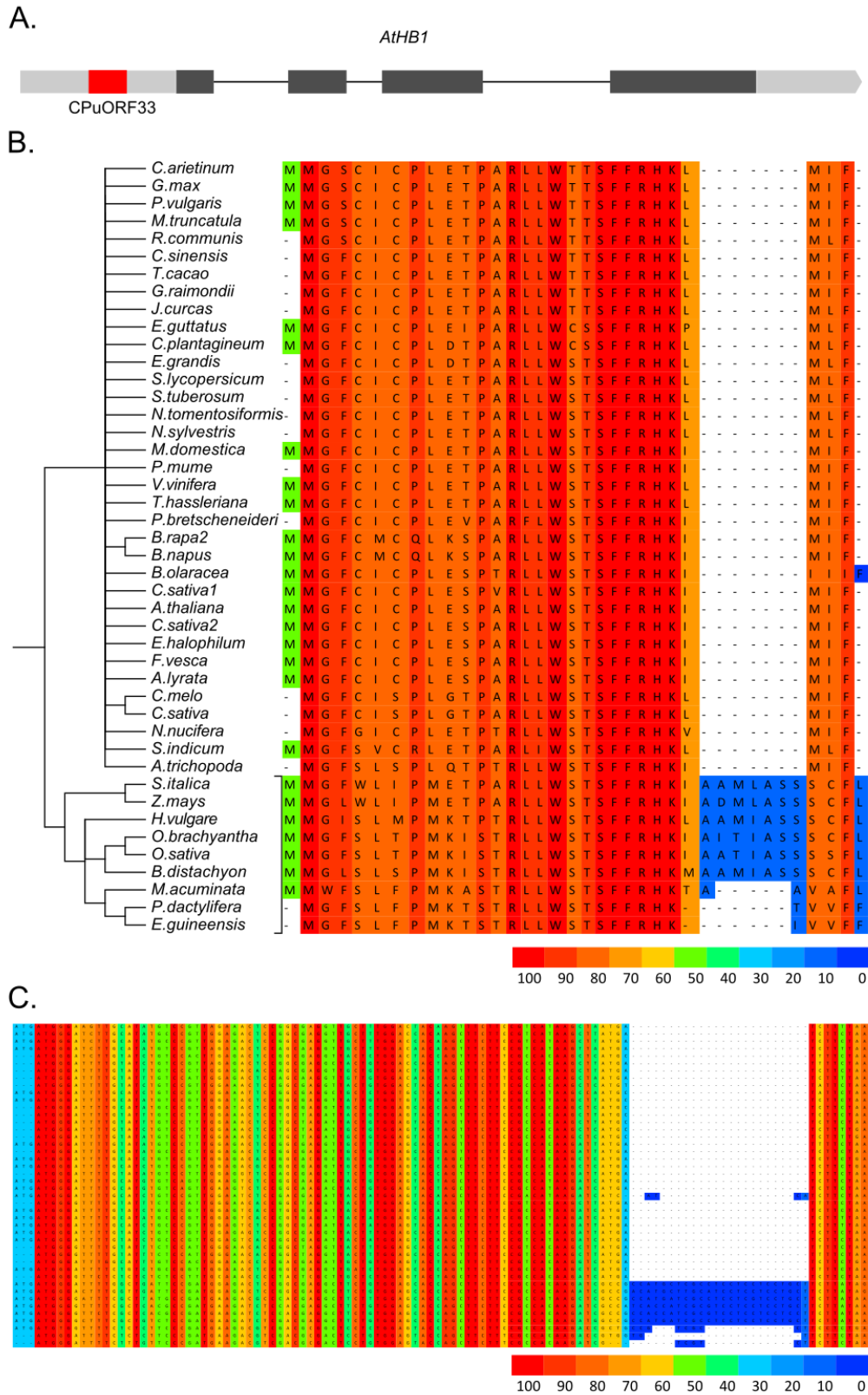
Resultados

El gen *AtHB1* presenta un péptido conservado en su región 5'UTR denominado CPuORF₃₃

Como se mencionó más arriba, Matías Capella (Capella, 2015c) había detectado la presencia del CPuORF33 en la región 5' UTR del gen *AtHB1* de *Arabidopsis thaliana*. Nos propusimos entonces investigar la función putativa de este péptido así como su mecanismo de acción. Como primer paso encaramos un análisis *in silico* de las secuencias 5' no codificantes de genes homólogos a *AtHB1* en otras especies. Para ello se realizó una búsqueda BLASTP contra la base de datos de secuencias proteicas no redundantes del NCBI (se utilizaron los parámetros predeterminados; Altschul y col., 1990), utilizando la secuencia aminoacídica de *AtHB1*. De las secuencias encontradas se tomaron todas aquellas que contenían información sobre las regiones 5' no codificantes de los mensajeros y así se obtuvieron 46 secuencias nucleotídicas diferentes, pertenecientes a 43 especies vegetales distintas, incluyendo mono- y dicotiledóneas (**Anexo 3**).

A continuación se determinó cuáles de estas secuencias poseían marcos de lectura abiertos, corriente arriba de los marcos de lectura principales utilizando el programa Snapgene. Sólo se tuvieron en cuenta aquellos marcos de lectura abiertos que comenzaran con un triplete AUG y fueran mayores a 24 pb. Así se obtuvieron las secuencias nucleotídicas y proteicas de 43 uORFs diferentes, todos pertenecientes al grupo 14 identificado previamente (Hayden y Jorgensen, 2007).

Imagen 47: La secuencia de aminoácidos del CPuORF33 tiene mayor grado de conservación que la secuencia de nucleótidos



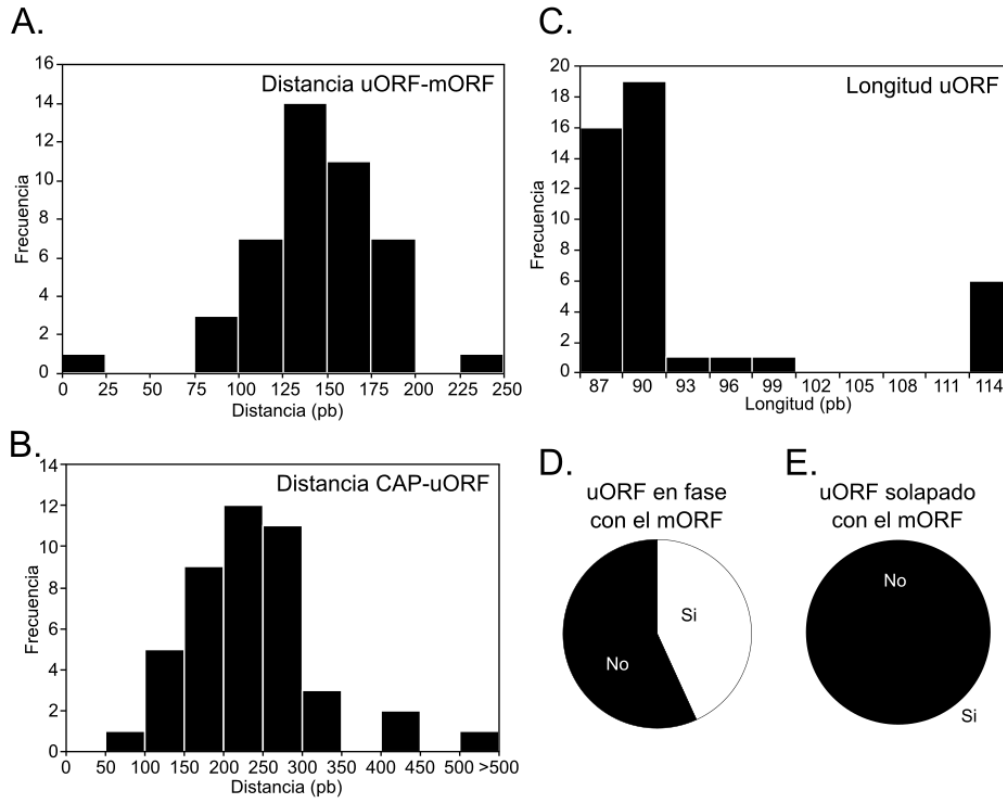
A. Representación esquemática del gen *AtHB1*. Gris: exones; gris claro: 5' y 3' UTR; rojo: CPuORF33; líneas: intrones. B. *Panel izquierdo*: árbol filogenético construido utilizando la secuencia de aminoácidos predicha para los uORF presentes en los transcriptos correspondientes a 43 proteínas homólogas a AtHB1 y disponibles en bases de datos públicas. Se distinguen dos clados, correspondientes a plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. *Panel Derecho*: alineamiento de las secuencias de aminoácidos correspondientes. C. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de los uORFs utilizados en B.

Este conjunto de secuencias peptídicas fue alineado mediante el programa PRALINE (Simossis y Heringa, 2005), obteniéndose los resultados que se muestran en la **Imagen 47**. Cabe destacar que a pesar de la elevada conservación detectada en estas secuencias, la longitud de los uORFs pertenecientes a las especies monocotiledóneas comparadas con las de dicotiledóneas presentaron diferencias significativas. Los CPuORF de las monocotiledóneas tienen 38 aminoácidos mientras que los de dicotiledóneas son más pequeños y tienen 29-30 aminoácidos.

Utilizando el alineamiento obtenido se construyó un árbol filogenético. Se ingresó el alineamiento en el programa ClustalW (Goujon y col., 2010; Larkin y col., 2007) y se generó el árbol basado en el principio de ML utilizando el modelo JTT+I+G (Jones y col., 1992; Reeves, 1992; Yang, 1993) y 100 réplicas de *bootstrap*. El análisis del árbol filogenético confirmó la existencia de las diferencias observadas entre los uORF de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, ya que las secuencias se resolvieron en dos clados.

Utilizando el mismo grupo de secuencias se realizó también un análisis de los distintos elementos de un uORF que pueden contribuir en su accionar regulatorio. Para ello se tabuló la longitud de cada uORF, la distancia entre el CAP y el codón de inicio del uORF, la distancia entre el codón de finalización del uORF y el ATG del mORF, si ambos ORFs se encontraban en el mismo marco de lectura, o no, y si ambos ORFs se solapaban, o no. Los resultados obtenidos se muestran en el **Anexo 4** y en la **Imagen 48**. Como se observa, la longitud del uORF es una de las características más conservadas entre especies, a pesar de existir una clara diferencia entre especies monocotiledóneas y dicotiledóneas. Otra propiedad altamente conservada es que en ningún caso existe solapamiento entre el uORF y el mORF. En ambos casos, la elevada conservación entre especies de estas propiedades sugiere que el CPuORF33 estaría cumpliendo un papel regulatorio muy importante. Por el contrario, las demás características analizadas mostraron una gráfica de distribución similar a una curva gaussiana, lo que denota una alta variabilidad entre especies e indicaría que no son propiedades relevantes para la regulación ejercida por el uORF.

Imagen 48: La longitud del *uORF* es la característica más conservada y varía entre plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.



A. Histograma mostrando la distribución de la distancia en pares de bases entre el codón de terminación predicho para el uORF y el codón de inicio del ORF principal (mORF). **B.** Distribución de la distancia en pares de bases comprendida entre el CAP predicho para el transcripto y el sitio de inicio de la traducción putativo del uORF. **C.** Distribución de la longitud del uORF, medida en pares de bases, para las 43 especies analizadas. **D.** Porcentaje de especies en las cuales el uORF y el mORF se encuentran en el mismo marco de lectura. **E.** Porcentaje de especies en las cuales el uORF se encuentra solapado con el mORF. En todos los casos se utilizaron secuencias provenientes de 43 especies distintas.

La expresión de *AtHBI* está regulada por el CPuORF33

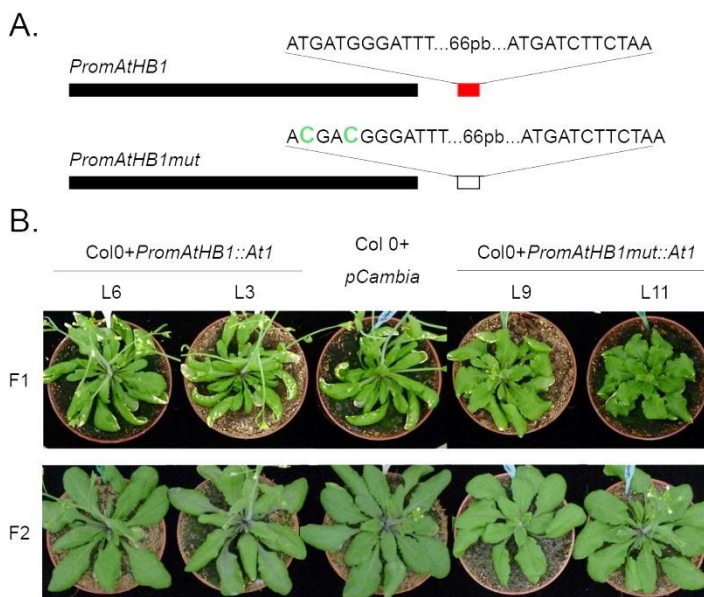
Teniendo en cuenta la alta conservación entre especies del CPuORF33, es lógico pensar que podría estar cumpliendo un papel regulatorio muy importante en el control de la expresión de *AtHBI* y sus genes homólogos. Para confirmar esta hipótesis se generaron las construcciones descritas en la **Imagen 49.A**, en las que se colocó la región codificante de *AtHBI* bajo el control de un promotor que incluye 1415 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción de *AtHBI*. En un caso se utilizó el 5'UTR nativo (*PromAtHBI:AtHBI*) y en el otro se introdujeron dos mutaciones puntuales (T→C) que eliminaron los dos codones ATG presentes en el inicio del

CPuORF33 (*PromAtHB1mut:AtHB1*). Con estas construcciones (**Imagen 27.A**) se transformaron plantas del genotipo Col-0 para analizar si la expresión de *AtHB1* regulada por un promotor con el CPuORF33 anulado genera fenotipos diferenciales en las plantas.

Como se ve en la **Imagen 49.B**, en la primer filial (F1) de plantas obtenidas, aquellas que poseían la construcción *PromAtHB1:AtHB1* no mostraron un fenotipo diferencial respecto a plantas transformadas con el vector *pCambia* vacío, pero sí se observaron cambios morfológicos muy marcados cuando se transformó con la construcción *PromAtHB1mut:AtHB1*. Estas últimas plantas presentaron hojas con un aserrado muy notorio, silicuas cortas y un retraso marcado de la senescencia, características similares a las observadas en plantas que expresan *AtHB1* en altos niveles (Miguel, 2016).

Curiosamente, la segunda filial (F2) obtenida de plantas *PromAtHB1mut:AtHB1* no presentó el mismo fenotipo que sus progenitoras (**Imagen 49.B**), sino que asemejaban a aquellas que habían sido transformadas con el vector *pCambia* vacío. Por eso se decidió cuantificar los niveles de transcritos de *AtHB1* en estas plantas, lo que nos permitió comprobar que las mismas presentaban niveles de mensajero de *AtHB1* incluso inferiores que las plantas utilizadas como controles.

Imagen 49: La expresión de *AtHB1* está reprimida por el CPuORF33

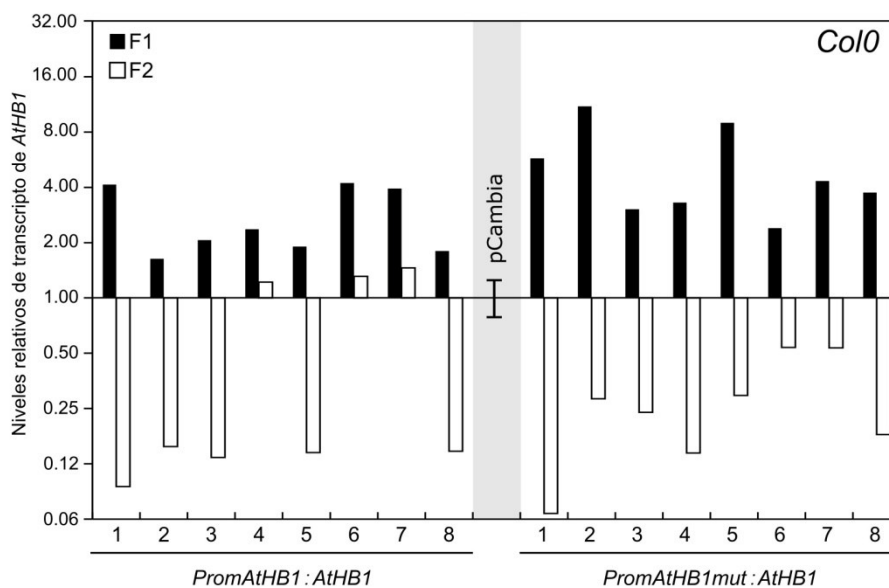


A. Representación esquemática del promotor de *AtHB1* nativo (*PromAtHB1*) y su versión mutada (*PromAtHB1mut*). Se mutaron dos nucleótidos (T→C) localizados en los primeros dos codones del CPuORF33 (señalados en verde). **B.** Fotografía ilustrativa de plantas Col-0 de 30 días de edad transformadas con las construcciones *PromAtHB1:AtHB1* y *PromAtHB1mut:AtHB1* comparadas con plantas control, transformadas con el vector *pCambia* vacío. Se muestran dos líneas independientes de cada genotipo.

Estos resultados, además de trabajos previos hechos en nuestro laboratorio en los cuales *AtHB1* fue expresado en plantas mutantes *rdr6-12*, corroboraron la existencia de un mecanismo de silenciamiento génico que impide expresar *AtHB1* en niveles suficientes para generar cambios fenotípicos significativos en plantas transgénicas (Miguel, 2016). Las plantas mutantes *rdr6-12* presentan una mutación en la ARN polimerasa dependiente de ARN (RDR6) involucrada directamente en disparar la cascada de silenciamiento mediada por *siRNAs* (Peragine y col., 2004).

Para confirmar estas observaciones se obtuvieron nuevas plantas *PromAtHB1:AtHB1* y *PromAtHB1mut:AtHB1* F1 y se cuantificaron los niveles de *AtHB1* en al menos 8 líneas transgénicas independientes. Al igual que la vez anterior, las plantas *PromAtHB1mut:AtHB1* mostraron el fenotipo indicado arriba, mientras que las plantas *PromAtHB1:AtHB1* mostraron un fenotipo normal. Luego, las semillas F2 de estas líneas se seleccionaron utilizando higromicina y se cuantificaron los niveles de mensajeros de *AtHB1* en aquellas plantas resistentes. De acuerdo a lo esperado y según se muestra en la **Imagen 50**, en la F1 se obtienen niveles altos de *AtHB1* que posteriormente son silenciados en la F2, obteniéndose en la mayoría de las líneas niveles inferiores a los observados en una planta salvaje. Estos resultados indicaron que no sólo el transgén es silenciado, sino también el transcripto endógeno. Cabe destacar que el silenciamiento transcripcional se ve tanto en las plantas *PromAtHB1:AtHB1* como en aquellas *PromAtHB1mut:AtHB1*, por lo que este fenómeno es independiente de la presencia del CPuORF33.

Imagen 50: Los transcritos de *AtHB1* se encuentran silenciados en plantas F2 de fondo Col 0.

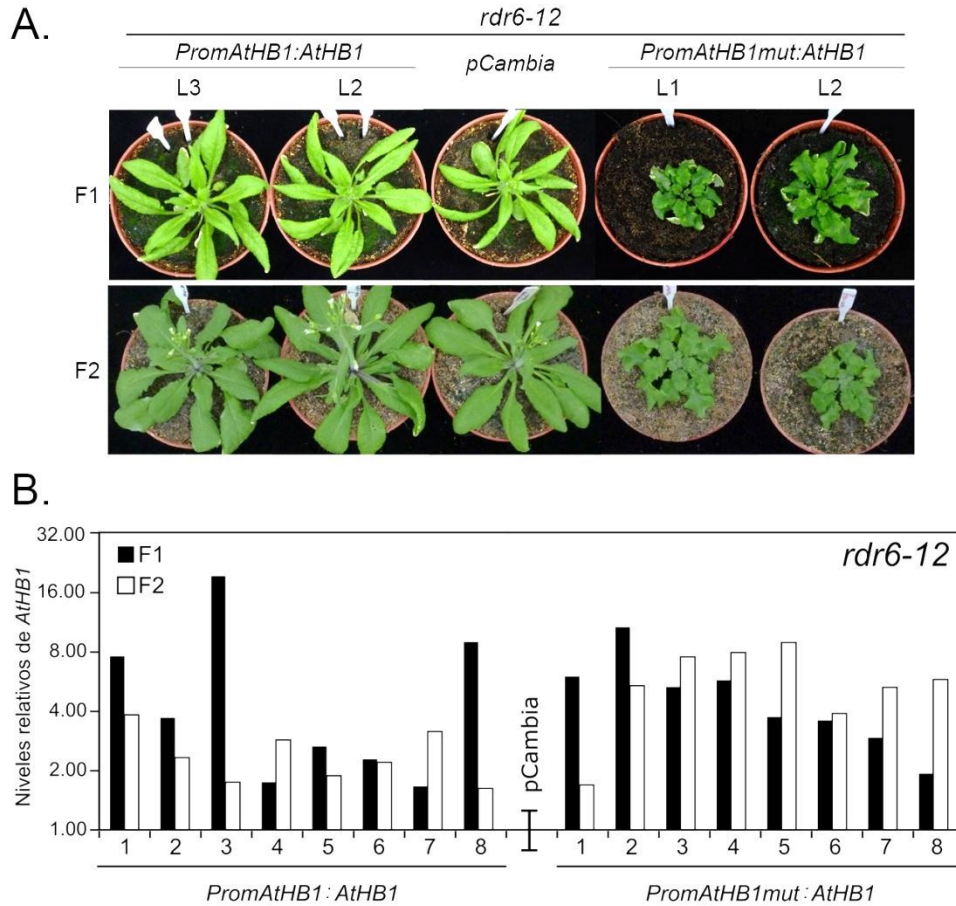


A. Niveles de transcritos de 8 líneas insercionales independientes para las construcciones *PromAtHB1:AtHB1* y *PromAtHB1mut:AtHB1* en fondo Col0. En negro se muestran los niveles de transcritos para plantas de la primer filial (F1) y en blanco los niveles para las mismas líneas en la segunda filial (F2). Para las extracciones se utilizaron hojas de roseta de plantas de 25 días.

El fenómeno de silenciamiento de *AtHB1* encontrado en las plantas Col 0 antes descritas concuerda con lo que se observa cuando existe silenciamiento mediado por ARNs pequeños, que suele dispararse ante la sobreexpresión de un transgén (Graham y col., 2011; Rajeevkumar y col., 2015). Para probar si éste era el caso se decidió transformar con las construcciones *PromAtHB1:AtHB1* y *PromAtHB1mut:AtHB1* plantas mutantes del genotipo *rdr6-12*. En estas plantas este tipo de silenciamiento no puede ocurrir.

Tal como se observa en la **Imagen 51**, en F1 se obtuvieron plantas de hojas normales con la construcción *PromAtHB1:AtHB1* y plantas con hojas aserradas para la construcción *PromAtHB1mut:AtHB1*, fenotipos que se mantuvieron en los individuos de la F2. Las correspondientes mediciones de los niveles de transcritos mostraron que en fondo *rdr6-12* existe sobreexpresión de *AtHB1* tanto en F1 como en F2, independientemente de la construcción utilizada, lo que indica que el silenciamiento visto en las plantas Col 0 está dado por un mecanismo que involucra ARNs pequeños.

Imagen 51: La expresión de *AtHB1* está reprimida por el CPuOFR33 y se silencia si los niveles superan cierto nivel

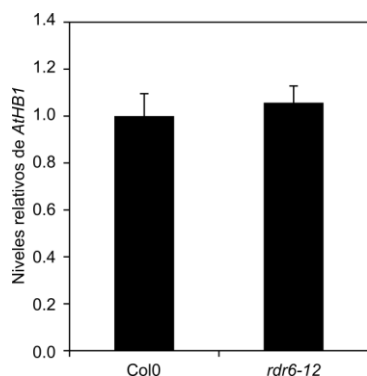


A. Fotografía ilustrativa de plantas *rdr6-12* de 30 días de edad transformadas con las construcciones *PromAtHB1:AtHB1* y *PromAtHB1mut:AtHB1* junto con plantas *rdr6-12* transformadas con el vector *pCambia* vacío. Se muestran dos líneas independientes de cada genotipo.

B. Niveles de transcritos de 8 líneas insercionales independientes para las construcciones *PromAtHB1:AtHB1* y *PromAtHB1mut:AtHB1* en fondo *rdr6-12*. En negro se muestran los niveles de transcritos para plantas de la primer filial (F1) y en blanco los niveles para las mismas líneas en la segunda filial (F2). Para las extracciones se utilizaron hojas de roseta de plantas de 25 días.

Por otra parte también se midió la expresión relativa de *AtHB1* en plantas Col 0 y *rdr6-12* sin transformar. Los niveles de transcritos de *AtHB1* fueron muy similares en ambos genotipos, indicando que el silenciamiento de *AtHB1* mediado por ARNs pequeños sólo se desencadena ante la sobreexpresión del gen (**Imagen 52**), y probablemente esté dado por un Silenciamiento Génico Transcripcional (TGS; del inglés: *Transcriptional Gene Silencing*).

Imagen 52: El silenciamiento transcripcional de *AtHB1* sólo se produce ante la sobreexpresión del mismo

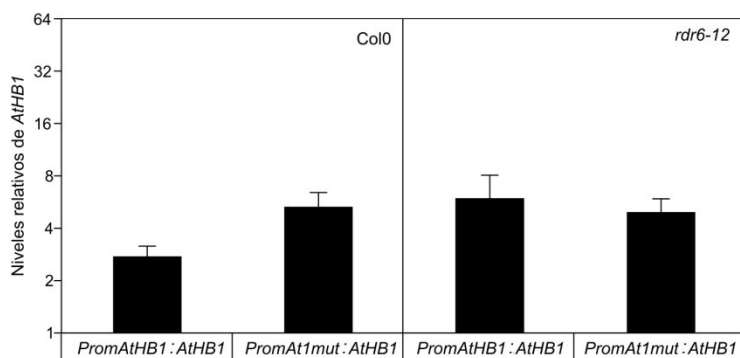


Niveles de transcritos de *AtHB1* en plantas de 15 días Col 0 y *rdr6-12*. Los niveles de transcritos se relativizaron a los de plantas Col 0 aplicando el método $\Delta\Delta Ct$. Los transcritos de actinas (*ACTINA2* y *ACTINA8*) se utilizaron como referencia. Para las extracciones se utilizaron hojas de roseta de plantas de 15 días.

El CPuORF33 reprime la traducción del ORF principal corriente abajo

Teniendo en cuenta que las plantas transformadas con el transgén que tiene el CPuORF33 mutado (*PromAtHB1mut:AtHB1*) mostraron el fenotipo morfológico y de desarrollo de plantas que sobreexpresan *AtHB1* y que cuando se utilizó el CPuORF33 nativo no se observó un fenotipo diferencial, se puede inferir que el uORF estaría reprimiendo los niveles de *AtHB1* en la planta de alguna manera (**Imagen 49****Imagen 51**). Esta represión no estaría ocurriendo a nivel transcripcional, ya que cuando se promediaron los niveles de transcritos de *AtHB1* en las distintas líneas insercionales independientes no se vieron diferencias significativas entre las plantas que tenían el CPuORF33 nativo y las que tenían el mutado (**Imagen 53**).

Imagen 53: El CPuORF33 no regula los niveles de *AtHB1* a nivel transcripcional



Valor promedio de los niveles de transcritos de *AtHB1* en 10 líneas F1 independientes de cada genotipo. Los valores se normalizaron con los obtenidos para plantas Col 0 y *rdr6-12* transformadas con el vector *pCambia* vacío utilizando el método $\Delta\Delta Ct$.

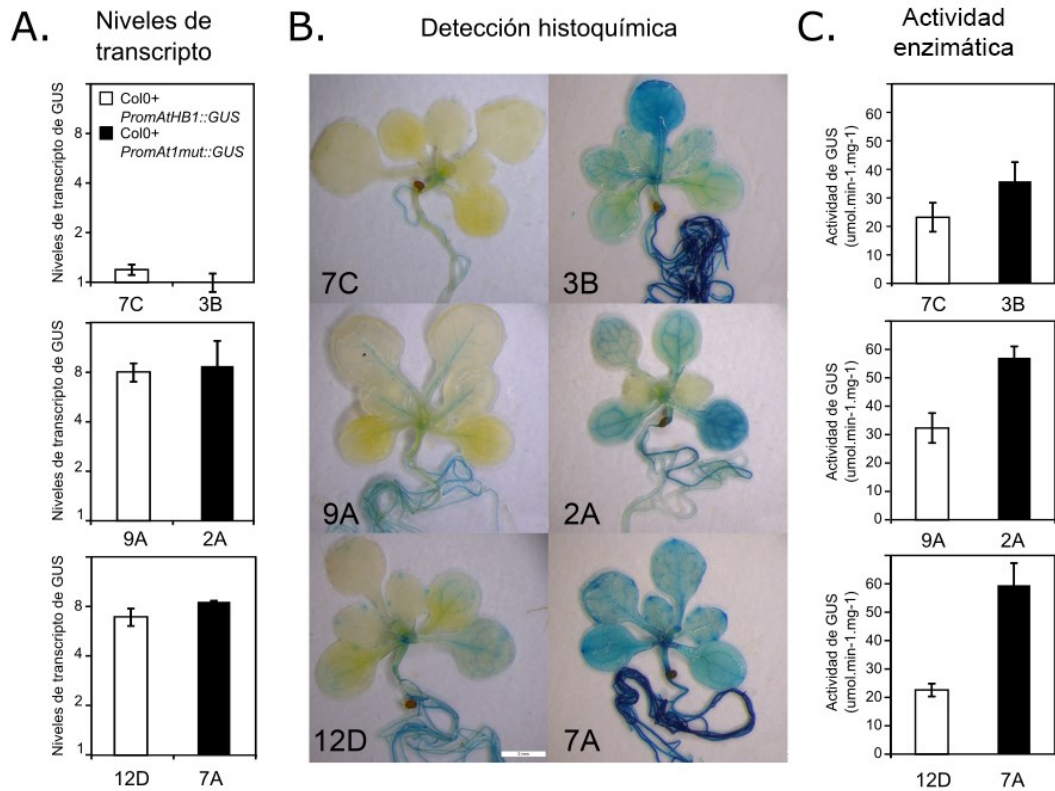
Con esta hipótesis (regulación a nivel distinto del transcripcional) se generaron construcciones génicas en las que se colocó el gen reportero *GUS* bajo el control del

promotor de *AtHB1* en sus versiones nativa y mutada en el uORF, descritas más arriba: *PromAtHB1:GUS* y *PromAtHB1mut:GUS* respectivamente. Con estos vectores se transformaron plantas de los genotipos Col 0 y *rdr6-12* y se obtuvieron individuos transgénicos homocigotas.

Para poder hacer este análisis, teniendo en cuenta que cada planta transgénica tiene un punto de inserción particular y genera niveles de expresión determinados, se tomaron líneas *PromAtHB1:GUS* y *PromAtHB1mut:GUS* en fondo Col 0 que expresaran en forma similar los transcritos correspondientes al reportero *GUS* en plántulas de 15 días. Luego se agruparon en pares formados por una línea de cada genotipo (*PromAtHB1:GUS* y *PromAtHB1mut:GUS*), con niveles similares de transcritos de *GUS*. Con estos pares agrupados, se realizaron ensayos de histoquímica en plántulas de 15 días que indicaron que la expresión de *GUS* en las plantas *PromAtHB1mut:GUS* era notoriamente mayor que la observada en la línea par correspondiente *PromAtHB1:GUS* (**Imagen 54**). Además, en las plántulas *PromAtHB1:GUS* se detectó una débil expresión del reportero en los hipocotilos, en el tejido vascular de las raíces y hojas, mientras que para las plántulas *PromAtHB1mut:GUS* el reportero se detectó con mayor intensidad en esos tejidos y se observó adicionalmente en la lámina de las hojas.

Estas observaciones nos indujeron a cuantificar la actividad *GUS* mediante fluorimetría en las líneas de interés. Para ello se crecieron las líneas indicadas en placa durante quince días para luego extraerles las proteínas totales y analizarlas mediante fluorimetría. En forma consistente con lo observado por histoquímica, este análisis mostró que los niveles proteicos de *GUS* fueron mayores en las líneas que poseían el CPuORF33 mutado (**Imagen 54C**).

Imagen 54: Las plantas *PromAtHB1mut:GUS* muestran un aumento significativo de la proteína GUS comparadas con las plantas *PromAtHB1:GUS*

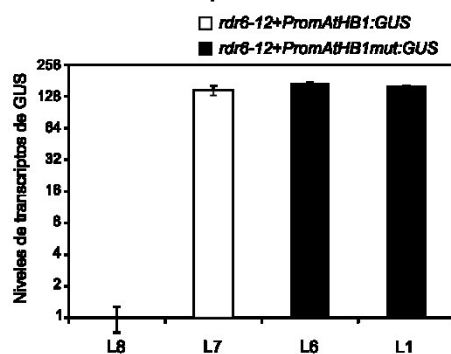


A. Niveles de transcritpos de *GUS* en plantas Col 0 de 15 días transformadas con las construcciones *PromAtHB1:GUS* o *PromAtHB1mut:GUS*. Se muestran tres líneas insercionales diferentes para cada construcción, agrupadas en pares según los niveles de transcritpos detectados. La medición se realizó mediante RT-qPCR y los valores se normalizaron con el menor valor absoluto obtenido utilizando el método $\Delta\Delta Ct$. **B.** Expresión de *GUS* analizada mediante detección histoquímica en plantas de 15 días de los genotipos señalados. Barra: 2 mm **C.** Actividad enzimática de *GUS* medida mediante fluorimetría en extractos proteicos de las plantas mostradas en **A.**

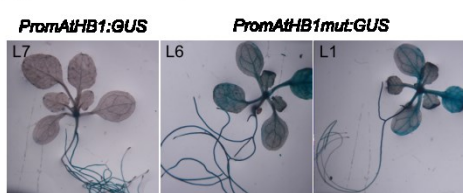
Paralelamente se transformaron plantas del genotipo mutante *rdr6-12* con las mismas construcciones (*PromAtHB1:GUS* y *PromAtHB1mut:GUS*) y se obtuvieron resultados similares a los descritos para las plantas de fondo Col 0 (**Imagen 55**), indicando que la regulación de la traducción ejercida por el CPuORF33 es independiente de la maquinaria de silenciamiento por ARN pequeños.

Imagen 55: La regulación de la traducción ejercida por el CPuORF33 no es dependiente de ARNs pequeños

A. Niveles de transcritos



B. Detección histoquímica de la actividad de GUS



A. Niveles de transcritos de *GUS* en plantas de 14 días de fondo *rdr6-12* transformadas con las construcciones *PromAtHB1:GUS* o *PromAtHB1mut:GUS*. Se muestran tres líneas insercionales, agrupadas según los niveles de transcritos detectados. La medición se realizó mediante RT-qPCR y los valores se normalizaron con el menor valor absoluto obtenido utilizando el método $\Delta\Delta Ct$. **B.** Expresión de *GUS* analizada mediante detección histoquímica de la actividad en plantas de 14 días de los genotipos señalados.

Este conjunto de resultados demostró que la regulación ejercida por el CPuORF33 se produce a nivel traduccional y en forma independiente del mORF que se encuentre corriente abajo del CPuORF33.

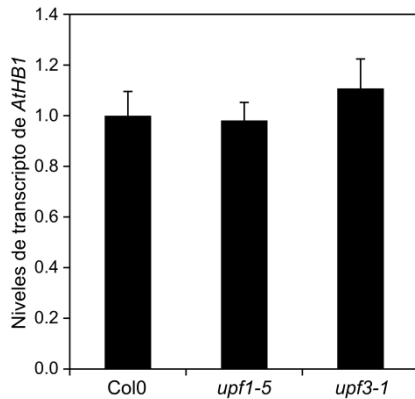
El CPuORF33 reprime la traducción del ORF principal mediante un mecanismo de trabado del ribosoma

Considerando que los uORFs pueden controlar la traducción a través de diferentes mecanismos como el decaimiento mediado por ARNm sin sentido (NMD; del inglés *Nonsense-Mediated Decay*), el trabado del ribosoma “*ribosome stalling*” y otros (Somers y col., 2013), nos propusimos analizar cuál de ellos se pone en juego en la regulación ejercida por el CPuORF33 sobre *AtHB1*.

Habiendo determinado que la regulación se estaba produciendo a nivel traduccional, el mecanismo NMD era muy improbable. Para corroborar esta hipótesis, se obtuvieron dos líneas mutantes insercionales en los genes *UPF1* y *UPF3* (llamadas *upf1-5* y *upf3-1*), que codifican proteínas que participan en el NMD. Una vez obtenidas, se las germinó en día largo durante quince días y se cuantificó la expresión de *AtHB1* por RT-PCR en tiempo real. Como se muestra en la **Imagen 56**, ambas líneas mutantes presentaron niveles de expresión de *AtHB1* semejantes a los medidos en las plantas

salvajes, corroborando que este mecanismo no es el que se pone en juego para la regulación de *AtHB1* por el CPuORF33.

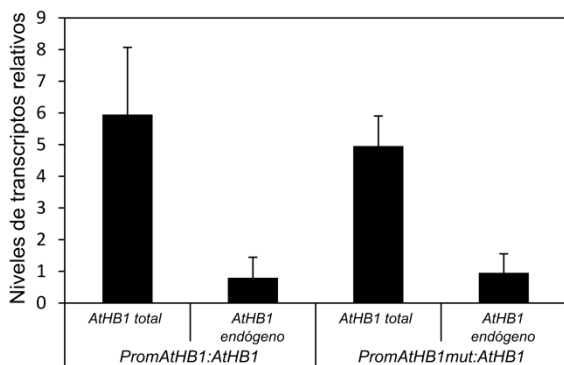
Imagen 56: El CPuORF33 no actúa mediante el mecanismo de NMD



Niveles de transcritos de *AtHB1* en plantas Col0, *upf1-5* y *upf3-1* de 14 días. Los valores se normalizaron respecto al valor obtenido en plantas Col 0 utilizando el método $\Delta\Delta Ct$.

Teniendo en cuenta que el NMD actúa en *trans*, se cuantificaron los mensajeros endógenos de *AtHB1* en las plantas *PromAtHB1:AtHB1* y *PromAtHB1mut:AtHB1* en fondo *rdr6-12*. El objetivo de este experimento fue el de medir la acción del uORF independientemente del silenciamiento desencadenado por la sobreexpresión. Para poder medir los niveles de *AtHB1* endógeno se recurrió a la técnica de RT-PCR en tiempo real utilizando cebadores que hibridan en la región 3'UTR de *AtHB1*, la cual no está presente en el transgén introducido. Como se ve en la **Imagen 57**, los niveles de *AtHB1* endógeno no difirieron entre los distintos genotipos, indicando que el CPuORF33 no es capaz de actuar en *trans* sobre los mensajeros de *AtHB1*, descartando totalmente la acción del mecanismo NMD.

Imagen 57: Los niveles endógenos de transcritos de *AtHB1* no se ven modificados por la acción del CPuORF33 transgénico



Niveles de transcritos de *AtHB1* en plantas *rdr6-12* transformadas con las construcciones *PromAtHB1:AtHB1* o *PromAtHB1mut:AtHB1*. El ensayo se realizó utilizando tres líneas independientes de cada genotipo. Los niveles de transcritos totales de *AtHB1* se obtuvieron utilizando oligonucleótidos que anillan en la región codificante de *AtHB1*, mientras que los niveles endógenos de *AtHB1* se midieron utilizando oligonucleótidos que anillan en la región 3'UTR del gen. Todos los valores se normalizaron con los obtenidos para plantas *rdr6-12* transformadas con el vector *pCambia* utilizando el método $\Delta\Delta Ct$.

Una vez descartado el NMD como mecanismo de regulación del uORF, el siguiente modo de acción analizado fue el de trabado del ribosoma (“*Ribosome stalling*”). Juntawong y colaboradores realizaron un mapeo de las huellas de ribosomas (“*Ribosome footprinting*”) en ARNs mensajeros cuyos datos son de libre acceso y nos permiten analizar si el CPuORF33 es traducido y si los ribosomas se encuentran “trabados” en esta región (Juntawong y col., 2014).

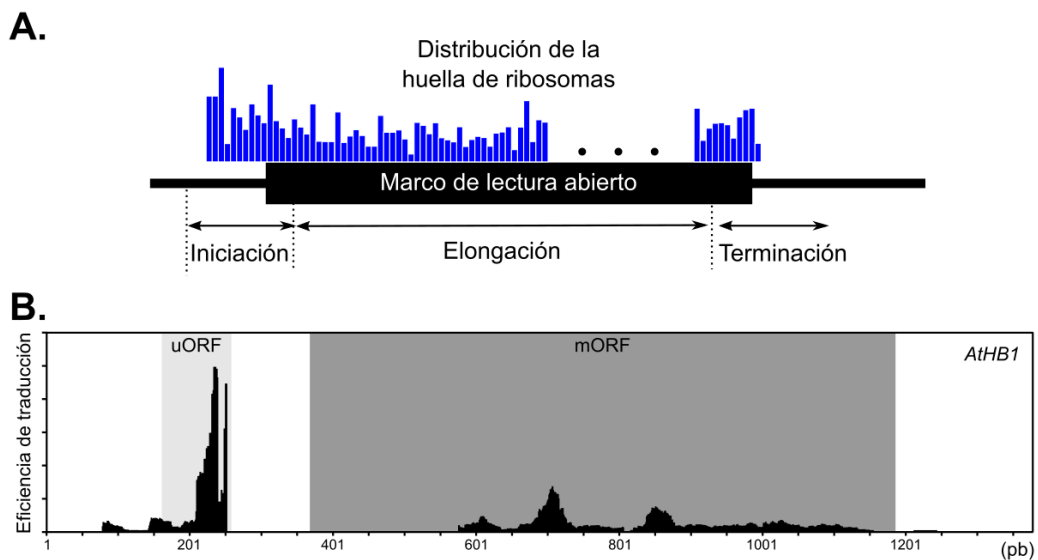
El mapeo de huellas de ribosomas es un estudio cuantitativo que encuentra las regiones de los ARNs mensajeros susceptibles de ser protegidas de la digestión con nucleasas por los ribosomas. En un tejido vegetal tratado con cicloheximida, los ribosomas cubren regiones de aproximadamente ~28 nucleótidos (Ingolia y col., 2009). Para realizar un estudio de huellas de ribosomas en primer lugar se purifican los complejos polisomales (ARNs mensajeros y ribosomas) mediante inmunoprecipitación o centrifugación en gradiente de sacarosa, luego se digieren estos complejos utilizando nucleasas para obtener los fragmentos de 30 nucleótidos protegidos por los ribosomas que posteriormente se secuencian mediante técnicas de secuenciación masiva. El número de secuencias que mapean en un determinado ARN mensajero se compara con la abundancia total de ese transcripto (obtenida mediante secuenciación de ARNs totales, sin purificación de los ribosomas) para determinar la eficiencia de traducción de ese mensajero. Esto mismo puede realizarse en regiones de un transcripto para conocer qué secuencias son traducidas efectivamente (Juntawong y col., 2014; Merchante y col., 2015).

Para conseguir un mapa detallado de la posición de los ribosomas sobre el mensajero de *AtHBI* se tomaron las lecturas de RNAseq obtenidas por Merchante y colaboradores y por Juntawong y colaboradores para plántulas no estresadas de diferentes edades y se obtuvo la cobertura del mensajero de *AtHBI* en cada caso. En la **Imagen 58.B** se muestran los resultados generados para uno de estos conjuntos de datos, ya que en ambos casos se obtuvieron perfiles similares. En el gráfico se aprecia claramente que el uORF presenta una mayor densidad de ocupación que el mORF y que las restantes regiones del 5'UTR. Además es notorio cómo la región codificante de *AtHBI* está muy poco ocupada por ribosomas, y por lo tanto prácticamente no es traducida, mientras que sí se traduce el CPuORF33.

En la **Imagen 58.A** se muestra también cómo es la distribución habitual de ribosomas sobre un marco de lectura abierto específico, con un número mayor de

ribosomas cercanos al codón de inicio de la transcripción y una distribución uniforme de los mismos en el resto del transcripto. En el caso del CPuORF33, la huella de ribosomas no respeta lo esperado, muestra un pico de ocupación en la porción final del ORF y ninguna de las lecturas llega a cubrir el final de la secuencia. Esto da indicio de que existe un trabado de los ribosomas en el CPuORF33 mientras se produce la traducción.

Imagen 58: Análisis de “Huella del ribosoma” muestran que podría existir “trabado del ribosoma” al final del CPuORF33



Cobertura de polisomas en el gen *AtHB1*. **A.** Esquema mostrando la distribución normal de la huella de ribosomas sobre un marco de lectura abierto. (Adaptado de Hu y col., 2016) **B.** Cobertura de polisomas en el transcripto de *AtHB1* utilizando las secuencias completas de los fragmentos de 30 nucleótidos obtenidos mediante centrifugación en gradiente de sacarosa (Merchante y col., 2015). Gris claro: CPuORF33; gris oscuro: mORF; blanco: UTRs.

Mientras un péptido está siendo sintetizado, pasa a través del túnel presente en la subunidad mayor del ribosoma. La interacción entre la cadena polipeptídica nascente y el túnel ribosomal puede regular la velocidad de traducción e incluso impedir la misma para regular la expresión proteica. El túnel ribosomal cubre aproximadamente 30 aminoácidos extendidos, pero sus dimensiones permiten que se formen algunas estructuras secundarias como α -hélices compactas, o dominios de tipo dedo de zinc (Wilson y col., 2016). Ciertas proteínas poseen secuencias específicas de aminoácidos que interaccionan con distintos componentes del túnel ribosomal y bloquean la

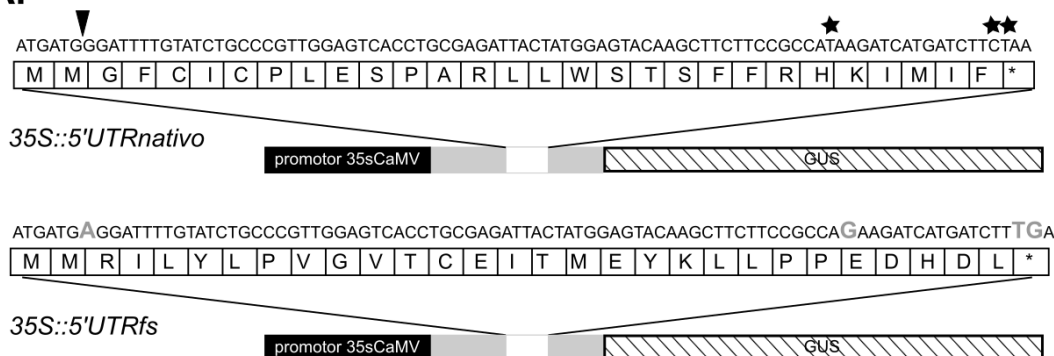
continuación de su propia traducción. En algunos casos, este proceso está regulado por moléculas pequeñas o factores ambientales.

Para saber si el CPuORF33 regula la traducción del ORF corriente abajo mediante este mecanismo, se realizaron las construcciones mostradas en la **Imagen 59**, en la que el 5'UTR de *AtHBI* se colocó corriente abajo de un promotor constitutivo 35S y corriente arriba del gen reportero *GUS*. Se generaron dos versiones de esta construcción, una utilizando el 5'UTR nativo de *AtHBI* (*35S:5'UTRnativo*) y en la otra se realizó una inserción luego del segundo codón ATG del uORF y tres mutaciones puntuales para evitar la formación de codones de parada prematuros e insertar un codón de parada en el triplete número 30 (*35S:5'UTRfs*). Las mutaciones insertadas generarían un cambio en el marco de lectura del uORF, obteniéndose una secuencia aminoacídica muy diferente de la original sin alterar notablemente la secuencia nucleotídica del 5'UTR. Esto permite evaluar si la secuencia de aminoácidos del péptido codificado en el uORF es importante para su accionar regulatorio.

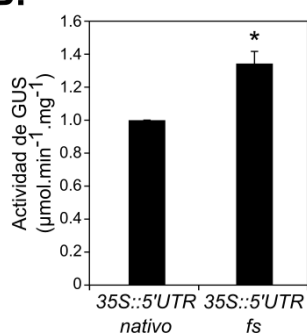
En primer lugar se transformaron de forma transitoria hojas de tabaco y se analizó la actividad de *GUS* mediante fluorometría. Los resultados obtenidos se ilustran en la **Imagen 59.B**, en la que se ve que, al cambiar el marco de lectura del uORF la actividad del gen reportero aumenta.

Imagen 59: La secuencia de aminoácidos del CPuORF33 es importante para su acción

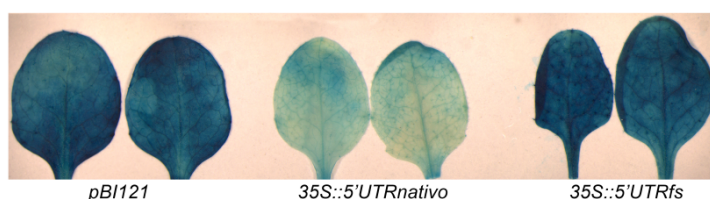
A.



B.



C.



A. Representación esquemática de las construcciones generadas para investigar si el CPuORF33 actúa mediante trabado del ribosoma. Se muestran las secuencias nucleotídicas y aminoácidas obtenidas para el uORF en casa caso. Negro: promotor del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor. Gris: 5'UTR de AtHB. Blanco: CPuORF33. Rayado: GUS. Estrellas: mutaciones puntuales introducidas mediante PCR. Flecha: mutación insercional introducida mediante PCR. B. Actividad de GUS evaluada mediante fluorometría en extractos proteicos de hojas de tabaco transformadas con las construcciones indicadas. Asterico: $p < 0,05$. C. Expresión de GUS analizada mediante detección histoquímica de la actividad de GUS en plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas de forma estable. Las hojas mostradas corresponden a plantas de 14 días de los genotipos señalados.

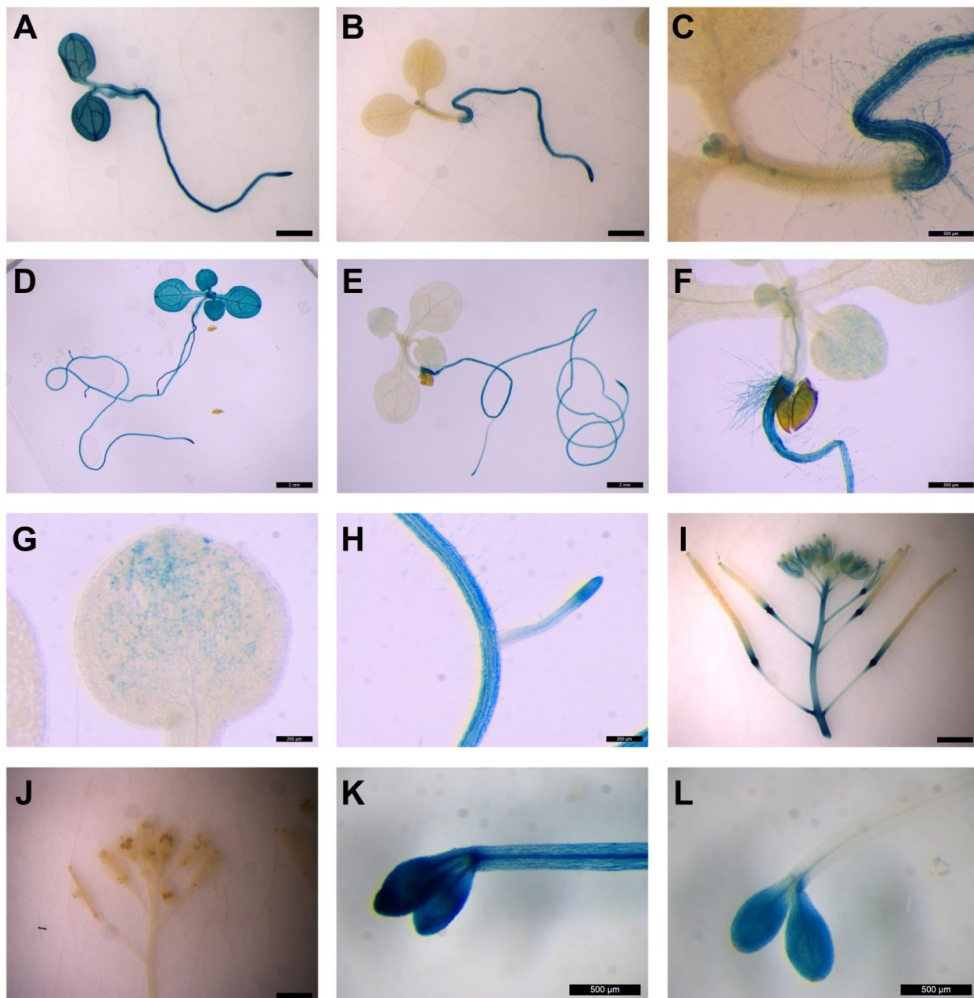
Por otro lado también se transformaron con esas construcciones plantas Col 0 y se analizó el patrón de expresión obtenido mediante histoquímica. En la **Imagen 59.C** se muestra la expresión del reportero en hojas de plantas de 15 días para cada una de las construcciones. Como control se utilizaron hojas de plántulas transformadas con el vector *pBI121* de 15 días.

Estos resultados demostraron que la secuencia de aminoácidos y no la de nucleótidos del CPuORF33 es importante para el accionar regulatorio, algo propio de una regulación mediada por trabado del ribosoma.

El CPuORF33 tiene un accionar tejido-específico en *Arabidopsis thaliana*

Posteriormente nos preguntamos si el CPuORF33 era activo en toda la planta, o si éste sólo actuaba en tejidos u órganos específicos. Para ello se tomaron las líneas *35S:5'UTRnativo* y se analizó el patrón de expresión espacio-temporal de GUS mediante histoquímica. Nuestra hipótesis fue que si el CPuORF33 se encuentra activo no se visualizaría actividad GUS. Como controles se utilizaron plantas transformadas con el vector *pBI121* vacío. Los resultados obtenidos muestran que, en términos generales, el CPuORF33 sólo es activo en los tejidos aéreos de la planta, con excepción de algunos puntos específicos del meristema, y que no es capaz de reprimir la expresión del gen corriente abajo en raíces (**Imagen 60**).

Imagen 60: La represión de la expresión por parte del CPuORF33 depende del tejido y las condiciones ambientales.



Patrón de expresión de GUS en plantas *35S:5'UTRnativo:GUS* de distintas edades comparadas con plantas transformadas con el vector *pBII21* vacío. **A.** Plántula de 5 días transformada con el vector *pBII21* y crecida en condiciones de día largo. **B.** Plántula de 5 días transformada con la construcción *35S:5'UTRnativo:GUS* y crecida en condiciones de día largo. **C.** Detalle del hipocotilo de la plántula mostrada en B. **D.** Plántula *pBII21* de 10 días crecida en condiciones de día largo. **E.** Plántula *35S:5'UTRnativo:GUS* de 10 días crecida en condiciones de día largo. **F.** Detalle del hipocotilo de la plántula mostrada en E. **G.** Detalle de la hoja de la plántula mostrada en E. **H.** Detalle de la raíz en E. **I.** Inflorescencia de planta transformada con *pBII21*. **J.** Inflorescencia de planta transformada con *35S:5'UTRnativo:GUS*. **K.** Cotiledones de plántulas *pBII21* de 6 días crecidas en oscuridad. **L.** Cotiledones de plántulas *35S:5'UTRnativo:GUS* de 6 días crecidas en oscuridad.

Un análisis más detallado de los ensayos anteriores muestra que en algunas zonas de las hojas en desarrollo la represión mediada por el CPuORF33 es débil, principalmente en el ápice de las hojas cuando están tienen ~1 mm de largo (**Imagen 60.A y C**) y en la lámina, en la zona cercana al ápice cuando las hojas son mayores pero aún se encuentran en desarrollo (**Imagen 60.D y G**). En raíces, el CPuORF33 parece ser inactivo, excepto en las raíces laterales, en la zona cercana a la raíz principal (**Imagen 60.H**). En inflorescencias de plantas adultas, la acción represora del CPuORF33 es total (**Imagen 60.I y J**).

Las mismas plantas fueron sometidas a diversos tratamientos con el fin de conocer qué condiciones ambientales, tratamientos y hormonas influyen en la acción del CPuORF33. Para ello las plantas se crecieron en placas de MS 0,5 x y en MS 0,5 x suplementado con GA 5 μ M, ACC 5 μ M, BAP 5 μ M, IAA 5 μ M y sacarosa 1 % y en condiciones de fotoperíodo de día largo durante 6 días, para luego realizar análisis histoquímicos. Ninguno de esos tratamientos generó un patrón de expresión diferente del mostrado en condiciones control. Además, un grupo de plántulas se dejó crecer en oscuridad total durante 6 días. Curiosamente, en esta condición los cotiledones mostraron actividad de GUS, algo que no ocurrió cuando las plantas crecen en condiciones de día largo (**Imagen 60.K y L**). Esto, sumado a lo observado en condiciones normales, sugiere que la represión ejercida por el CPuORF33 se produce solamente en tejidos expuestos a la luz, y no ocurre en tejidos que crecen en oscuridad. Serán necesarios análisis ulteriores para determinar qué mecanismo es el que regula la actividad del CPuORF33. Una hipótesis posible es que en los tejidos crecidos en oscuridad ocurra algún tipo de “*splicing*” alternativo que elimine el CPuORF33 de la región 5'UTR que lo contiene. Sin embargo, un análisis preliminar de los transcritos de *AtHBI* en raíces, tanto *in silico* como experimental, no reveló la existencia de mensajeros de distinto tamaño, observación que hace descartar la hipótesis.

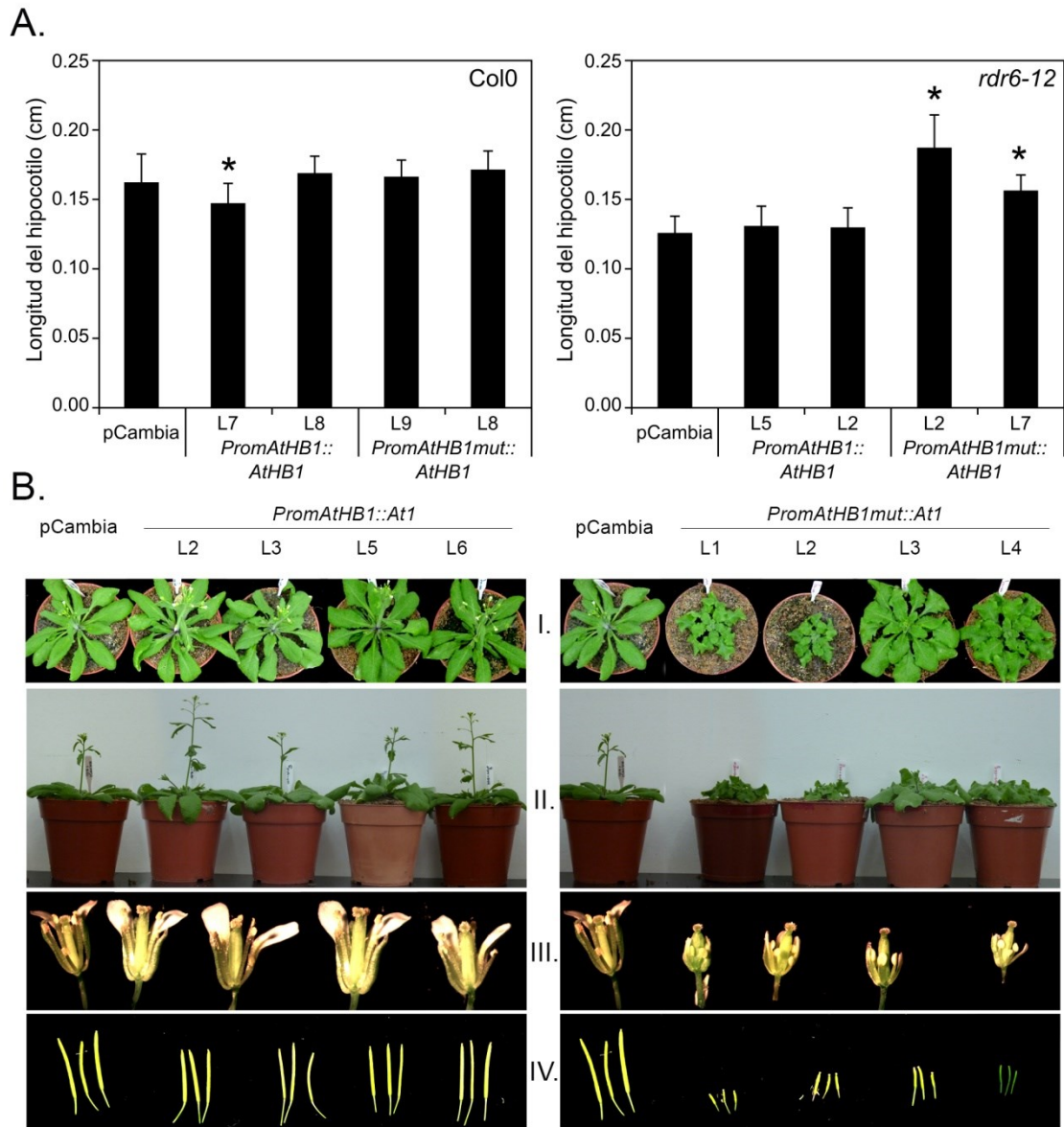
La sobreexpresión de AtHB1 es perjudicial para la reproducción de la planta.

Teniendo en cuenta todo lo descrito hasta acá, resulta curioso que la expresión de *AtHB1* esté tan regulada. Por un lado, el Silenciamiento Transcripcional de Genes (TGS; del inglés: *Transcriptional Gene Silencing*) actúa cuando se quiere sobreexpresar el gen y por otro, el trabado del ribosoma mediado por el CPuORF33 se pone en juego en forma natural. Por eso nos propusimos comprender cuál sería el fundamento biológico de que esto suceda y para ello decidimos analizar en profundidad el fenotipo de plantas en las cuales la sobreexpresión de *AtHB1* no está impedida (*PromAtHB1mut:AtHB1* en fondo *rdr6-12*), comparando con plantas del mismo fondo transformadas con el vector *pCambia* vacío.

Dado que ya fue informado que *AtHB1* modula la elongación de los hipocotilos (Capella y col., 2015b), se analizó la longitud de los hipocotilos en las plantas *PromAtHB1:AtHB1* y *PromAtHB1mut:AtHB1* en fondo *rdr6-12*. De acuerdo a lo esperado, las plántulas *PromAtHB1mut:AtHB1* mostraron hipocotilos de mayor longitud que las plantas control y que aquellas transformadas con la construcción que posee el 5'UTR nativo (**Imagen 61 A**), indicando que hay una alta cantidad de proteína *AtHB1* en estas plantas.

Posteriormente se efectuó un análisis de estas plantas crecidas en macetas. Estos ensayos permitieron observar que las plantas transformadas con *PromAtHB1mut:AtHB1* presentan durante el estadio vegetativo rosetas más compactas y hojas con un fuerte aserrado (**Imagen 61 B.I**). Estas plantas mostraron además, un marcado retraso del momento del pasaje al estadio reproductivo (**Imagen 61 B.II**). Sin embargo, la observación más llamativa fue la anatomía de las flores, que presentaron pistilos de tamaño reducido y anteras extremadamente cortas y no dehiscentes, razón de la posterior aparición de silicuas pequeñas, con muy pocas o ninguna semilla en su interior (**Imagen 61 B.III y IV**). Incluso en algunas de las líneas F1 obtenidas fue imposible analizar la siguiente generación ya que no se obtuvo ninguna semilla. Esto en cierta forma podría explicar la gran regulación existente ante la sobreexpresión de *AtHB1*, ya que la misma sería perjudicial para el mantenimiento de la especie.

Imagen 61: El fenotipo de plantas *rdr6-12* transformadas con la construcción *PromAtHB1mut:AtHB1* se asemeja al de plantas sobreexpresantes de *AtHB1* y causa esterilidad

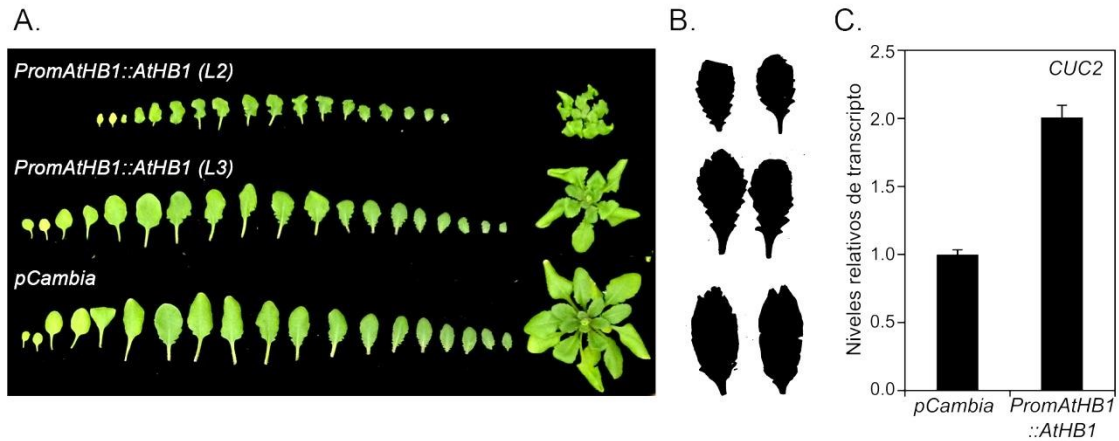


A. Longitud de los hipocotilos de plantas Col0 y *rdr6-12* transformadas con las construcciones indicadas y crecidas bajo régimen lumínico de día corto durante 5 días. Para cada genotipo se muestran dos líneas independientes. **B.** Fotografías ilustrativas de plantas *rdr6-12* transformadas con las construcciones señaladas. I. Rosetas de plantas de 25 días. II. Detalle de la vara floral en las plantas mostradas en I. III. Flores de plantas de 45 días. IV. Silicuas de plantas de 45 días.

Al igual que en plantas *35S:AtHB1* en fondo *rdr6-12*, el aserrado de las plantas *PromAtHB1mut:AtHB1* se debe probablemente a la sobreexpresión de *CUC2*, proteína que participa en la formación del aserrado de las hojas de *Arabidopsis thaliana* (Nikovics y col., 2006) a través de un aumento de la división celular en los dientes de las hojas (Kawamura y col., 2010). En la **Imagen 62** se muestra un detalle del aserrado

observado en estas plantas, junto con los niveles de transcritos de *CUC2* obtenidos en las mismas.

Imagen 62: El aserrado de las plantas *PromAtHB1mut:AtHB1* está causado por un aumento en los niveles de *CUC2*



A. Serie de hojas de las plantas indicadas, mostrando el mayor aserrado de las plantas *PromAtHB1mut:AtHB1*. A la derecha se observa una fotografía de las rosetas completas. En todos los casos las plantas están en fondo *rdr6-12*. **B.** Imágenes obtenidas al escanear las hojas 10 y 11 de las plantas mostradas en A. **C.** Niveles de transcritos de *CUC2* en los genotipos indicados.

Discusión

A lo largo de la evolución los organismos modificaron sus genomas en pos de la supervivencia de la especie. Así, algunos elementos genéticos se perdieron, mientras que otros se conservaron de acuerdo a su importancia para el desarrollo y la reproducción. En este capítulo mostramos que el CPuORF33 es uno de los elementos genéticos de plantas que se conservó durante la evolución.

A pesar de que los uORFs se encuentran en un gran porcentaje de ARNs mensajeros (Hayden y col., 2008; Nagalakshmi y col., 2008; Calvo y col., 2009), sólo un pequeño porcentaje de los mismos está conservado entre especies y en muy pocos casos se pudo demostrar la funcionalidad de estos elementos. En este trabajo mostramos que el CPuORF33 regula negativamente la traducción de AtHB1 en distintos estadios de la planta, y existen razones para pensar que esto se extendería a otras especies. En primer lugar, la alta conservación del CPuORF33 a lo largo de la evolución. Este elemento se encontró en genes homólogos de *AtHB1* de 43 especies diferentes, abarcando tanto plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas. En todos los casos en que se contaba con la secuencia 5'UTR de los genes se pudo identificar uORFs en esta región del transcripto. Lamentablemente, para muchas especies no se cuenta con esta información, por lo que sería interesante repetir este análisis en un futuro.

Si bien en este estudio sólo se caracterizó el CPuORF33 de *Arabidopsis thaliana*, los resultados obtenidos junto con la alta conservación de las características estructurales del CPuORF33 en otras especies vegetales, sugieren que su función y mecanismo de acción estaría conservado. Tal como se demostró en el trabajo, es la secuencia aminoacídica y no la nucleotídica del uORF de *Arabidopsis* lo que es fundamental para su accionar regulatorio y justamente ésta es una de las propiedades más conservadas entre las distintas especies. Otra característica compartida entre especies es que el uORF en ningún caso se solapa con el mORF; lo que podría ser importante para permitir, en los tejidos y condiciones necesarias, la reiniciación de los ribosomas y que el ORF principal se traduzca a pesar del fuerte efecto represor ejercido por el uORF. El solapado entre el CPuORF y el mORF se describió anteriormente asociado a NMD, regulando los niveles de transcriptos de numerosos genes relacionados con el desarrollo de la planta, lo que incluye FTs, factores de procesamiento de ARN y genes de respuesta a estrés (Kalyna y col., 2011). La tercera característica conservada entre especies es la longitud del uORF, propiedad que difiere

notoriamente entre especies monocotiledóneas y dicotiledóneas; sería interesante en un futuro poder evaluar el aporte de esta diferencia al accionar regulatorio en uno y otro tipo de planta.

Existen informes de distintos mecanismos de acción para el control regulatorio que ejerce un uORF. Puntualmente para plantas se han descrito casos en los que el uORF actúa regulando los niveles de transcripto, ya sea desencadenando NMD (Imai y col., 2006; Saul y col., 2009) o de otras maneras (Bender y Fink, 1998; Combier y col., 2008); y también casos en los que el uORF regula la traducción del ARN mensajero, ya sea mediante trabado del ribosoma (Wiese y col., 2004; Rahmani y col., 2009; Alatorre-Cobos y col., 2012), regulación de la reiniciación (Wang y Wessler, 1998), combinaciones de mecanismos (Hanfrey y col., 2005) o mecanismos desconocidos (Kwak y Lee, 2001). Por ejemplo, el mecanismo de silenciamiento por NMD es el que actúa en la regulación de AdoMetDC1, de SAC51, un FTs de tipo bHLH, y de AtMHX, que codifica para un intercambiador de cationes de la vacuola (Bender y Fink, 1998; Imai y col., 2006; Combier y col., 2008; Saul y col., 2009; Uchiyama-Kadokura y col., 2014). En la mayoría de los casos el uORF actúa de forma independiente a su secuencia (Calvo y col., 2009), pero algunos uORF tienen mecanismos de acción dependientes de su secuencia (Ito y col., 2013; von Armin y col., 2014).

En este capítulo se muestra mediante diferentes ensayos como el CPuORF33 de *AtHB1* reprime la traducción del mORF que se encuentre corriente abajo sin importar su naturaleza, que su accionar es sólo en *cis* y que la secuencia aminoacídica es la característica necesaria para su función regulatoria, lo cual sugiere en conjunto que el CPuORF33 actúa mediante el trabado del ribosoma.

En el trabado del ribosoma, la interacción entre el polipéptido que se está sintetizando y el túnel ribosomal puede regular la tasa de traducción de la proteína. El túnel ribosomal tiene un tamaño tal que permite la formación de estructuras secundarias tales como α -hélices o motivos dedos de zinc, y estas estructuras dentro del péptido naciente pueden participar en el trabado del ribosoma. En algunos casos, la formación de estas interacciones está regulada por moléculas pequeñas y factores medioambientales (Nilsson y col., 2015), tales como PCho (fosfocolina) o sacarosa (Rahmani y col., 2009; Alatorre-Cobos y col., 2012). Sería muy interesante profundizar el análisis acerca de si algún compuesto es capaz de modificar el accionar regulatorio del CPuORF33 y en qué condiciones lo hace. De todas maneras, si una molécula no identificada fuera necesaria para regular la represión traduccional de *AtHB1*, esta se


encuentra normalmente presente en hojas y flores, de acuerdo a lo observado utilizando las plantas Col 0 transformadas de forma estable con las construcciones *35S:5'UTRnativo* y *35S:5'UTRfs*, que al contar con un promotor constitutivo, hacen que el análisis sea independiente de la regulación transcripcional que ejerce el promotor natural. Más aún, en vista de la regulación tejido-específica que ejerce el CPuORF33, puede especularse que tal molécula regulatoria, que incluso puede ser una proteína, no se encuentra presente en raíces, meristema apical y sistema vascular de los cotiledones.

En un trabajo reciente, Ebina y colaboradores (2014) identificaron 16 nuevos uORFs en los cuales los aminoácidos localizados en la región carboxilo terminal son cruciales para la acción represora. La región carboxilo terminal del CPuORF33 se modificó mediante dos mutaciones puntuales, una localizada en el aminoácido 24 (H→Q) y la segunda elimina el codón de stop, lo que agrega 30 aminoácidos, para probar la funcionalidad. Sin embargo, cuando esta construcción se colocó corriente abajo del promotor 35S y dirigiendo la expresión del gen reportero *GUS* en plantas (*35S:5'UTRmut:GUS*) no se observaron diferencias con respecto a las plantas *35S:5'UTRnativo:GUS*, indicando que el CPuORF33 es probablemente un uORF de tipo II (Takahashi y col., 2012), en los cuales la región C-terminal no es la más importante para su accionar.

El segundo mecanismo de silenciamiento actuante sobre *AtHBI* descrito en este trabajo es el silenciamiento génico post-transcripcional, que ocurre sólo ante una sobreexpresión de este FT. En plantas el incremento de los niveles de transcripto de un determinado gen por encima de un umbral específico desencadena el silenciamiento del gen en cuestión (Schubert, 2004). Esto se produce tanto para genes exógenos (transgenes), tales como *GUS*, *GFP* o *SPT*, como para genes endógenos, y el umbral por encima del cual se genera el silenciamiento es particular para cada gen. (Schubert, 2004; Rajeevkumar y col., 2015). Existen dos mecanismos epigenéticos a través de los cuales esto ocurre en plantas, uno es el de silenciamiento transcripcional de genes (TGS; del inglés: *Transcriptional Gene Silencing*), que reprime la expresión de un determinado gen mediante la metilación del ADN que lo codifica, y el otro produce el silenciamiento de un determinado mensajero luego de la formación del mismo, por lo que se conoce como silenciamiento génico postranscripcional (PTGS; del inglés: *Post-Transcriptional Gene Silencing*) (Matzke y col., 2001). El PTGS se establece durante el desarrollo de la planta, se esparce sistémicamente y luego de la meiosis, se reinicia, mientras que el TGS se establece en la meiosis y se hereda a las generaciones posteriores (Vaucheret y

Fagard, 2001). El fenómeno observado en las plantas que sobreexpresan *AtHB1* corresponde a un proceso de TGS, ya que se sólo se aprecia recién a partir de la segunda generación de plantas, pero resulta llamativo que este fenómeno se desencadene ante la sobreexpresión generada por un promotor nativo no ubicuo, debido a que esto se observa generalmente para transgenes que utilizan promotores fuertes y constitutivos. Estos resultados indican que la expresión de *AtHB1* está regulada en pos de impedir la sobreexpresión de este mensajero por encima de un umbral que resulta muy cercano a los niveles basales de *AtHB1*. Cabe destacar que no se observa TGS cuando se transforma con construcciones que no poseen el CDS de *AtHB1*, lo que indica que el silenciamiento está provocado por los niveles de transcritos o de proteínas de *AtHB1*, y no por la influencia directa del promotor.

En conclusión, la fuerte regulación que existe sobre los niveles de transcripción y traducción de *AtHB1* podría tener un origen ancestral, basado en los fenotipos aberrantes y perjudiciales para la supervivencia de la especie que genera la sobreexpresión de este factor de transcripción.



Conclusiones generales

Conclusiones generales

El presente trabajo de Tesis nos permitió caracterizar funcionalmente a dos factores de transcripción de *Arabidopsis thaliana* de la familia HD-Zip I, parálogos entre sí: AtHB13 y AtHB23. En ambos casos se contaba con información parcial acerca de su expresión y función, pero éste es el primer trabajo en el que se realizó una caracterización funcional exhaustiva.

Fue posible determinar que AtHB13 participa en tres eventos del desarrollo vegetal en condiciones normales: la hidratación de los granos de polen, la elongación de la vara floral y el crecimiento de la raíz principal. Por su parte, a pesar de que AtHB23 sólo ha sido involucrado en la elongación de la vara floral, se demostró que es capaz de suplir la función de AtHB13 en la germinación de polen cuando este último está ausente. Serán necesarios más estudios para conocer si AtHB23, al igual que su parólogo, está implicado en el crecimiento de la raíz de la planta.

Otra conclusión importante que se desprende de este trabajo es que existe una fina regulación, si bien no directa, entre AtHB13 y AtHB23 que impide la formación de granos de polen deficiente cuando *AtHB13* no es funcional. Esta regulación es tejido-específica, ya que sólo se observa en las inflorescencias, mientras que en otros tejidos la relación entre AtHB13 y AtHB23 es diferente.

Un análisis de secuenciación masiva de ARN, hecho en plantas *athb13-1* y salvajes, nos permitió también dilucidar parte del mecanismo molecular involucrado en las observaciones fenológicas. Así pudimos saber que la ausencia de *AtHB13* genera la sobreexpresión de algunos genes relacionados con la división celular, probablemente involucrados en la mayor elongación de la vara floral vista en las plantas *athb13-1*. Por otra parte se constató que en estas últimas plantas, numerosos genes codificantes para proteínas de la cubierta del polen se encuentran reprimidos.

Además, en el caso de AtHB13 se pudo probar que tiene como gen blanco directo a *JUB1*, un FT de la familia NAC, y que, si bien esta regulación no está involucrada en los procesos del desarrollo mediados por AtHB13, la misma es importante para generar la tolerancia a sequía descrita en trabajos previos en los que se sobreexpresó *AtHB13*.

Por otro lado, el estudio del marco de lectura abierto corriente arriba (uORF) de la región codificante de *AtHB1* permitió explicar una de las formas de regulación que ocurren sobre los factores de transcripción HD-Zip I. En este caso, este pequeño marco

de lectura abierto se encuentra muy conservado entre especies y es capaz de regular negativamente la traducción de *AtHBI* mediante un mecanismo de acción en *cis*. Esta regulación evita los efectos adversos que tiene en el desarrollo de la planta la sobreexpresión de *AtHBI* (plantas infértiles con un desarrollo retrasado) y es tejido-específica, ya que sólo se observa en la parte aérea de la planta y cuando las mismas son sometidas a condiciones de oscuridad.

Como conclusión final puede mencionarse que al ser la regulación transcripcional la más importante en plantas, la expresión de los factores de transcripción se encuentra a su vez bajo un estricto control para evitar efectos perniciosos a la supervivencia de la planta. En esta tesis se describen al menos dos de estos controles: la regulación transcripcional tejido-específica entre los pares de genes parálogos *AtHB13* y *AtHB23* y la regulación traduccional ejercida sobre *AtHBI* por el uORF presente en su región 5'UTR.



Bibliografía

- Aarts, MGM y Fiers, MWEJ (2003) *What Drives Plant Stress Genes?* Trends Plant Sci. 8: 99 - 102.
- Aida, M; Ishida, T; Fukaki, H; Fujisawa, H y Tasaka, M. (1997). *Genes Involved in Organ Separation in Arabidopsis: An Analysis of the Cup-Shaped Cotyledon Mutant*. Plant Cell 9: 841 - 857.
- Alatorre-Cobos, F; Cruz-Ramírez, A; Hayden, CA; Pérez-Torres, CA; Chauvin, AL; Ibarra-Laclette, E; Alva-Cortés, E; Jorgensen, RA y Herrera-Estrella, L (2012) *Translational Regulation of Arabidopsis XIPOTL1 Is Modulated by Phosphocholine Levels via the Phylogenetically Conserved Upstream Open Reading Frame 30*. J. Exp. Bot. 63: 5203 - 5221.
- Alberts, B; Johnson, A; Lewis, J; Raff, M, Roberts, K y Walter, P (2002) *Molecular Biology of The Cell*. Fourth Edition. Garland Science. New York
- Altschul, SF; Gish, W; Miller, W; Myers, EW y Lipman, DJ (1990). *Basic Local Alignment Search Tool*. J. Mol. Biol. 215: 403 - 410.
- Altschul, SF; Madden, TL; Schäffer, AA; Zhang, J; Zhang, Z; Miller, W y Lipman DJ (1997). *Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs*. Nucleic Acids Res. 25: 3389 - 3402.
- Andrés, F y Coupland, G (2012) *The Genetic Basis of Flowering Responses to Seasonal Cues*. Nat. Rev. Genet. 13: 627 - 639.
- Aoyama, T; Dong, CH; Wu, Y; Carabelli, M; Sessa, G; Ruberti, I; Morelli, G y Chua, NH (1995) *Ectopic Expression of the Arabidopsis Transcriptional Activator Athb-1 Alters Leaf Cell Fate in Tobacco*. Plant Cell 7: 1773 - 1785.
- Arce, AL; Cabello, J y Chan, RL (2008) *Patents on Plant Transcription Factors*. Recent Pat. Biotechnol. 2: 209 - 217.
- Arce, AL; Raineri, J; Capella, M; Cabello, JV y Chan, RL (2011) *Uncharacterized Conserved Motifs Outside the HD-Zip Domain in HD-Zip Subfamily I Transcription Factors; a Potential Source of Functional Diversity*. BMC Plant Biol. 11: 42.
- Arciga-Reyes, L; Wootton, L; Kieffer, M y Davies, B (2006) *UPF1 Is Required for Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD) and RNAi in Arabidopsis*. Plant J. 47: 480 - 489.
- Ariel, FD; Manavella, PA; Dezar, CA y Chan, RL (2007) *The True Story of the HD-Zip Family*. Trends Plant Sci. 12 (9): 419 - 426.
- Ariel, FD; Diet, A; Verdenaud, M; Gruber, V; Frugier, F; Chan, RL y Crespi, M (2010)

- Environmental Regulation of Lateral Root Emergence in Medicago Truncatula Requires the HD-Zip I Transcription Factor HBI*. Plant Cell 22: 2171 - 2183.
- Ausubel, FM; Brent, R; Kingston, RE; Moore, DD; Seidman, JG; Smith, JA; Struhl, K. (1983). In: *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York.
- Bender, J y Fink, GR (1998) *A Myb Homologue, ATR1, Activates Tryptophan Gene Expression in Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95: 5655 - 5660.
- Bender, W; Akam, M; Karch, F; Beachy, PA; Peifer, M; Spierer, P; Lewis, EB y Hogness, DS (1983) *Molecular Genetics of the Bithorax Complex in Drosophila Melanogaster*. Science 221: 23 - 29.
- Benlloch, R; Berbel, A; Serrano-Mislata, A y Madueño, F (2007) *Floral Initiation and Inflorescence Architecture: A Comparative View*. Ann. Bot. 100: 659 - 676.
- Birnboim, HC y Doly, J (1979) *A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA*. Nucleic Acids Res. 7:1513 - 1523.
- Boavida, LC y McCormick, S (2007) *Temperature as a Determinant Factor for Increased and Reproducible in Vitro Pollen Germination in Arabidopsis Thaliana*. Plant J. 52: 570 - 582.
- Bock, KW; Honys, D; Ward, JM; Padmanaban, S; Nawrocki, EP; Hirschi, KD; Twell, D y Sze, H (2006) *Integrating Membrane Transport with Male Gametophyte Development and Function through Transcriptomics*. Plant Physiol. 140: 1151 - 1168.
- Bologna, NG y Voinnet, O (2014) *The Diversity, Biogenesis, and Activities of Endogenous Silencing Small RNAs in Arabidopsis*. Annu. Rev. Plant Biol. 65: 473 - 503.
- Bornberg-Bauer, E; Beaussart, F; Kummerfeld, SK; Teichmann, SA y Weiner, J (2005) *The Evolution of Domain Arrangements in Proteins and Interaction Networks*. Cell. Mol. Life Sci. 62: 435 - 445.
- Bradford, MM (1976) *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*. Anal. Biochem. 72: 248 - 254.
- Branden, C.; Tooze, J. (1999). *Introduction to Protein Structure*. Second Edition. Garland Publishing, New York.
- Cabello, JV y Chan, RL (2012) *The Homologous Homeodomain-Leucine Zipper Transcription Factors HaHBI and AtHB13 Confer Tolerance to Drought and*

- Salinity Stresses via the Induction of Proteins That Stabilize Membranes*. Plant Biotechnol. J. 10: 815 - 25.
- Cabello, JV; Arce, AL y Chan, RL (2012) *The Homologous HD-Zip I Transcription Factors HaHB1 and AtHB13 Confer Cold Tolerance via the Induction of Pathogenesis-Related and Glucanase Proteins*. Plant J. 69: 141 - 153.
- Cabello, JV; Giacomelli, JI; Piattoni, CV; Iglesias, AA y Chan, RL (2016) *The Sunflower Transcription Factor HaHB11 Improves Yield, Biomass and Tolerance to Flooding in Transgenic Arabidopsis Plants*. J. Biotechnol. 222: 73 - 83.
- Calvo, SE; Pagliarini, DJ y Mootha, VK (2009) *Upstream Open Reading Frames Cause Widespread Reduction of Protein Expression and Are Polymorphic among Humans*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106: 7507 - 7512.
- Canto, T; Uhrig, JF; Swanson, M; Wright, KM y MacFarlane, SA (2006) *Translocation of Tomato Bushy Stunt Virus P19 Protein into the Nucleus by ALY Proteins Compromises Its Silencing Suppressor Activity*. J. Virol. 80: 9064 - 9072.
- Capella, M; Ré, DA; Arce, AL y Chan, RL (2014) *Plant Homeodomain-Leucine Zipper I Transcription Factors Exhibit Different Functional AHA Motifs That Selectively Interact with TBP Or/and TFIIB*. Plant Cell Rep. 33: 955 - 967.
- Capella, M; Ribone, PA, Arce, AL y Chan, RL (2015a) *Homeodomain-Leucine Zipper Transcription Factors: Structural Features of These Proteins, Unique to Plants*. En: *Plant Transcription Factors: Evolutionary, Structural and Functional Aspects* (Eds: González, DH) Elsevier, Amsterdam, Países Bajos, p. 113-126.
- Capella, M; Ribone, PA; Arce, AL y Chan, RL (2015b) *Arabidopsis Thaliana HomeoBox 1 (AtHB1), a Homeodomain-Leucine Zipper I (HD-Zip I) Transcription Factor, Is Regulated by PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 1 to Promote Hypocotyl Elongation*. New Phytol. 207: 669 - 682.
- Capella, M (2015c) *Factores de Transcripción Vegetales de La Familia HD-Zip: Hacia La comprensión de las diferencias funcionales entre los distintos miembros a través de un análisis molecular. Estudio particular del gen AtHB1 de Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Litoral.
- Carvalho, RF; Feijão, CV y Duque, P (2013) *On the Physiological Significance of Alternative Splicing Events in Higher Plants*. Protoplasma 250: 639 - 650.
- Casadaban, MJ y Cohen, SN (1980) *Analysis of Gene Control Signals by DNA Fusion and Cloning in Escherichia Coli*. J. Mol. Biol. 138: 179 - 207.
- Castiglioni, P; Warner, D; Bensen, RJ; Anstrom, DC; Harrison, J; Stoecker, M; Abad,

- M; Kumar, G; Salvador, S; D'Ordine, R; Navarro, S; Back, S; Fernandes, M; Targolli, J; Dasgupta, S; Bonin, C; Luethy, MH; Heard, JE (2008) *Bacterial RNA Chaperones Confer Abiotic Stress Tolerance in Plants and Improved Grain Yield in Maize under Water-Limited Conditions*. *Plant Physiol.* 147: 446 - 455.
- Castrillo, G; Turck, F; Leveugle, M; Lecharny, A; Carbonero, P; Coupland, G; Paz-Ares, J y Oñate-Sánchez, L (2011) *Speeding Cis-Trans Regulation Discovery by Phylogenomic Analyses Coupled with Screenings of an Arrayed Library of Arabidopsis Transcription Factors*. *PLoS ONE* 6: e21524.
- Chan, RL; Gago, GM; Palena, CM y Gonzalez, DH (1998) *Homeoboxes in Plant Development*. *Biochim. Biophys. Acta* 1442: 1 - 19.
- Chan, RL; Cabello, JV y Giacomelli, JI (2013) HaHB11 provides improved plant yield and tolerance to abiotic stress, WO 2013116750 A1
- Chapman, LA y Goring, DR (2010) *Pollen-Pistil Interactions Regulating Successful Fertilization in the Brassicaceae*. *J. Exp. Bot.* 61: 1987 - 1999.
- Charrier, B; Champion, A; Henry, Y y Kreis, M (2002) *Expression Profiling of the Whole Arabidopsis Shaggy-like Kinase Multigene Family by Real-Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*. *Plant Physiol.* 130: 577 - 590.
- Cheong, YH; Chang, H-R; Gupta, R; Wang, X; Zhu, T y Luan, S (2002) *Transcriptional Profiling Reveals Novel Interactions between Wounding, Pathogen, Abiotic Stress, and Hormonal Responses in Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129: 661 - 677.
- Chinnusamy, V; Gong, Z y Zhu, J-K (2008) *Nuclear RNA Export and Its Importance in Abiotic Stress Responses of Plants*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 326: 235 - 255.
- Choi, H; Jeong, S; Kim, DS; Na, HJ; Ryu, JS; Lee, SS; Nam, HG; Lim, PO y Woo, HR (2014) *The Homeodomain-Leucine Zipper ATHB23, a Phytochrome B-Interacting Protein, Is Important for Phytochrome B-Mediated Red Light Signaling*. *Physiol. Plant.* 150: 308 - 320.
- Chomczynski, P y Sacchi, N (1987) *Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction*. *Anal. Biochem.* 162: 156 - 159.
- Clough, SJ y Bent, AF (1998) *Floral Dip: A Simplified Method for Agrobacterium-Mediated Transformation of Arabidopsis Thaliana*. *Plant J.* 16: 735 - 743.
- Comber, JP; de Billy, F; Gamas, P; Niebel, A y Rivas, S (2008) *Trans-Regulation of*

- the Expression of the Transcription Factor MtHAP2-1 by a uORF Controls Root Nodule Development.* Genes Dev. 22: 1549 - 1559.
- Comelli, RN; Welchen, E; Kim, HJ; Hong, JC y González, DH (2012). *Delta subclass HD-Zip proteins and a B-3 AP2/ERF transcription factor interact with promoter elements required for expression of the Arabidopsis cytochrome c oxidase 5b-1 gene.* Plant Mol. Biol. 80: 157-167.
- Crick, F (1956) *Ideas on Protein Synthesis.* Symp. Soc. Exp. Biol. XII: 139 - 163.
- Crick, F (1970) *Central Dogma of Molecular Biology.* Nature 227: 561 - 563.
- Dai, M; Hu, Y; Ma, Q; Zhao, Y y Zhou, D-XX. (2008) *Functional Analysis of Rice HOMEODOMAIN-BOX4 (Oshox4) Gene Reveals a Negative Function in Gibberellin Responses.* Plant Mol. Biol. 66: 289 - 301.
- de Felippes, FF y Weigel, D (2010) *Transient Assays for the Analysis of miRNA Processing and Function.* Methods Mol. Biol. 592: 255 - 264.
- De Smet, I; Lau, S; Ehrismann, JS; Axiotis, I; Kolb, M; Kientz, M; Weijers, D y Jürgens, G (2013). *Transcriptional repression of BODENLOS by HD-ZIP transcription factor HB5 in Arabidopsis thaliana.* J. Exp. Bot. 64: 3009–3019.
- Dezar, CA; Gago, GM; González, DH y Chan, RL (2005a) *Hahb-4, a Sunflower Homeobox-Leucine Zipper Gene, Is a Developmental Regulator and Confers Drought Tolerance to Arabidopsis Thaliana Plants.* Transgenic Res. 14: 429 - 440.
- Dezar, CA; Fedrigo, GV y Chan, RL (2005b) *The Promoter of the Sunflower HD-Zip Protein Gene Hahb4 Directs Tissue-Specific Expression and Is Inducible by Water Stress, High Salt Concentrations and ABA.* Plant Sci. 169: 447 - 456.
- Dresselhaus, T; Smyth, D y Berleth, T (2006) *Cell–cell Communication during Double Fertilization* Curr. Opin. Plant Biol. 9: 41 - 47.
- Ebina, I; Takemoto-Tsutsumi, M; Watanabe, S; Koyama, H; Endo, Y; Kimata, K; Igarashi, T; Murakami, K; Kudo, R; Ohsumi, A; Noh, AL; Takahashi, H; Naito, S. y Onouchi, H (2015) *Identification of novel Arabidopsis thaliana upstream open reading frames that control expression of the main coding sequences in a peptide sequence-dependent manner.* Nucleic Acids Res. 43: 1562 - 1576.
- Edlund, AF; Swanson, R y Preuss, D (2004) *Pollen and Stigma Structure and Function: The Role of Diversity in Pollination.* Plant Cell 16: S84 - S97.
- Fankhauser, C y Casal, JJ (2004) *Phenotypic Characterization of a Photomorphogenic Mutant.* Plant J. 39: 747 - 760.
- Filichkin, S; Priest, HD; Megraw, M y Mockler, TC (2015) *Alternative Splicing in*

- Plants: Directing Traffic at the Crossroads of Adaptation and Environmental Stress*. Curr. Opin. Plant Biol. 24: 125 - 135.
- Gago, GM; Almoguera, C; Jordano, J; Gonzalez, DH y Chan, RL (2002) *Hahb-4, a Homeobox-Leucine Zipper Gene Potentially Involved in Abscisic Acid-Dependent Responses to Water Stress in Sunflower*. Plant Cell Environ. 25: 633 - 640.
- Gamborg, OL; Miller, RA y Ojima, K. (1968) *Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells*. Exp. Cell Res. 50: 151 - 158.
- Gao, D; Appiano, M; Huibers, RP; Chen, Xi; Loonen, AEHM; Visser, RGF; Wolters, AMA y Bai, Y (2014) *Activation Tagging of ATHB13 in Arabidopsis Thaliana Confers Broad-Spectrum Disease Resistance*. Plant Mol. Biol. 86: 641 - 653.
- Garapati, P; Xue, G-P; Munné-Bosch, S y Balazadeh, S (2015) *Transcription Factor ATAF1 in Arabidopsis Promotes Senescence by Direct Regulation of Key Chloroplast Maintenance and Senescence Transcriptional Cascades*. Plant Physiol. 168: 1122 - 1139.
- Garber, RL; Kuroiwa, A y Gehring, WJ (1983) *Genomic and cDNA Clones of the Homeotic Locus Antennapedia in Drosophila*. EMBO J. 2: 2027 - 2036.
- Gehring, WJ (1987) *Homeo Boxes in the Study of Development*. Science 236: 1245-1252.
- Gehring, WJ; Qian, YQ; Billeter, M; Furukubo-Tokunaga, K; Schier, AF; Resendez-Perez, D; Affolter, M; Otting, G y Wüthrich, K (1994) *Homeodomain-DNA Recognition*. Cell 78: 211 - 223.
- González, DH; Valle, EM; Gago, G y Chan, RL (1997) *Interaction between proteins containing homeodomains associated to leucine zippers from sunflower*. BBA- Gene Struct. Expr. 1351: 137 - 149
- Graham, MW; Mudge, SR; Sternes, PR y Birch, RG (2011) *Understanding and Avoiding Transgene Silencing*. En *Plant Transformation Technologies*, (Eds: Stewart, CN Jr; Touraev, A; Citovsky, V y Tzfira, T) John Wiley & Sons, West Sussex, p: 171 - 196
- Goujon, M; McWilliam, H; Li, W; Valentin, F; Squizzato, S; Paern, J y Lopez, R (2010) *A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI*. Nucleic Acids Res. 38: W695 - 699.
- Guerrero-González, ML; Rodríguez-Kessler, M y Jiménez-Bremont, JF (2014) *uORF, a Regulatory Mechanism of the Arabidopsis Polyamine Oxidase 2*. Mol. Biol. Rep. 41: 2427 - 2443.

- Hajdukiewicz, P; Svab, Z y Maliga, P (1994) *The Small, Versatile pPZP Family of Agrobacterium Binary Vectors for Plant Transformation*. *Plant Mol. Biol.* 25: 989 - 994.
- Halle, F (1986) *Modular Growth in Seed Plants*. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 313: 77 - 87.
- Hanfrey, C; Elliott, KA; Franceschetti, M; Mayer, MJ; Illingworth, C y Michael, AJ (2005) *A Dual Upstream Open Reading Frame-Based Autoregulatory Circuit Controlling Polyamine-Responsive Translation*. *J. Biol. Chem.* 280: 39229 - 39237.
- Hanson, J; Johannesson, H y Engström, P (2001) *Sugar-Dependent Alterations in Cotyledon and Leaf Development in Transgenic Plants Expressing the HDZhdip Gene ATHB13*. *Plant Mol. Biol.* 45: 247 - 262.
- Hanson, J; Regan, S y Engström, P (2002) *The Expression Pattern of the Homeobox Gene ATHB13 Reveals a Conservation of Transcriptional Regulatory Mechanisms between Arabidopsis and Hybrid Aspen*. *Plant Cell Rep.* 21: 81 - 89.
- Harris, JC; Hrmova, M; Lopato, S y Langridge, P (2011) *Modulation of Plant Growth by HD-Zip Class I and II Transcription Factors in Response to Environmental Stimuli*. *New Phytol.* 190: 823 - 837.
- Harrison, SJ; Mott, EK; Parsley, K; Aspinall, S; Gray, JC y Cottage, A (2006) *A Rapid and Robust Method of Identifying Transformed Arabidopsis Thaliana Seedlings Following Floral Dip Transformation*. *Plant Methods* 2: 19.
- Hartley, JL; Temple, GF y Brasch, MA (2000) *DNA Cloning Using in Vitro Site-Specific Recombination*. *Genome Res.* 10: 1788 - 1795.
- Hayden, CA y Jorgensen, RA (2007) *Identification of Novel Conserved Peptide uORF Homology Groups in Arabidopsis and Rice Reveals Ancient Eukaryotic Origin of Select Groups and Preferential Association with Transcription Factor-Encoding Genes*. *BMC Biology* 5: 32.
- Hayden, CA y Bosco, G (2008) *Comparative Genomic Analysis of Novel Conserved Peptide Upstream Open Reading Frames in Drosophila Melanogaster and Other Dipteran Species*. *BMC Genomics* 9: 61.
- Henriksson, E; Olsson, ASB; Johannesson, H; Johansson, H; Hanson, J; Engström, P y Söderman, E (2005) *Homeodomain Leucine Zipper Class I Genes in Arabidopsis. Expression Patterns and Phylogenetic Relationships*. *Plant Physiol.* 139: 509 - 518.
- Heslop-Harrison, J (1968) *Tapetal Origin of Pollen-Coat Substances in Lilium*. *New*

- Phytol.* 67: 779 - 786.
- Heslop-Harrison, J (1975) *Incompatibility and the Pollen-Stigma Interaction*. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 26: 403 - 425.
- Heslop-Harrison, Y (2000) *Control Gates and Micro-Ecology: The Pollen-Stigma Interaction in Perspective*. *Ann. Bot.* 85: 5 - 13.
- Hiscock, SJ y Allen, AM (2008) *Diverse Cell Signalling Pathways Regulate Pollen – Stigma Interactions : The Search for Consensus*. *New Phytol.* 179: 286 - 317.
- Hjellström, M; Olsson, ASB; Engström, P y Söderman, EM (2003). *Constitutive Expression of the Water Deficit-Inducible Homeobox Gene ATHB7 in Transgenic Arabidopsis Causes a Suppression of Stem Elongation Growth*. *Plant Cell Environ.* 26: 1127 - 1136.
- Hofer, J; Turner, L; Moreau, C; Ambrose, M; Isaac, P; Butcher, S; Weller, J; Dupin, A; Dalmais, M; Le Signor, C; Bendahmane, A; Ellis, N (2009) *Tendrils-Less Regulates Tendril Formation in Pea Leaves*. *Plant Cell* 21: 420 - 428.
- Hohn, T y Vazquez, F (2016) *RNA Silencing Pathways of Plants: Silencing and Its Suppression by Plant DNA Viruses*. *Biochim. Biophys. Acta* 1809: 588 - 600.
- Hu, Q; Merchante, C; Stepanova, AN; Alonso, JM y Heber, S (2016) *Genome-Wide Search for Translated Upstream Open Reading Frames in Arabidopsis Thaliana*. *IEEE Trans. Nanobioscience* 15: 148 - 157.
- Huijser, P y Schmid, M (2011) *The Control of Developmental Phase Transitions in Plants*. *Development* 138: 4117 - 4129.
- Hülkamp, M; Kopczak, SD; Horejsi, TF; Kihl, BK y Pruitt, RE (1995) *Identification of Genes Required for Pollen-Stigma Recognition in Arabidopsis Thaliana*. *Plant J.* 8: 703 - 714.
- Imai, A; Hanzawa, Y; Komura, M; Yamamoto, KT; Komeda, Y y Takahashi, T (2006) *The Dwarf Phenotype of the Arabidopsis acl5 Mutant Is Suppressed by a Mutation in an Upstream ORF of a bHLH Gene*. *Development* 133: 3575 - 3585.
- Ingolia, NT; Ghaemmaghami, S; Newman, JRS y Weissman, JS (2009) *Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling*. *Science* 324: 218-223
- Ito, K. y Chiba, S. (2013) *Arrest Peptides: Cis -Acting Modulators of Translation*. *Annu. Rev. Biochem.* 82: 171 - 202.
- Ivanov, IP; Atkins, JF y Michael, AJ (2010) *A Profusion of Upstream Open Reading Frame Mechanisms in Polyamine-Responsive Translational Regulation*. *Nucleic*

- Acids Res. 38: 353 - 359.
- Jefferson, RA; Kavanagh, TA y Bevan, MW (1987) *GUS Fusions: Beta-Glucuronidase as a Sensitive and Versatile Gene Fusion Marker in Higher Plants*. EMBO J. 6: 3901 - 3907.
- Johannesson, H; Wang, Y y Engström, P (2001) *DNA-Binding and Dimerisation Preferences of Arabidopsis Homeodomain- Leucine Zipper Transcription Factors in Vitro*. Plant Mol Biol 45: 63-73.
- Jones, DT; Taylor, WR y Thornton, JM (1992) *The Rapid Generation of Mutation Data Matrices from Protein Sequences*. Bioinformatics 8: 275 - 282.
- Jorgensen, RA y Dorantes-Acosta, AE (2012) *Conserved Peptide Upstream Open Reading Frames Are Associated with Regulatory Genes in Angiosperms*. Front. Plant Sci. 3: 1 - 11.
- Journot-Catalino, N; Somssich, IE; Roby, D y Kroj, T (2006) *The Transcription Factors WRKY11 and WRKY17 Act as Negative Regulators of Basal Resistance in Arabidopsis Thaliana*. Plant Cell 18: 3289 - 3302.
- Juntawong, P; Girke, T; Bazin, J y Bailey-Serres, J (2014) *Translational Dynamics Revealed by Genome-Wide Profiling of Ribosome Footprints in Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA 111: E203-E212.
- Kalyna, M; Simpson, CG; Syed, NH; Lewandowska, D; Marquez, Y; Kusenda, B; Marshall, J; Fuller, J; Cardle, L; McNicol, J; Dinh, HQ; Barta, A. y Brown, JWS (2012) *Alternative splicing and nonsense-mediated decay modulate expression of important regulatory genes in Arabidopsis*. Nucleic Acids Res. 40: 2454 - 2469.
- Karimi, M; Inzé, D y Depicker, A (2002) *GATEWAYTM Vectors for Agrobacterium-Mediated Plant Transformation*. Trends Plant Sci. 7: 193 - 195.
- Kasuga, M; Liu, Q; Miura, S; Yamaguchi-Shinozaki, K y Shinozaki, K (1999) *Improving Plant Drought, Salt, and Freezing Tolerance by Gene Transfer of a Single Stress-Inducible Transcription Factor*. Nat. Biotechnol. 17: 287 - 291.
- Katahira, J (2015) *Nuclear Export of Messenger RNA*. Genes 6: 163 - 184.
- Katoh, K y Toh, H (2008) *Recent Developments in the MAFFT Multiple Sequence Alignment Program*. Brief. Bioinform. 9: 286 - 298.
- Kawamura, E; Horiguchi, G y Tsukaya, H (2010) *Mechanisms of Leaf Tooth Formation in Arabidopsis*. Plant J. 62: 429 - 441.
- Kim, YK; Son, O; Kim, MR; Nam, KH; Kim, GT; Lee, MS; Choi, SY y Cheon, CI (2007) *ATHB23, an Arabidopsis Class I Homeodomain-Leucine Zipper Gene, Is*

- Expressed in the Adaxial Region of Young Leaves*. Plant Cell Rep. 26: 1179 - 1185.
- Komarova, NY; Thor, K; Gubler, A; Meier, S; Dietrich, D; Weichert, A; Grotemeyer, MS; Tegeder, M y Rentsch, D (2008) *AtPTR1 and AtPTR5 Transport Dipeptides in Planta*. Plant Physiol. 148: 856 - 869.
- Komatsuda, T; Pourkheirandish, M; He, C; Azhaguvel, P; Kanamori, H; Perovic, D; Stein, N; Graner, A; Wicker, T; Tagiri, A; Lundqvist, U; Fujimura, T; Matsuoka, M; Matsumoto, T y Yano, M (2007) *Six-Rowed Barley Originated from a Mutation in a Homeodomain-Leucine Zipper I-Class Homeobox Gene*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104: 1424 - 1429.
- Kozak, M (1987) *Effects of Intercistronic Length on the Efficiency of Reinitiation by Eucaryotic Ribosomes*. Mol. Cell. Biol. 7: 3438 - 3445.
- Kozak, M (2002) *Pushing the Limits of the Scanning Mechanism for Initiation of Translation*. Gene 299: 1 - 34.
- Kulkarni, M; Ozgur, S y Stoecklin, G (2010) *On Track with P-Bodies*. Biochem. Soc. Trans. 38: 242 - 251.
- Kwak, SH y Lee, SH (2001) *The Regulation of Ornithine Decarboxylase Gene Expression by Sucrose and Small Upstream Open Reading Frame in Tomato (Lycopersicon Esculentum Mill)*. Plant Cell Physiol. 42: 314 - 323.
- Laing, WA; Martínez-Sánchez, M; Wright, MA; Bulley, SM; Brewster, D; Dare, AP; Rassam, M; Wang, D; Storey, R; Macknight, RC; Hellens, RP (2015) *An Upstream Open Reading Frame Is Essential for Feedback Regulation of Ascorbate Biosynthesis in Arabidopsis*. Plant Cell 27: 772 - 786.
- Landschulz, WH, Johnson, PF y McKnight, SL (1988) *The Leucine Zipper: A Hypothetical Structure Common to a New Class of DNA Binding Proteins*. Science 240: 1759 - 1764.
- Larkin, MA; Blackshields, G; Brown, NP; Chenna, R; McGettigan, PA; McWilliam, H; Valentin, F; Wallace, IM; Wilm, A; Lopez, R; Thompson, JD; Gibson y TJ; Higgins, DG (2007) *Clustal W and Clustal X version 2.0*. Bioinformatics. 23: 2947- 2948.
- Li, B; Wei, A; Song, C; Li, N y Zhang, J (2008) *Heterologous Expression of the TsVP Gene Improves the Drought Resistance of Maize*. Plant Biotechnol. J. 6: 146 - 159.
- Li, J.; Chory, J. (1998). *Preparation of DNA from Arabidopsis*. In *Arabidopsis protocols*. (Eds.: Martinez-Zapateur, JM y Salinas, J) Humana Press Inc., Totowa, New Jersey. P: 55 - 60

- Li, M; Bahn, SC; Guo, L; Musgrave, W; Berg, H; Welti, R y Wang, X (2011) *Patatin-Related Phospholipase pPLAIII β -Induced Changes in Lipid Metabolism Alter Cellulose Content and Cell Elongation in Arabidopsis*. *Plant Cell* 23: 1107 - 1123.
- Liu, L; White, MJ y MacRae, TH (1999) *Transcription Factors and Their Genes in Higher Plants Functional Domains, Evolution and Regulation*. *Eur. J. Biochem.* 262: 247 - 257.
- Livak, KJ y Schmittgen, TD (2001) *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method*. *Methods* 25: 402 - 408.
- Lord, EM y Russell, SD (2002) *The Mechanisms of Pollination and Fertilization in Plants*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18: 81 - 105.
- Lü, P; Zhang, C; Liu, J; Liu, X; Jiang, G; Jiang, X; Khan, MA; Wang, L y Hong, B; Gao, J (2014). *RhHB1 mediates the antagonism of gibberellins to ABA and ethylene during rose (Rosa hybrida) petal senescence*. *Plant J.* 78: 578-590.
- Lu, P-L; Chen, N-Z; An, R; Su, Z; Qi, B-S; Ren, F; Chen, J y Wang, X-C (2007) *A Novel Drought-Inducible Gene, ATAF1, Encodes a NAC Family Protein That Negatively Regulates the Expression of Stress-Responsive Genes in Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 63: 289 - 305.
- Maeda, S; Gunji, S; Hanai, K; Hirano, T; Kazama, Y; Ohbayashi, I; Abe, T; Sawa, S; Tsukaya, H y Ferjani, A (2014) *The Conflict between Cell Proliferation and Expansion Primarily Affects Stem Organogenesis in Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 55: 1994 - 2007.
- Maldonado-Bonilla, LD (2014) *Composition and Function of P Bodies in Arabidopsis Thaliana*. *Front. Plant Sci.* 5: 201.
- Manavella, PA; Dezar, CA; Bonaventure, G; Baldwin, IT y Chan, RL (2008) *HAHB4, a Sunflower HD-Zip Protein, Integrates Signals from the Jasmonic Acid and Ethylene Pathways during Wounding and Biotic Stress Responses*. *Plant J.* 56: 376 - 388.
- Matzke, MA; Matzke, AJM; Pruss, GJ y Vance, VB (2001) *RNA-Based Silencing Strategies in Plants*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11: 221 - 227.
- Mayfield, JA y Preuss, D (2000) *Rapid Initiation of Arabidopsis Pollination Requires the Oleosin-Domain Protein GRP17*. *Nat. Cell Biol.* 2: 128 - 130.
- Mayfield, JA; Fiebig, A; Johnstone, S y Preuss, D (2001) *Gene Families from the Arabidopsis Thaliana Pollen Coat Proteome*. *Science* 292: 2482 - 2485.
- Meier, I (2012) *mRNA Export and Sumoylation-Lessons from Plants*. *Biochim.*

- Biophys. Acta 1819: 531 - 537.
- Meinke, DW; Cherry, JM; Dean, C; Rounsley, SD y Koornneef, M (1998) *Arabidopsis Thaliana: A Model Plant for Genome Analysis*. Science 282: 679 - 682.
- Merchante, C; Brumos, J; Yun, J; Hu, Q; Spencer, KR; Enríquez, P; Binder, BM; Heber, S; Stepanova, AN y Alonso, JM (2015) *Gene-Specific Translation Regulation Mediated by the Hormone-Signaling Molecule EIN2*. Cell 163: 684 - 697.
- Miguel, VN (2016) *Caracterización funcional de factores de transcripción de la familia HD-Zip I sobre un fondo mutante en la maquinaria de silenciamiento mediada por pequeños ARN*. Tesis de Licenciatura en Biotecnología. Universidad Nacional del Litoral.
- Mitsuda, N y Ohme-Takagi, M (2009) *Functional Analysis of Transcription Factors in Arabidopsis*. Plant Cell Physiol. 50: 1232 - 1248.
- Miura, K y Hasegawa, PH (2010) *Sumoylation and Other Ubiquitin-like Post-Translational Modifications in Plants*. Trends Cell Biol. 20: 223 - 232.
- Moens, CB y Selleri, L (2006) *Hox Cofactors in Vertebrate Development*. Dev. Biol. 291: 193 - 206.
- Muench, DG; Zhang, C y Dahodwala, M (2012) *Control of Cytoplasmic Translation in Plants*. Wiley Interdiscip. Rev. RNA 3: 178 - 194.
- Mukherjee, Krishanu, Luciano Brocchieri, y Thomas R. Bürglin. (2009) A Comprehensive Classification and Evolutionary Analysis of Plant Homeobox Genes. *Molecular Biology and Evolution* 26 (12): 2775 - 2794.
- Murashige, T y Skoog, F (1962) *A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures*. Physiol. Plant. 15: 473 - 497.
- Murphy, DJ (2006) *The Extracellular Pollen Coat in Members of the Brassicaceae: Composition, Biosynthesis, and Functions in Pollination*. Protoplasma 228: 31 - 39.
- Nagalakshmi, U; Wang, Z; Waern, K; Shou, C; Raha, D; Gerstein, M y Snyder, M (2008) *The Transcriptional Landscape of the Yeast Genome Defined by RNA Sequencing*. Science 320: 1344 - 1349.
- Nakamura, M; Katsumata, H; Abe, M; Yabe, N; Komeda, Y; Yamamoto, KT y Takahashi, T (2006) *Characterization of the Class IV Homeodomain-Leucine Zipper Gene Family in Arabidopsis*. Plant Physiol. 141: 1363 - 1375.
- Nakashima, K; Takasaki, H; Mizoi, J; Shinozaki, K y Yamaguchi-Shinozaki, K (2012)

- NAC Transcription Factors in Plant Abiotic Stress Responses*. Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms 1819: 97 - 103.
- Nelson, DE; Repetti, PP; Adams, TR; Creelman, RA; Wu, J; Warner, DC; Anstrom, DC; Bensen, RJ; Castiglioni, PP; Donnarummo, MG; Hinchey, BS; Kumimoto, RW; Maszle, DR; Canales, RD; Krolkowski, KA; Dotson, SB; Gutterson, N; Ratcliffe, OJ (2007) *Plant Nuclear Factor Y (NF-Y) B Subunits Confer Drought Tolerance and Lead to Improved Corn Yields on Water-Limited Acres*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104: 16450 - 1655.
- Nikovics, K; Blein, T; Peaucelle, A; Ishida, T; Morin, H; Aida, M y Laufs, P (2006) *The Balance between the MIR164A and CUC2 Genes Controls Leaf Margin Serration in Arabidopsis*. Plant Cell 18: 2929 - 2945.
- Nilsson OB; Hedman R; Marino J; Wickles S; Bischoff L; Johansson M; Müller-Lucks A; Trovato F; Puglisi JD; O'Brien EP; Beckmann R y von Heijne G (2015) *Cotranslational Protein Folding inside the Ribosome Exit Tunnel*. Cell Rep. 12: 1533-1540
- Olsson, ASB; Engström, P y Söderman, E (2004) *The Homeobox Genes ATHB12 and ATHB7 Encode Potential Regulators of Growth in Response to Water Deficit in Arabidopsis*. Plant Mol. Biol. 55: 663 - 677.
- Ooms, G; Hooykaas, PJJ; Van Veen, RJM; Van Beelen, P; Regensburg-Tuïnk, TJG y Schilperoort, RA (1982) *Octopine Ti-Plasmid Deletion Mutants of Agrobacterium Tumefaciens with Emphasis on the Right Side of the T-Region*. Plasmid 7: 15 - 29.
- Palena, CM; Gonzalez, DH y Chan, RL (1999) *A monomer-dimer equilibrium modulates the interaction of the sunflower Homeodomain Leucine-Zipper Protein Hahb-4 with DNA*. Biochem. J. 314: 81 - 87.
- Palena, CM; Tron, AE; Bertocini, CW; Gonzalez, DH y Chan, RL (2001) *Positively Charged Residues at the N-Terminal Arm of the Homeodomain Are Required for Efficient DNA Binding by Homeodomain-Leucine Zipper Proteins*. J. Mol. Biol. 308: 39 - 47.
- Parry, G (2015) *The Plant Nuclear Envelope and Regulation of Gene Expression*. J. Exp. Bot. 66: 1673 - 1685.
- Peragine, A; Yoshikawa, M; Wu, G; Albrecht, HL y Poethig, RS (2004) *SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 Are Required for Juvenile Development and the Production of Trans-Acting siRNAs in Arabidopsis*. Genes Dev. 18: 2368 - 2379.
- Pruneda-Paz, JL, Breton, G; Nagel, DH; Kang, SE; Bonaldi, K; Doherty, CJ; Ravelo, S;

- Galli, M; Ecker, JR y Kay, SA (2014) *A Genome-Scale Resource for the Functional Characterization of Arabidopsis Transcription Factors*. Cell Rep. 8: 622 - 632.
- Rahmani, F; Hummel, M; Schuurmans, J; Wiese-Klinkenberg, A; Smeekens, S y Hanson, J (2009) *Sucrose Control of Translation Mediated by an Upstream Open Reading Frame-Encoded Peptide*. Plant Physiol. 150: 1356 - 1367.
- Raineri, J; Ribichich, KF y Chan, RL (2015) *The Sunflower Transcription Factor HaWRKY76 Confers Drought and Flood Tolerance to Arabidopsis Thaliana Plants without Yield Penalty*. Plant Cell Rep. 34: 2065 - 2080.
- Rajeevkumar, S; Anunanthini, P y Sathishkumar, R (2015) *Epigenetic Silencing in Transgenic Plants*. Front. Plant Sci. 6: 693.
- Ratcliffe, OJ; Amaya, I; Vincent, CA; Rothstein, S; Carpenter, R; Coen, ES y Bradley, DJ (1998) *A Common Mechanism Controls the Life Cycle and Architecture of Plants*. Development 125: 1609 - 1615.
- Ré, DA; Capella, M; Bonaventure, G y Chan, RL (2014) *Arabidopsis AtHB7 and AtHB12 Evolved Divergently to Fine Tune Processes Associated with Growth and Responses to Water Stress*. BMC Plant Biol. 14: 150.
- Reddy, ASN; Marquez, Y; Kalyna, M y Barta, A (2013) *Complexity of the Alternative Splicing Landscape in Plants*. Plant Cell 25: 3657 - 3683.
- Reeves, JH (1992) *Heterogeneity in the Substitution Process of Amino Acid Sites of Proteins Coded for by Mitochondrial DNA*. J. Mol. Evol. 35: 17 - 31.
- Ribichich, KF; Arce, AL y Chan, RL (2013) *Coping with Drought and Salinity Stresses: Role of Transcription Factors in Crop Improvement*. En *Climate Change and Plant Abiotic Stress Tolerance*. (Eds.: Tuteja N y Gill SS) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemania, p: 641 - 684
- Ribone, PA; Capella, M; Arce, AL y Chan, RL (2015a) *What Do We Know about Homeodomain-Leucine Zipper I Transcription Factors? Functional and Biotechnological Considerations*. En *Plant Transcription Factors: Evolutionary, Structural and Functional Aspects*. (Eds: González, DH) Elsevier, Amsterdam, Países Bajos, p. 343-356.
- Ribone, PA; Capella, M y Chan, RL (2015b) *Functional Characterization of the Homeodomain Leucine Zipper I Transcription Factor AtHB13 Reveals a Crucial Role in Arabidopsis Development*. J. Exp. Bot. 66: 5928 - 5943.
- Riechmann, JL (2002) *Transcriptional Regulation: A Genomic Overview*. En: *The*

- Arabidopsis Book* (Ed.: American Society of Plant Biologists) American Society of Plant Biologists. doi: 10.1199/tab.0085
- Roeder, AHK y Yanofsky, MF (2006) *Fruit Development in Arabidopsis*. En: *The Arabidopsis Book* (Ed.: American Society of Plant Biologists) American Society of Plant Biologists. doi: 10.1199/tab.0075
- Romani, F; Ribone, PA; Capella, M; Miguel, VN y Chan, RL (2015) *A Matter of Quantity: Common Features in the Drought Response of Transgenic Plants Overexpressing HD-Zip I Transcription Factors*. *Plant Sci.* 251: 139 - 154.
- Ruberti, I; Sessa, G; Lucchetti, S y Morelli, G (1991) *A Novel Class of Plant Proteins Containing a Homeodomain with a Closely Linked Leucine Zipper Motif*. *EMBO J.* 10: 1787 - 1791.
- Sablowski, RW y Meyerowitz, EM (1998) *A Homolog of NO APICAL MERISTEM Is an Immediate Target of the Floral Homeotic Genes APETALA3/PISTILLATA*. *Cell* 92: 93 - 103.
- Saddic, LA; Huvermann, B; Bezhani, S; Su, Y; Winter, CM; Kwon, CS; Collum, RP y Wagner, D (2006) *The LEAFY Target LMII Is a Meristem Identity Regulator and Acts Together with LEAFY to Regulate Expression of CAULIFLOWER*. *Development* 133: 1673 - 1682.
- Sambrook, J y Russell, D (2000) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.
- Sarker, RH; Elleman, CJ y Dickinson, HG (1988) *Control of Pollen Hydration in Brassica Requires Continued Protein Synthesis, and Glycosylation is Necessary for Intraspecific Incompatibility*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4340 - 4344.
- Saul, H; Elharrar, E; Gaash, R; Eliaz, D; Valenci, M; Akua, T; Avramov, M; Frankel, N; Berezin, I; Gottlieb, D; Elazar, M; David-Assael, O; Tcherkas, V; Mizrachi, K y Shaul, O (2009) *The Upstream Open Reading Frame of the Arabidopsis AtMHX Gene Has a Strong Impact on Transcript Accumulation through the Nonsense-Mediated mRNA Decay Pathway*. *Plant J.: For Cell and Molecular Biology* 60: 1031 - 1042.
- Schena, M y Davis, RW (1992) *HD-Zip Proteins: Members of an Arabidopsis Homeodomain Protein Superfamily*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3894 - 3898.
- Schubert, D; Lechtenberg, B; Forsbach, A; Gils, M; Bahadur, S y Schmidt, R (2004) *Silencing in Arabidopsis T-DNA Transformants: The Predominant Role of a Gene-Specific RNA Sensing Mechanism versus Position Effects*. *Plant Cell* 16: 2561 -

2572.

- Schwab, R; Ossowski, S; Riester, M; Warthmann, N y Weigel, D (2006) *Highly Specific Gene Silencing by Artificial MicroRNAs in Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 1121 - 1133.
- Sessa, G; Morelli, G y Ruberti, I (1993) *The Athb-1 and -2 HD-Zip Domains Homodimerize Forming Complexes of Different DNA Binding Specificities*. *EMBO J.* 12: 3507 - 3517.
- Shahnejat-Bushehri, S; Mueller-Roeber, B y Balazadeh, S (2012) *Arabidopsis NAC Transcription Factor JUNGBRUNNEN1 Affects Thermomemory-Associated Genes and Enhances Heat Stress Tolerance in Primed and Unprimed Conditions*. *Plant Signal. Behav.* 7: 1518 - 1521.
- Shahnejat-Bushehri, S; Tarkowska, D; Sakuraba, Y y Balazadeh, S (2016) *Arabidopsis NAC Transcription Factor JUB1 Regulates GA/BR Metabolism and Signalling*. *Nature Plants* 2: 16013.
- Shaul, O (2015) *Unique Aspects of Plant Nonsense-Mediated mRNA Decay*. *Trends Plant Sci.* 20: 767 - 779.
- Simossis, VA y Heringa, J (2005) *PRALINE: A Multiple Sequence Alignment Toolbox That Integrates Homology-Extended and Secondary Structure Information*. *Nucleic Acids Res.* 33: W289 - W294.
- Singh, K; Foley, RC y Oñate-Sánchez, L (2002) *Transcription Factors in Plant Defense and Stress Responses*. *Curr Opin Plant Biol.* 5: 430 - 436.
- Skirycz, A; Vandenbroucke, K; Clauw, P; Maleux, K; De Meyer, B; Dhondt, S; Pucci, A; Gonzalez, N; Hoerberichts, F; Tognetti, VB; Galbiati, M; Tonelli, C; Van Breusegem, F; Vuylsteke, M y Inzé, D (2011) *Survival and Growth of Arabidopsis Plants given Limited Water Are Not Equal*. *Nat. Biotechnol.* 29: 212 - 214.
- Smyth, DR; Bowman, JL y Meyerowitz, EM (1990) *Early Flower Development in Arabidopsis*. *Plant Cell* 2: 755 - 767.
- Söderman, E; Mattsson, J y Engström, P (1996) *The Arabidopsis Homeobox Gene ATHB-7 Is Induced by Water Deficit and by Abscisic Acid*. *Plant J.* 10: 375 - 381.
- Somers, J; Pöyry, T y Willis, AE (2013) *A Perspective on Mammalian Upstream Open Reading Frame Function*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45: 1690 - 1700.
- Son, O; Hur, YS; Kim, YK; Lee, HJ; Kim, S; Kim, MR; Nam, KH; Lee, MS; Kim, BY; Park, J; Park, J; Lee, SC; Hanada, A; Yamaguchi, S; Lee, IJ; Kim, SK; Yun, DJ; Sderman, E y Cheon, CI (2010) *ATHB12, an ABA-Inducible Homeodomain-*

- Leucine Zipper (HD-Zip) Protein of Arabidopsis, Negatively Regulates the Growth of the Inflorescence Stem by Decreasing the Expression of a Gibberellin 20-Oxidase Gene.* Plant Cell Physiol. 51: 1537 - 1547.
- Souer, E; van Houwelingen, A; Kloos, D; Mol, J y Koes, R (1996) *The No Apical Meristem Gene of Petunia Is Required for Pattern Formation in Embryos and Flowers and Is Expressed at Meristem and Primordia Boundaries.* Cell 85: 159 - 170.
- Stephenson, AG; Doughty, J; Dixon, S; Elleman, C; Hiscock, S y Dickinson, HG (1997) *The Male Determinant of Self-Incompatibility in Brassica Oleracea Is Located in the Pollen Coating.* Plant J. 12: 1351 - 1359.
- Taiz, L y Zeiger, E (2010) *Plant Physiology.* Fifth edition. Sinauer Associates. Sunderland.
- Takada, S; Hibara, K; Ishida, T; y Tasaka, M (2001) *The CUP-SHAPED COTYLEDON1 Gene of Arabidopsis Regulates Shoot Apical Meristem Formation.* Development 128: 1127 - 1135.
- Takahashi, H; Takahashi, A; Naito, S. y Onouchi, H. (2012) *BAIUCAS: A novel BLAST-based algorithm for the identification of upstream open reading frames with conserved amino acid sequences and its application to the Arabidopsis thaliana genome.* Bioinformatics, 28: 2231 - 2241.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000) *Analysis of the Genome Sequence of the Flowering Plant Arabidopsis Thaliana.* Nature 408: 796 - 815.
- Tron, AE; Bertoncini, CW; Palena, CM; Chan, RL y Gonzalez, DH (2001) *Combinatorial Interactions of Two Amino Acids with a Single Base Pair Define Target Site Specificity in Plant Dimeric Homeodomain Proteins.* Nucleic Acids Res. 29: 4866 - 4872.
- Tron, AE; Welchen, E y Gonzalez, DH (2004) *Engineering the Loop Region of a Homeodomain-Leucine Zipper Protein Promotes Efficient Binding to a Monomeric DNA Binding Site.* Biochemistry 43: 15845 - 15851.
- Uchiyama-Kadokura, N; Murakami, K; Takemoto, M; Koyanagi, N; Murota, K; Naito, S. y Onouchi, H. (2014) *Polyamine-responsive ribosomal arrest at the stop codon of an upstream open reading frame of the AdoMetDC1 gene triggers nonsense-mediated mRNA decay in Arabidopsis thaliana,* Plant Cell Physiol. 55: 1556 - 1567.
- Updegraff, EP; Zhao, F y Preuss, D (2009) *The Extracellular Lipase EXL4 Is Required*

- for Efficient Hydration of Arabidopsis Pollen*. Sex. Plant Reprod. 22: 197 - 204.
- Valdés, A; Övernäs, E; Johansson, H; Rada-Iglesias, A; Engström, P (2012). *The homeodomain-leucine zipper (HD-Zip) class I transcription factors ATHB7 and ATHB12 modulate abscisic acid signalling by regulating protein phosphatase 2C and abscisic acid receptor gene activities*. Plant Mol. Biol. 80: 405-418.
- Vaucheret, H and Fagard, M (2001) *Transcriptional Gene Silencing in Plants: Targets, Inducers and Regulators*. Trends Genet. 17: 29 - 35.
- Vollbrecht, E; Veit, B; Sinha, N y Hake, S (1991) *The Developmental Gene Knotted-1 Is a Member of a Maize Homeobox Gene Family*. Nature 350: 241 - 243.
- Von Arnim, AG; Jia, Q y Vaughn, JN (2014) *Regulation of Plant Translation by Upstream Open Reading Frames*. Plant Sci. 214: 1 - 12.
- Wang, L y Wessler, SR (1998) *Inefficient Reinitiation Is Responsible for Upstream Open Reading Frame-Mediated Translational Repression of the Maize R Gene*. Plant Cell 10: 1733 - 1746.
- Wang, W; Vinocur, B y Altman, A (2003) *Plant Responses to Drought, Salinity and Extreme Temperatures: Towards Genetic Engineering for Stress Tolerance*. Planta 218: 1 - 14.
- Welchen, E y Gonzalez, DH (2005) *Differential Expression of the Arabidopsis Cytochrome c Genes Cytc-1 and Cytc-2. Evidence for the Involvement of TCP-Domain Protein-Binding Elements in Anther- and Meristem-Specific Expression of the Cytc-1 Gene*. Plant Physiol. 139: 88 - 100.
- Westhof, E (2004) *How to Silence Silencing*. Cell Chem. Biol. 11: 158 - 160.
- Wiese, A; Elzinga, N; Wobbes, B y Smeekens, S (2004) *A Conserved Upstream Open Reading Frame Mediates Sucrose-Induced Repression of Translation*. Plant Cell 16: 1717 - 1729.
- Wilson, DN; Arenz, S y Beckmann, R (2016) *Translation Regulation via Nascent Polypeptide-Mediated Ribosome Stalling*. Curr. Opin. Struct. Biol. 37: 123 - 133.
- Wolpert, L y Tickle, C (2010) *Principles of Development*. Fourth edition. Oxford University Press. Oxford.
- Woodcock, DM; Crowther, PJ; Doherty, J; Jefferson, S; Decruz, E; Noyer-Weidner, M; Smith, SS; Michael, MZ; y Grahagl, MW (1989) *Quantitative Evaluation of Escherichia Coli Host Strains for Tolerance to Cytosine Methylation in Plasmid and Phage Recombinants*. Nucleic Acids Res. 17: 3469 - 3478.
- Wu, A; Allu, DA; Garapati, P; Siddiqui, H; Dortay, H, Zanol, M-I; Asensi-Fabado,

- MA; Munne-Bosch, S; Antonio, C; Tohge, T; Fernie, AR; Kaufmann, K; Xue, G-P; Mueller-Roeber, B y Balazadeh, S (2012) *JUNGBRUNNEN1, a Reactive Oxygen Species-Responsive NAC Transcription Factor, Regulates Longevity in Arabidopsis*. *Plant Cell* 24: 482 - 506.
- Xie, Q; Frugis, G; Colgan, D y Chua, NH (2000) *Arabidopsis NAC1 Transduces Auxin Signal Downstream of TIR1 to Promote Lateral Root Development*. *Genes Dev.* 14: 3024 - 3036.
- Xiong, Y; Liu, T; Tian, C; Sun, S, Li, J y Chen, M (2005) *Transcription Factors in Rice: A Genome-Wide Comparative Analysis between Monocots and Eudicots*. *Plant Mol. Biol.* 59: 191 - 203.
- Xu, J y Chua, N-H (2011) *Processing Bodies and Plant Development*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14: 88 - 93.
- Xu, X; Chen, C; Fan, B y Chen, Z (2006) *Physical and Functional Interactions between Pathogen-Induced Arabidopsis WRKY18, WRKY40, and WRKY60 Transcription Factors*. *Plant Cell* 18: 1310 - 1326.
- Yang, Z. (1993) *Maximum-Likelihood Estimation of Phylogeny from DNA Sequences When Substitution Rates Differ over Sites*. *Mol. Biol. Evol.* 10: 1396 - 1401.
- Zhang, Y y Wang, L (2005) *The WRKY Transcription Factor Superfamily: Its Origin in Eukaryotes and Expansion in Plants*. *BMC Evol. Biol.* 5: 1.
- Zhu, E; You, C; Wang, S; Cui, J; Niu, B; Wang, Y; Qi, J; Ma, H y Chang, F (2015) *The DYT1-Interacting Proteins bHLH010, bHLH089 and bHLH091 Are Redundantly Required for Arabidopsis Anther Development and Transcriptome*. *Plant J.* 83: 976 - 990.
- Zinkl, GM; Zwiebel, BI; Grier, DG y Preuss, D (1999) *Pollen-Stigma Adhesion in Arabidopsis: A Species-Specific Interaction Mediated by Lipophilic Molecules in the Pollen Exine*. *Development* 126: 5431 - 5440.



Anexos

Anexo 1: Genes diferencialmente expresados en inflorescencias *athb13-1* respecto inflorescencias WT

Gene ID	Nombre de la proteína	Descripción	Veces de inducción	Test T	HD-Zip Box
AT5G15360	F8M21_250	Protein of unknown function	219,000	0,000	
AT3G30383		Protein of unknown function (DUF784)	26,000	0,000	
AT5G48605		Putative membrane lipoprotein	20,000	0,000	
AT4G02850	T5J8.17	phenazine biosynthesis PhzC/PhzF family protein	6,500	0,001	CAATTATTG
AT1G57760		Protein of unknown function (DUF784)	5,800	0,004	
AT5G43525		Putative membrane lipoprotein	5,500	0,009	
AT5G42567		Protein of unknown function (DUF784)	5,300	0,005	
AT3G30247		Protein of unknown function (DUF784)	5,143	0,004	
AT2G21655		Protein of unknown function (DUF784)	5,125	0,001	
AT1G47470		Protein of unknown function (DUF784)	4,733	0,003	
AT5G18403		Putative membrane lipoprotein	4,250	0,008	
AT4G31710	ATGLR2.4	glutamate receptor 2.4	4,000	0,007	
AT2G21750	EC1.3	Protein of unknown function (DUF1278)	3,786	0,007	
AT3G01345		Expressed protein	3,400	0,000	
AT1G56385		Plant self-incompatibility protein S1 family	3,235	0,008	
AT1G57777		Protein of unknown function (DUF784)	3,231	0,000	
AT3G04510	LSH2	Protein of unknown function (DUF640)	3,200	0,001	
AT4G13263		Protein of unknown function (DUF784)	2,944	0,001	
AT2G04031		Protein of unknown function (DUF784)	2,875	0,003	
AT5G25970	T1N24.19	Core-2/I-branching beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase family protein	2,810	0,004	
AT5G19880	PER58	Peroxidase superfamily protein	2,703	0,003	
AT2G21727		Protein of unknown function (DUF784)	2,667	0,004	
AT4G11290	PER39	Peroxidase superfamily protein	2,619	0,001	
AT1G47450		Protein of unknown function (DUF784)	2,611	0,003	
AT2G35640		Homeodomain-like superfamily protein	2,583	0,009	
AT3G03670	PER28	Peroxidase superfamily protein	2,558	0,000	
AT5G24900	CYP714A2	cytochrome P450, family 714, subfamily A, polypeptide 2	2,500	0,003	
AT3G27940	LBD26	LOB domain-containing protein 26	2,500	0,005	
AT5G11940	F14F18_110	Subtilase family protein	2,350	0,003	CAATTATTG
AT5G05300		Protein of unknown function	2,250	0,007	
AT1G27020	AT1G27020	Protein of unknown function	2,250	0,005	
AT5G55170	SUM3	small ubiquitin-like modifier 3	2,200	0,007	
AT3G11990	T21B14.17	Protein of unknown function (DUF784)	2,125	0,001	

AT5G05400		LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein	2,067	0,008	
AT3G48080	T17F15.50	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	2,000	0,007	
AT1G15320	F9L1.26	Protein of unknown function	2,000	0,008	
AT3G26280	CYP71B4	cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 4	0,500	0,007	
AT1G19190	CXE1	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	0,494	0,001	CAATTATTG
AT5G53520	ATOPT8	oligopeptide transporter 8	0,494	0,000	
AT5G51810	GA20OX2	gibberellin 20 oxidase 2	0,491	0,001	
AT2G22200	ERF056	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	0,489	0,001	
AT1G29010		Protein of unknown function	0,488	0,005	
AT1G79840	GL2	HD-ZIP IV family of homeobox-leucine zipper protein with lipid-binding START domain	0,487	0,005	
AT3G30842	PDR10	pleiotropic drug resistance 10	0,486	0,009	
AT3G17230		invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein	0,482	0,007	
AT3G14850	TBL41	TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE 41	0,482	0,003	
AT1G73620	F25P22.3	Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein	0,480	0,000	
AT2G44480	BGLU17	beta glucosidase 17	0,479	0,005	
AT2G43620		Chitinase family protein	0,478	0,001	CAATAATTG
AT1G24540	CYP86C1	cytochrome P450, family 86, subfamily C, polypeptide 1	0,475	0,007	CAATAATTG
AT2G41230		Protein of unknown function	0,472	0,007	
AT4G37390	YDK1	Auxin-responsive GH3 family protein	0,468	0,003	
AT3G22820	EPFL5	allergen-related	0,468	0,007	CAATGATTG
AT5G01180	PTR5	peptide transporter 5	0,465	0,002	
AT1G23420	INO	Plant-specific transcription factor YABBY family protein	0,464	0,000	
AT5G41390		PLAC8 family protein	0,460	0,008	
AT5G04660	CYP77A4	cytochrome P450, family 77, subfamily A, polypeptide 4	0,456	0,001	
AT1G09790	COBL6	COBRA-like protein 6 precursor	0,442	0,004	
AT1G64940	CYP89A6	cytochrome P450, family 87, subfamily A, polypeptide 6	0,441	0,008	
AT1G34580	STP5	Major facilitator superfamily protein	0,441	0,004	
AT2G04046		Defensin-like (DEFL) family protein	0,438	0,003	
AT3G09450	F11F8_2	Protein of unknown function	0,438	0,000	
AT2G21465		Defensin-like (DEFL) family protein	0,436	0,002	CAATTATTG
AT1G04610	YUC3	YUCCA 3	0,434	0,001	
AT1G43640	AtTLP5	tubby like protein 5	0,434	0,006	
AT4G37770	ACS8	1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase 8	0,433	0,008	
AT4G32490	ENODL4	early nodulin-like protein 4	0,429	0,006	
AT3G11740		Protein of unknown function (DUF567)	0,429	0,003	
AT5G01870	LTP10	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	0,424	0,008	
AT4G32170	CYP96A2	cytochrome P450, family 96, subfamily A, polypeptide 2	0,421	0,000	
AT4G20390		Uncharacterised protein family	0,420	0,003	

		(UPF0497)			
AT4G34550	T4L20.130	Protein of unknown function	0,418	0,002	
AT5G58782		Undecaprenyl pyrophosphate synthetase family protein	0,418	0,001	
AT5G58770		Undecaprenyl pyrophosphate synthetase family protein	0,414	0,004	
AT1G05990	RHS1	EF hand calcium-binding protein family	0,412	0,002	
AT5G52975		Protein of unknown function (DUF1278)	0,409	0,003	
AT3G60900	FLA10	FASCICLIN-like arabinogalactan-protein 10	0,407	0,004	
AT2G21320		B-box zinc finger family protein	0,406	0,000	
AT2G33750	ATPUP2	purine permease 2	0,403	0,001	
AT2G38860	YLS5	Class I glutamine amidotransferase-like superfamily protein	0,401	0,001	
AT3G19690		CAP (Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 protein) superfamily protein	0,391	0,007	
AT1G80820	CCR2	cinnamoyl coa reductase	0,383	0,001	
AT2G15340	AT2G15340	glycine-rich protein	0,379	0,002	
AT4G21440	ATMYB102	MYB-like 102	0,375	0,004	
AT3G59900	ARGOS	auxin-regulated gene involved in organ size	0,371	0,002	
AT5G61412		Protein of unknown function	0,370	0,009	
AT1G56650	PAP1	production of anthocyanin pigment 1	0,364	0,005	
AT5G51480	SKS2	SKU5 similar 2	0,363	0,001	
AT2G39200	MLO12	Seven transmembrane MLO family protein	0,357	0,010	
AT4G30074	LCR19	low-molecular-weight cysteine-rich 19	0,356	0,009	CAATTATTG
AT5G61730	ATATH11	ABC2 homolog 11	0,356	0,004	
AT4G36430	PER49	Peroxidase superfamily protein	0,353	0,002	
AT2G17690	SDC	F-box family protein with a domain of unknown function (DUF295)	0,353	0,004	
AT5G36910	THI2.2	thionin 2.2	0,353	0,000	
AT5G56300	GAMT2	gibberellic acid methyltransferase 2	0,352	0,008	
AT5G35550	TT2	Duplicated homeodomain-like superfamily protein	0,351	0,003	
AT1G06020		pfkB-like carbohydrate kinase family protein	0,342	0,009	
AT4G12960	GILT	Gamma interferon responsive lysosomal thiol (GILT) reductase family protein	0,336	0,001	
AT3G20520	SVL3	SHV3-like 3	0,332	0,002	
AT3G45060	ATNRT2.6	high affinity nitrate transporter 2.6	0,330	0,005	
AT5G48100	TT10	Laccase/Diphenol oxidase family protein	0,327	0,002	
AT3G22100	BHLH117	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	0,327	0,004	
AT5G49180	PME58	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily	0,325	0,003	
AT5G33340	CDR1	Eukaryotic aspartyl protease family protein	0,324	0,008	
AT1G03495	3AT2	HXXXD-type acyl-transferase family protein	0,319	0,000	
AT5G17470	CML32	EF hand calcium-binding protein family	0,316	0,003	
AT1G70990	F15H11.18	proline-rich family protein	0,310	0,003	CAATCATTG

AT5G44390	K9L2.19	FAD-binding Berberine family protein	0,309	0,003	
AT1G59500	GH3.4	Auxin-responsive GH3 family protein	0,308	0,003	
AT2G02515		Protein of unknown function	0,304	0,009	
AT4G13840	F18A5.230	HXXXD-type acyl-transferase family protein	0,299	0,001	
AT2G03505		Carbohydrate-binding X8 domain superfamily protein	0,297	0,000	
AT5G22910	ATCHX9	cation/H ⁺ exchanger 9	0,294	0,006	
AT5G17220	ATGSTF12	glutathione S-transferase phi 12	0,292	0,000	
AT1G73603	LCR64	low-molecular-weight cysteine-rich 64	0,288	0,002	
AT5G43610	ATSUC6	sucrose-proton symporter 6	0,286	0,000	
AT5G50200	WR3	nitrate transmembrane transporters	0,283	0,001	
AT3G49270		Protein of unknown function	0,282	0,000	
AT2G45840		Arabidopsis thaliana protein of unknown function (DUF821)	0,277	0,004	
AT5G55132		Defensin-like (DEFL) family protein	0,276	0,002	
AT5G62040	BFT	PEBP (phosphatidylethanolamine-binding protein) family protein	0,273	0,001	CAATAATTG
AT4G09820	TT8	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	0,269	0,007	
AT1G02550		Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein	0,267	0,009	
AT5G46950		Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein	0,264	0,004	
AT2G43590		Chitinase family protein	0,257	0,001	CAATCATTG
AT2G23148		Plant self-incompatibility protein S1 family	0,256	0,008	
AT1G14455	F14L17.23	Protein of unknown function	0,254	0,000	
AT3G29034		Protein of unknown function	0,250	0,000	CAATAATTG
AT2G39855	T5I7.3	Protein of unknown function	0,250	0,000	
AT1G03020	GRXS1	Thioredoxin superfamily protein	0,250	0,006	
AT1G32763		Cysteine-rich protein	0,250	0,001	
AT4G23360		Protein of unknown function	0,250	0,007	
AT4G02520	ATGSTF2	glutathione S-transferase PHI 2	0,248	0,000	
AT1G30730	T5I8.18	FAD-binding Berberine family protein	0,247	0,002	
AT1G03940	3AT1	HXXXD-type acyl-transferase family protein	0,245	0,000	
AT2G37260	TTG2	WRKY family transcription factor family protein	0,242	0,001	
AT3G21500	DXPS1	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase 1	0,242	0,004	
AT1G77525		Protein of unknown function	0,241	0,000	
AT2G46660	CYP78A6	cytochrome P450, family 78, subfamily A, polypeptide 6	0,240	0,000	
AT1G44130	T7O23.17	Eukaryotic aspartyl protease family protein	0,238	0,004	CAATCATTG
AT3G24510		Defensin-like (DEFL) family protein	0,237	0,003	
AT1G61255	F11P17.3	Protein of unknown function	0,234	0,002	
AT1G13755		Defensin-like (DEFL) family protein	0,234	0,003	
AT2G35980	YLS9	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	0,233	0,000	CAATGATTG
AT1G02930	GSTF6	glutathione S-transferase 6	0,233	0,001	
AT3G48230	T24C20_110	Protein of Unknown Function (DUF239)	0,232	0,002	
AT5G63087		Plant thionin family protein	0,231	0,000	
AT5G63085		Plant thionin family protein	0,229	0,004	

AT1G21470		Protein of unknown function	0,227	0,004	
AT5G24110	WRKY30	WRKY DNA-binding protein 30	0,226	0,002	
AT5G39580	PER62	Peroxidase superfamily protein	0,226	0,002	
AT4G14090	UGT75C1	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein	0,226	0,000	
AT3G48231	LCR48	low-molecular-weight cysteine-rich 48	0,226	0,003	
AT1G15040	AT1G15045	Class I glutamine amidotransferase-like superfamily protein	0,226	0,002	
AT3G05975		Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	0,222	0,006	
AT1G34790	TT1	C2H2 and C2HC zinc fingers superfamily protein	0,221	0,008	
AT3G57250	F28O9.100	Emsy N Terminus (ENT) domain-containing protein	0,219	0,008	CAATAATTG
AT3G09270	ATGSTU8	glutathione S-transferase TAU 8	0,214	0,005	
AT1G04645	T1G11.10	Plant self-incompatibility protein S1 family	0,214	0,001	
AT5G42830		HXXXD-type acyl-transferase family protein	0,213	0,000	
AT3G05460	F22F7.9	sporozoite surface protein-related	0,211	0,002	
AT3G61172	LCR8	low-molecular-weight cysteine-rich 8	0,211	0,006	
AT4G33820	AT4G33820	Glycosyl hydrolase superfamily protein	0,211	0,006	
AT3G29590	AT5MAT	HXXXD-type acyl-transferase family protein	0,206	0,000	
AT2G27320		Protein of Unknown Function (DUF239)	0,200	0,008	
AT3G04300	T6K12.8	RmlC-like cupins superfamily protein	0,200	0,003	
AT5G46300		Protein of unknown function	0,200	0,000	
AT2G18880	VEL2	vernalization5/VIN3-like	0,200	0,005	
AT3G03828		Protein of unknown function	0,198	0,000	
AT2G23990	ENODL11	early nodulin-like protein 11	0,195	0,005	
AT1G17260	AHA10	autoinhibited H(+)-ATPase isoform 10	0,194	0,009	
AT4G37720	ATPSK6	phytosulfokine 6 precursor	0,188	0,008	CAATAATTG
AT1G78710	TBL42	TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE 42	0,183	0,001	
AT1G56415		Expressed protein	0,182	0,000	
AT2G39518		Uncharacterised protein family (UPF0497)	0,182	0,001	
AT3G17600	IAA31	indole-3-acetic acid inducible 31	0,178	0,002	
AT3G17152		Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein	0,176	0,006	
AT3G16660	MGL6_11	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	0,176	0,004	
AT4G02300	PME39	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily	0,174	0,000	
AT1G62333		Protein of unknown function	0,170	0,004	
AT1G73610		GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein	0,168	0,003	
AT2G33780	T1B8.28	VQ motif-containing protein	0,167	0,006	CAATGATTG
AT4G29033		Defensin-like (DEFL) family protein	0,167	0,007	CAATTATTG
AT5G44360		FAD-binding Berberine family protein	0,167	0,001	
AT3G13010		hAT transposon superfamily protein	0,167	0,007	
AT5G11412		RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	0,167	0,007	
AT5G09370	T5E8_170	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	0,166	0,000	

AT5G54060	UF3GT	UDP-glucose:flavonoid glucosyltransferase	3-o-	0,165	0,000	
AT2G46960	CYP709B1	cytochrome P450, family 709, subfamily B, polypeptide 1		0,163	0,005	
AT3G59030	TT12	MATE efflux family protein		0,161	0,003	
AT5G63170		GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein		0,160	0,001	
AT1G58055		Defensin-like (DEFL) family protein		0,151	0,001	
AT5G48905	LCR12	low-molecular-weight cysteine-rich 12		0,151	0,009	CAATTATTG
AT2G32370	HDG3	homeodomain GLABROUS 3		0,149	0,004	
AT4G33585		Protein of unknown function		0,147	0,000	
AT4G23350	F16G20.50	Protein of Unknown Function (DUF239)		0,144	0,004	
AT3G55665		Plant self-incompatibility protein S1 family		0,143	0,003	
AT5G27238		Plant self-incompatibility protein S1 family		0,139	0,009	
AT4G19905	LCR38	low-molecular-weight cysteine-rich 38		0,137	0,003	
AT1G16390	ATOCT3	organic cation/carnitine transporter 3		0,134	0,001	
AT2G22060	T16B14.9	Protein of unknown function		0,133	0,003	
AT1G24000		Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein		0,133	0,003	
AT3G25280		Major facilitator superfamily protein		0,125	0,008	
AT5G58850	ATMYB119	myb domain protein 119		0,125	0,008	
AT2G43000	anac042	NAC domain containing protein 42		0,125	0,001	
AT1G09370	F14J9.3	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein		0,125	0,000	
AT5G64905	PROPEP3	elicitor peptide 3 precursor		0,121	0,005	CAATCATTG
AT1G64830	F13O11.13	Eukaryotic aspartyl protease family protein		0,120	0,002	
AT1G02920	ATGSTF7	glutathione S-transferase 7		0,118	0,000	
AT5G03810		GDSL-like Lipase/Acylhydrolase family protein		0,118	0,001	
AT1G51920		Protein of unknown function		0,118	0,006	
AT4G22880	LDOX	leucoanthocyanidin dioxygenase		0,115	0,000	
AT5G51105		Protein of unknown function (DUF1278)		0,115	0,001	
AT2G04910		Carbohydrate-binding X8 domain superfamily protein		0,113	0,001	
AT1G26510		F-box associated ubiquitination effector family protein		0,111	0,001	CAATTATTG
AT4G32105		Beta-1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase family protein		0,110	0,004	
AT1G56100		Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein		0,110	0,002	
AT1G31250		proline-rich family protein		0,101	0,007	
AT1G61720	BAN	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein		0,101	0,005	
AT5G48945	LCR46	low-molecular-weight cysteine-rich 46		0,100	0,000	CAATAATTG
AT2G31083	CLE5	CLAVATA3/ESR-RELATED 5		0,100	0,001	
AT3G02670	F16B3.30	Glycine-rich protein family		0,100	0,002	
AT1G02360	T6A9.5	Chitinase family protein		0,094	0,008	
AT5G56369		Defensin-like (DEFL) family protein		0,091	0,002	
AT5G58840		Subtilase family protein		0,091	0,000	
AT5G42800	DFR	dihydroflavonol 4-reductase		0,090	0,000	
AT5G54220		Cysteine-rich protein		0,087	0,007	CAATAATTG

AT4G29285	LCR24	low-molecular-weight cysteine-rich 24	0,087	0,002
AT2G04032	ZIP7	zinc transporter 7 precursor	0,087	0,001
AT4G33840	F17I5.30	Glycosyl hydrolase family 10 protein	0,086	0,008
AT5G07850	F13G24.50	HXXXD-type acyl-transferase family protein	0,086	0,007
AT4G30070	LCR59	low-molecular-weight cysteine-rich 59	0,083	0,006
AT5G46877		Defensin-like (DEFL) family protein	0,083	0,005
AT5G46040	PTR3-B	Major facilitator superfamily protein	0,083	0,001
AT2G38900		Serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein	0,075	0,001
AT2G20208	LCR60	low-molecular-weight cysteine-rich 60	0,073	0,000
AT2G30750	CYP71A12	cytochrome P450, family 71, subfamily A, polypeptide 12	0,072	0,001
AT2G30810	GASA12	Gibberellin-regulated family protein	0,071	0,000
AT5G10230	ANNAT7	annexin 7	0,071	0,000
AT4G15750	DL3915C	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein	0,069	0,001
AT3G04280	ARR22	response regulator 22	0,067	0,006
AT1G24062		Cysteine-rich protein	0,067	0,000
AT4G19035	LCR7	low-molecular-weight cysteine-rich 7	0,067	0,002
AT3G03260	HDG8	homeodomain GLABROUS 8	0,065	0,001
AT5G39130		RmlC-like cupins superfamily protein	0,063	0,006
AT3G05741		Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein	0,063	0,001
AT2G39640		glycosyl hydrolase family 17 protein	0,061	0,002
AT2G26865		Encodes a Plant thionin family protein	0,061	0,001
AT5G58820		Subtilisin-like serine endopeptidase family protein	0,059	0,001
AT5G47350		alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	0,059	0,003
AT4G30064	LCR61	low-molecular-weight cysteine-rich 61	0,059	0,000
AT5G38195		Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	0,059	0,005
AT3G55677		Plant self-incompatibility protein S1 family	0,059	0,001
AT1G13609		Defensin-like (DEFL) family protein	0,058	0,001
AT1G26380	T1K7.24	FAD-binding Berberine family protein	0,057	0,009
AT4G13095	LCR37	low-molecular-weight cysteine-rich 37	0,057	0,007
AT4G35725		Protein of unknown function	0,056	0,000
AT4G22115	SCRL14	SCR-like 14	0,056	0,009
AT4G15735	SCRL10	SCR-like 10	0,053	0,000
AT1G64107		Putative membrane lipoprotein	0,053	0,005
AT2G44240		Protein of Unknown Function (DUF239)	0,050	0,000
AT1G21850	sks8	SKU5 similar 8	0,050	0,002
AT5G39300	ATEXPA25	expansin A25	0,048	0,000
AT1G13605		Encodes a defensin-like (DEFL) family protein.	0,045	0,000
AT1G26390	T1K7.23	FAD-binding Berberine family protein	0,043	0,008
AT5G53100		NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	0,043	0,001
AT3G25420	scpl21	serine carboxypeptidase-like 21	0,043	0,000
AT2G47115		Protein of unknown function	0,042	0,001
AT2G02147	LCR73	low-molecular-weight cysteine-rich 73	0,041	0,005
AT5G54225	LCR83	low-molecular-weight cysteine-rich 83	0,037	0,000

AT3G01324		ECA1-like gametogenesis related family protein	0,032	0,006	
AT3G27425		ECA1-like gametogenesis related family protein	0,031	0,000	
AT1G61688		Defensin-like (DEFL) family protein	0,029	0,002	
AT2G31953	LCR76	low-molecular-weight cysteine-rich 76	0,026	0,000	CAATGATTG
AT3G29570		Protein of unknown function	0,022	0,002	
AT1G63057		Protein of unknown function	0,021	0,004	
AT2G44540	AtGH9B9	glycosyl hydrolase 9B9	0,019	0,001	
AT2G14365	LCR84	low-molecular-weight cysteine-rich 84	0,017	0,000	
AT4G13080	XTH1	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 1	0,015	0,004	
AT1G63055		Protein of unknown function	0,011	0,001	
AT5G39280	ATEXPA23	expansin A23	0,009	0,000	
AT1G12665		Encodes a Plant thionin family protein	0,008	0,000	
AT4G17710	HDG4	homeodomain GLABROUS 4	0,000	0,001	CAATAATTG
AT1G29962	AGL64	AGAMOUS-like 64	0,000	0,002	CAATCATTG
AT2G21110		Disease resistance-responsive (dirigent-like protein) family protein	0,000	0,000	
AT2G44550	AtGH9B10	glycosyl hydrolase 9B10	0,000	0,000	
AT4G14630	GLP9	germin-like protein 9	0,000	0,007	
AT1G74045	TET17	tetraspanin 17	0,000	0,007	
AT4G30380	EGC1	Barwin-related endoglucanase	0,000	0,004	
AT5G53780		Protein of unknown function (DUF295)	0,000	0,007	
AT5G13620		Protein of unknown function	0,000	0,001	
AT2G25685	SCRL17	SCR-like 17	0,000	0,002	
AT5G53610		Carbohydrate-binding X8 domain superfamily protein	0,000	0,001	
AT5G63230		Carbohydrate-binding X8 domain superfamily protein	0,000	0,007	
AT5G51845		Defensin-like (DEFL) family protein	0,000	0,007	
AT5G59105		Defensin-like (DEFL) family protein	0,000	0,007	
AT2G36180	CML31	EF hand calcium-binding protein family	0,000	0,002	
AT5G56390		F-box/RNI-like/FBD-like domains-containing protein	0,000	0,007	
AT1G80330	ATGA3OX4	gibberellin 3-oxidase 4	0,000	0,002	
AT4G09795	LCR13	low-molecular-weight cysteine-rich 13	0,000	0,007	
AT2G04425	LCR82	low-molecular-weight cysteine-rich 82	0,000	0,007	
AT1G17150		Pectin lyase-like superfamily protein	0,000	0,007	
AT3G01880	F1C9.34	Plant protein of unknown function (DUF946)	0,000	0,007	
AT5G06020		Plant self-incompatibility protein S1 family	0,000	0,007	
AT1G13520	AT1G13520	Protein of unknown function (DUF1262)	0,000	0,001	
AT4G23080	F7H19.270	Protein of Unknown Function (DUF239)	0,000	0,004	
AT2G25305		Putative membrane lipoprotein	0,000	0,002	
AT1G23145	RALFL2	RALF-like 2	0,000	0,000	
AT4G22400	AT4G22400	Protein of unknown function	0,000	0,007	
AT3G49770	T16K5.120	Protein of unknown function	0,000	0,007	

Anexo 2: Genes diferencialmente expresados en inflorescencias *athb13-1* y descritos como involucrados en la hidratación y germinación de polen.

Locus	Nombre	Descripción	Veces de inducción	T-Test
Modificadores de la pared celular				
AT5G35390	RLK	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	0,1961	0,0002
AT2G15340		Glycine-rich protein	0,3789	0,0025
AT3G03080	T17B22.23	Zinc-binding dehydrogenase family protein	0,5490	0,0002
AT1G79400	ATCHX2	Cation/H ⁺ exchanger 2	0,5409	0,0018
AT2G20430	RIC6	ROP-interactive CRIB motif-containing protein 6	0,5875	0,0009
AT2G33670	MLO5	Seven transmembrane MLO family protein	0,5382	0,0011
AT1G04450	RIC3	ROP-interactive CRIB motif-containing protein 3	0,6231	0,0037
AT4G31230		Protein kinase protein with adenine nucleotide alpha hydrolases-like domain	0,6300	0,0061
AT4G03620	T5L23.11	Myosin heavy chain-related	0,6719	0,0083
AT1G69940	ATPPME1	Pectin lyase-like superfamily protein	0,6907	0,0007
AT5G07510	GRP14	Glycine-rich protein 14	0,6955	0,0182
Transportadores				
AT5G01180	PTR5	Peptide transporter 5	0,4976	0,0100
AT5G53520	ATOPT8	Oligopeptide transporter 8	0,4935	0,0003
AT1G12090		Extensin-like protein	0,6777	0,0173
Factores de transcripción				
AT5G54470		B-box type zinc finger family protein	0,4436	0,0000
AT5G47370	HAT2	Homeobox-leucine zipper protein 4 (HB-4) / HD-ZIP protein	0,6349	0,0009
AT4G09960	STK	K-box region and MADS-box transcription factor family protein	0,5173	3,2E-05
AT5G39860	PRE1	Basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding family protein	0,4862	0,0169
Otros				
AT1G24620	CML25	EF hand calcium-binding protein family	0,6122	0,0144
AT5G07530	GRP17	Glycine rich protein 17	0,6836	0,0343

Anexo 3: Secuencias de los diferentes homólogos de *AtHBI* utilizados en el análisis bioinformático.

Species	Accession number
<i>Amborella trichopoda</i>	XM_006844166.2
<i>Arabidopsis lyrata</i>	XM_002882134.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_111013.4
<i>Brachypodium distachyon</i>	XM_003572933.3
<i>Brassica napus</i>	XM_013875150.1
<i>Brassica oleracea</i>	XM_013783739.1
<i>Brassica rapa</i>	XM_009126771.1
<i>Brassica rapa</i>	XM_009126770.1
<i>Camelina Sativa</i>	XM_010498008.1
<i>Camelina Sativa</i>	XM_010487116.1
<i>Cicer arietinum</i>	XM_012712587.1
<i>Citrus sinensis</i>	XM_006470291.2
<i>Cucumis melo</i>	XM_008460530.2
<i>Cucumis sativus</i>	XM_004142308.2
<i>Elaeis guineensis</i>	XM_010915280.1
<i>Erythrante guttatus</i>	XM_012993954.1
<i>Eucalyptus grandis</i>	XM_010034965.1
<i>Fragaria vesca</i>	XM_004304559.2
<i>Glycine max</i>	XM_003542650.3
<i>Gossypium raimondii</i>	XM_012600677.1
<i>Jatropha curcas</i>	XM_012226424.1
<i>Malus x domestica</i>	XM_008349809.2
<i>Medicago truncatula</i>	XM_013595370.1
<i>Medicago truncatula</i>	XM_013595369.1
<i>Musa acuminata</i>	XM_009419281.1
<i>Nelumbo nucifera</i>	XM_010252991.1
<i>Nicotiana glauca</i>	XM_009779122.1
<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	XM_009624532.1
<i>Oryza brachyantha</i>	XM_006647774.2
<i>Oryza sativa</i>	XM_015770767.1
<i>Phaseolus vulgaris</i>	XM_007151032.1

<i>Phoenix dactylifera</i>	XM_008783776.2
<i>Prunus mume</i>	XM_008232402.2
<i>Pyrus x bretschneideri</i>	XM_009376819.1
<i>Ricinus communis</i>	XM_015718122.1
<i>Sesamum indicum</i>	XM_011087522.1
<i>Setaria italica</i>	XM_004953736.2
<i>Tarenaya hassleriana</i>	XM_010553593.1
<i>Theobroma cacao</i>	XM_007031371.1
<i>Vitis vinifera</i>	XM_002278836.3
<i>Zea Mays</i>	XM_008679379.1

Anexo 4: Propiedades de los uORFs encontrados en genes homólogos a *AtHB1*

Especie	Largo uORF (pb)	En fase con el mORF	Distancia uORF-mORF (pb)	Distancia desde el CAP	uORF y mORF solapados
<i>A.lyrata</i>	90	NO	23	144	NO
<i>A.thaliana</i>	90	SI	120	159	NO
<i>A.trichopoda</i>	87	SI	105	118	NO
<i>B.distachyon</i>	114	SI	91	315	NO
<i>B.napus</i>	90	NO	138	197	NO
<i>B.olaracea</i>	93	NO	98	124	NO
<i>B.rapa 1</i>	96	SI	138	135	NO
<i>B.rapa 2</i>	90	NO	92	203	NO
<i>C.arietinum</i>	90	NO	166	166	NO
<i>C.melo</i>	87	SI	165	160	NO
<i>C.plantagineum</i>	90	NO	146	124	NO
<i>C.sinensis</i>	87	SI	129	210	NO
<i>Camelina sativa</i>	90	SI	156	220	NO
<i>Cucumis sativa</i>	87	NO	163	87	NO
<i>E.grandis</i>	87	SI	186	213	NO
<i>E.guineensis</i>	114	SI	129	259	NO
<i>E.guttatus</i>	90	SI	165	429	NO
<i>E.halophilum</i>	90	NO	160	210	NO
<i>F.vesca</i>	90	NO	169	790	NO
<i>G.max</i>	90	NO	196	199	NO
<i>G.raimondii</i>	87	NO	166	161	NO
<i>H.vulgare</i>	114	NO	110	292	NO
<i>J.curcas</i>	87	NO	167	216	NO
<i>M.acuminata</i>	99	NO	121	170	NO
<i>M.domestica</i>	90	NO	149	268	NO
<i>M.truncatula</i>	90	SI	174	324	NO
<i>N.nucifera</i>	87	NO	125	295	NO
<i>N.sylvestris</i>	87	NO	122	218	NO
<i>N.tomentosiformis</i>	87	SI	144	271	NO
<i>O.brachyantha</i>	114	SI	127	277	NO
<i>O.sativa</i>	114	NO	148	280	NO
<i>P.bretschneideri</i>	87	NO	149	248	NO
<i>P.dactylifera</i>	114	NO	130	228	NO
<i>P.mume</i>	87	NO	191	277	NO
<i>P.vulgaris</i>	90	SI	189	182	NO
<i>R.communis</i>	87	SI	162	177	NO
<i>S.indicum</i>	90	SI	186	226	NO
<i>S.italica</i>	90	NO	226	286	NO
<i>S.lycopersicum</i>	87	NO	148	223	NO

<i>S.tuberosum</i>	87	SI	144	226	NO
<i>T.cacao</i>	87	NO	188	288	NO
<i>T.hassleriana</i>	90	SI	180	252	NO
<i>V.vinifera</i>	90	NO	125	437	NO
<i>Z.mays</i>	90	SI	147	317	NO